



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ  
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ STRESS  
ΣΤΟ ΑΙΜΑ ΤΟΞΙΚΟΜΑΝΩΝ**

**ΛΕΒΕΝΤΕΛΗΣ ΧΡΙΣΤΟΝΙΚΟΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2018

*Στους ασθενείς μου  
των Μονάδων Φαρμακευτικής  
Αντιμετώπισης της Εξάρτησης  
του ΟΚΑΝΑ*

*Στην Αντζουλέτα,  
τη σύντροφό μου και συνοδοιπόρο σε όλα τα βήματα της κοινής ζωής μας και στην  
όμορφη οικογένεια που δημιουργήσαμε*

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κουρέτας Δημήτριος (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Στάγκος Δημήτριος: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τσιτσιμπίκου Χριστίνα, PhD, ERT: Επιστήμων στο Γενικό Χημείο του Κράτους, Επισκέπτρια Καθηγήτρια στο Μεταπτυχιακό Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	8
ABSTRACT.....	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	12
Κεφάλαιο 1: Εξαρτησιογόνες ουσίες.....	12
1.1. Ιστορική αναδρομή.....	13
1.2. Οπιοειδή.....	17
Κεφάλαιο 2: Οξειδωτικό stress – Ελεύθερες ρίζες .....	22
2.1. Ελεύθερες ρίζες και δραστικές μορφές οξυγόνου .....	22
2.1.1. Παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	23
2.1.2. Επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στον άνθρωπο .....	25
2.2. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί .....	26
2.2.1. Ενζυμικοί μηχανισμοί.....	26
2.2.2. Μη ενζυμικοί μηχανισμοί.....	28
2.2. Οξειδωτικό stress.....	32
2.2.1. Οξειδωτικό stress και Εξάρτηση .....	33
Κεφάλαιο 3: Θεραπευτικά προγράμματα φαρμακευτικής υποστήριξης εξαρτημένων από οπιοειδή .....	36
3.1. Θεραπευτικές Μονάδες Φαρμακευτικής Αντιμετώπισης της Εξάρτησης στην Ελλάδα .....	38
3.2. Θεραπεία υποκατάστασης οπιοειδών .....	42
3.2.1. Αγωνιστής οπιοειδών: Μεθαδόνη.....	43
3.2.2. Αγωνιστής οπιοειδών: Βουπρενορφίνη.....	44
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	47
Κεφάλαιο 4: Σκοπός.....	47
Κεφάλαιο 5 : Μεθοδολογία.....	49
5.1. Κριτήρια επιλογής του δείγματος .....	49

5.2. Εργαλεία μελέτης .....	50
5.3. Σχεδιασμός της μελέτης.....	51
5.4. Μετρήσεις δεικτών οξειδωτικού stress.....	53
5.4.1. Προσδιορισμός Ανηγγμένης Γλουταθειόνης (GSH).....	53
5.4.2. Προσδιορισμός Καταλάσης.....	56
5.4.3. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) .....	60
5.4.4. Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) ...	63
5.4.5. Πρωτεϊνικά καρβονύλια .....	65
5.5. Στατιστική Ανάλυση .....	69
Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα .....	70
Κεφάλαιο 7: Συζήτηση-Συμπεράσματα.....	76
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	81

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η χρήση εξαρτησιογόνων ουσιών εξελίσσεται σε μάστιγα στη σύγχρονη εποχή με καταστροφικές επιπτώσεις στην υγεία, στην κοινωνία, στις ανθρώπινες σχέσεις. Οι ασθενείς αυτοί αποτελούν μία ιδιαίτερη κοινωνική ομάδα με πολλά προβλήματα υγείας κινούμενοι μετέωροι πάνω από το συναισθηματικό κενό που δημιουργούν τα ναρκωτικά, οδηγούμενοι στον αργό πνευματικό θάνατο και στον βιολογικό εκφυλισμό.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μέτρηση της δεικτών του οξειδωτικού stress σε θεραπευόμενους υπό υποκατάστατα με μεθαδόνη και βουπρενορφίνη στα προγράμματα του Οργανισμού Κατά των Ναρκωτικών (ΟΚΑΝΑ). Η αναγνώριση των οργανικών και ψυκοκοινωνικών αναγκών των ασθενών αυτών θα αποτελέσει σημαντικό βήμα για την ενίσχυση του θεραπευτικού πλαισίου.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω πρώτα απ' όλα τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτρη Κουρέττα, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών – Τοξικολογίας, που μου εμπιστεύθηκε το θέμα αυτό και με υποστήριξε στην εκπόνηση της μελέτης.

Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ και στα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, τους καθηγητές στο μεταπτυχιακό κ. Στάγκο Δημήτριο (Επίκουρος Καθηγητής) και την Δρ Τσιτσιμίκου Χριστίνα, Επιστήμονα στο Γενικό Χημείο του Κράτους.

Ένα θερμό ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω επίσης στον φίλο πια Δρ Νίκο Γκουτζουρέλα για την σημαντικότερη και εμπράγματη συμβολή του και καθοδήγηση στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Τελειώνοντας, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στη γυναίκα μου για τη συμπαράσταση, την καθοδήγηση, την αφοσίωση, την υπομονή, την επιμονή, την

ουσιαστική συμβολή της και στην όμορφη οικογένεια που δημιουργήσαμε και ότι χάρη σ'αυτούς πραγματοποιήθηκε η εκπόνηση αυτής της μελέτης.

Λάρισα, Ιανουάριος 2018

Χριστόνικος Λεβεντέλης

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής μελέτης είναι η μέτρηση των δεικτών οξειδωτικού stress σε χρήστες ηρωΐνης ενταγμένους σε προγράμματα υποκατάστασης με μεθαδόνη και βουπρενορφίνη.

Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελούνταν από 51 άτομα, από τα οποία 29 ήταν η ομάδα ελέγχου (56,8%) και 22 (43,2%) αποτελούσαν την ομάδα μελέτης. Η ομάδα ελέγχου απαρτιζόταν από υγιείς, που δεν είχαν έρθει σε επαφή με εξαρτησιογόνες ουσίες. Η ομάδα μελέτης περιελάμβανε θεραπευόμενους με υποκατάστατα, εκ των οποίων οι 10 (45,45%) λάμβανε μεθαδόνη και οι υπόλοιποι 12 (54,55%) χορηγούνταν βουπρενορφίνη. Ελήφθησαν δείγματα αίματος για τον προσδιορισμό και τη μέτρηση των δεικτών οξειδωτικού stress (GSH, CAT, TBARS, CARB, TAC). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 18.0.

Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση των GSH, CAT και αύξηση των TBARS στην ομάδα μελέτης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ στην TAC και στα CARB δεν υπήρξε σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες. Σε σχέση με τα δύο υποκατάστατα φάνηκε στην ομάδα της βουπρενορφίνης μεγαλύτερη βελτίωση των δεικτών από ότι στην ομάδα της μεθαδόνης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Αναδεικνύεται η επίδραση και των δύο υποκατάστατων στη βελτίωση της οξειδωτικής άμυνας των χρηστών υπό οποιοδή και η υπεροχή της βουπρενορφίνης έναντι της μεθαδόνης σε όλους τους δείκτες του οξειδωτικού stress.

**Λέξεις Κλειδιά:** οξειδωτικό stress, υποκατάστατο, μεθαδόνη, βουπρενορφίνη, ψυχοδραστικές ουσίες



## ABSTRACT

Aim of this study is the investigation of oxidative stress markers of heroin-dependent patients under substitution treatment with methadone and buprenorphine.

51 patients were included, 29 (56,8%) were control-group and 22 (43,2%) under substitution program. The control group consisted of healthy, non-contacting addictive substances. The study group included substitute treatment, of which 10 (45,45%) received methadone and the rest 12 (54,55%) buprenorphine. Oxidative stress markers (GSH, CAT, TBARS, CARB, TAC) were determined in both groups. SPSS 18.0 was used for statistical analysis.

Decreased GSH, CAT and increased TBARS were observed in study group, while there was no statistical significant difference in TAC and CARB between the two groups. In relation to the two substitutes, the buprenorphine group showed a greater improvement in the markers than in the methadone group compared to the control group.

In concluding the effect of both substitutes on improving oxidative defense of opioid users is demonstrated and buprenorphine seems to be more effective with significant improvement in all oxidative stress markers.

**Key Words:** oxidative stress, psychoactive substances, substitute, methadone, buprenorphine

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανθρώπινη ύπαρξη ως όλον, αποτελείται από σώμα, ψυχή και πνεύμα, ενταγμένη μέσα σε ένα περιβάλλον με το οποίο αλληλεπιδρά (Erickson 2007). Τα τέσσερα αυτά στοιχεία διασυνδέονται μεταξύ τους μέσω της ενέργειας που εκπέμπουν τα κύτταρα (Dossey et al 2005, Newman 1986). Αποτελούν ένα συμπαγές σύστημα, το οποίο δεν μπορεί να διασπαστεί σε μικρότερα μέρη (Dossey 2002, Rogers 1980, Parse 1999).

Ο ανθρώπινος οργανισμός υπόκειται σε συνεχή επιρροή στρεσογόνων παραγόντων (ενδοκυττάρια διεργασίες, ψυχοκοινωνικές αλλαγές, περιβαλλοντικές μεταβολές), οι οποίοι επιδρούν στα οργανικά συστήματα, προκαλώντας βιολογικές αλλαγές οδηγώντας σε λειτουργικές διαταραχές με την ανάπτυξη φλεγμονοδών και εκφυλιστικών διεργασιών (Feuerecker et al 2013, Chiurchiù & MacCarrone 2011, von Bernhardt & Eugenín 2012). Μελέτες τόσο σε ασθενείς με διάφορα νοσήματα (καρκίνος, καρδιαγγειακά, νοσήματα του νεφρού, παθήσεις του αναπνευστικού, ψυχιατρικές νόσοι) όσο και σε διάφορες κοινωνικές ομάδες (αθλητές, δημοσιογράφους, νοσηλευτές, ιατρούς, γονείς, ηλικιωμένους, άνδρες, γυναίκες) έχουν παρουσιάσει τη σύνδεση των στρεσογόνων παραγόντων με βιολογικούς δείκτες, όπως τη κορτιζόλη, την α-αμυλάση, τη σεροτονίνη, τη βαζοπρεσίνη, τις κυτταροκίνες, τις ανοσοσφαιρίνες (Wilhelmsen 2005, Marks et al 2007, Kajantie & Phillips 2006, Kurina et al 2004, Kaspers & Scholz 2004, Fan et al 2009, Debovic et al 2009).

Μεταξύ των κοινωνικών ομάδων, οι χρήστες εξαρτησιογόνων ουσιών είναι από τις κατεξοχήν πληθυσμιακές κατηγορίες, που επηρεάζονται από τις ψυχοκοινωνικές μεταβολές του περιβάλλοντος τους και εμφανίζουν ψυχοσωματικές ασθένειες (Ponizovsky et al 2006, Kosten & George 2002, Brewer et al 1998). Ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι ανεκπλήρωτες προσδοκίες, οι μη

ικανοποιημένες επιθυμίες, οι συνθήκες του περιβάλλοντος, η ελλιπής κοινωνική υποστήριξη, η προβληματική κοινωνική αλληλεπίδραση, η άρνηση, η ελλιπής οικογενειακή συνοχή ή η ανυπαρξία οικογενειακής συνοχής είναι καταστάσεις που οδηγούν στη χρήση τοξικών ουσιών (Grau et al 2009, Saddichha et al 2007, Kendler et al 2003).

Παγκοσμίως, για την αντιμετώπιση του προβλήματος των ναρκωτικών ουσιών, έχουν δημιουργηθεί προγράμματα απεξάρτησης που στηρίζονται σε δύο βασικούς άξονες – την υποκατάσταση με άλλες φαρμακευτικές ουσίες και την ψυχοθεραπευτική υποστήριξη (Matusow et al 2013, Huddleston & Marlowe 2011).

Τα προγράμματα υποκατάστασης αποτελούν ένα σύνολο υπηρεσιών που σχετίζονται με τη χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών – μεθαδόνη, βουπρενορφίνη ως υποκατάστατα της ηρωΐνης υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση εξειδικευμένων επαγγελματιών υγείας (νοσηλεύτες, ψυχίατροι) με σκοπό αρχικά τη μείωση της βλάβης και εν συνεχεία την απεξάρτηση (Brown et al 2006, Geitona et al 2012).

Ωστόσο, αν και έχουν μελετηθεί επαρκώς τα αίτια που οδηγούν στη χρήση ουσιών, ελάχιστες είναι οι μελέτες που αναφέρονται σε προβλήματα που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια απεξάρτησης σε προγράμματα υποκατάστασης και ακόμα λιγότερες εκείνες που αναφέρονται στη δράση των δύο αυτών υποκαταστάτων στο κύτταρο και τη συσχέτιση τους με νευροβιολογικές αλλοιώσεις μέσω της εμφάνισης οξειδωτικού stress, ως αποτέλεσμα της χρήσης των υποκαταστάτων.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής μελέτης είναι η μέτρηση δεικτών οξειδωτικού stress στο αίμα χρηστών ηρωΐνης ενταγμένους σε προγράμματα υποκατάστασης.

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Κεφάλαιο 1: Εξαρτησιογόνες ουσίες

Εξαρτησιογόνες θεωρούνται οι ουσίες των οποίων η χρήση μπορεί να προκαλέσει αρνητικές επιδράσεις στη σωματική, πνευματική και ψυχοκοινωνική κατάσταση. Οι ουσίες αυτές λαμβάνονται όχι για κάποιο θεραπευτικό αποτέλεσμα αλλά για την πρόκληση ευχαρίστησης και ευφορίας σε επαναλαμβανόμενες δόσεις. Στις εξαρτησιογόνες ουσίες συμπεριλαμβάνονται όλες οι ουσίες που απαγορεύονται από το νόμο εξαιτίας των επιβλαβών παρενεργειών τους.

Οι κυριότερες ουσίες είναι διεγερτικά του ΚΝΣ, ναρκωτικά αναλγητικά, παραισθησιογόνα και υπνωτικά. Οι επικρατέστερες μη συνταγογραφούμενες είναι φυτικής προέλευσης ή ημισυνθετικά παράγωγα (π.χ. κάνναβη, κοκαΐνη και οπιοειδή/ηρωίνη) ή και συνθετικά παρασκευάσματα (π.χ. αμφεταμίνες, μεθαμφεταμίνες, MDMA). Στις ουσίες αυτές μπορούν να συμπεριληφθούν το αλκοόλ, ο καπνός και η καφεΐνη, οι οποίες δεν διώκονται νομικά και θεωρούνται κοινωνικά αποδεκτές. Στις νόμιμα συνταγογραφημένες ουσίες ανήκουν οι βενζοδιαζεπίνες (διαζεπάμη, χλωραζεπάμη κ.α.), οι οποίες αν και χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση σοβαρού βαθμού άγχους, αϋπνίας και συνδρόμου πανικού, ωστόσο εμφανίζουν ανοχή και σωματική/ψυχική εξάρτηση.

Στη παρούσα μελέτη, θα αναλυθεί ο μηχανισμός δράσης και οι τοξικές επιδράσεις των οπιοειδών κυρίως, σε συνδυασμό με τις υπόλοιπες ουσίες σε συνάρτηση με την πρόκληση φλεγμονής μέσω της εμφάνισης οξειδωτικού stress.

## 1.1. Ιστορική αναδρομή

Η ιστορία των οπιοειδών παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς το όπιο και τα παράγωγά του θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως η μακροβιότερη και καλύτερα καταγεγραμμένη φαρμακευτική ουσία (Brownstein 1993). Αποκαλούνται ως ναρκωτικά, υπνωαναλγητικά ή ναρκοαναλγητικά (Gozzani 1994, Corbett 1966). Ο όρος οπιοειδή προτάθηκε από τον Acheson, προκειμένου να ονοματοδοτήσει τις ουσίες εκείνες που εμφάνιζαν παρόμοια δράση με τη μορφίνη. Σήμερα, το σύνολο των ουσιών – ημισυνθετικά ή συνθετικά, οι οποίες αντιδρούν με τους υποδοχείς των οπιοειδών είτε ως αγωνιστές είτε ως ανταγωνιστές ονομάζονται οπιοειδή (Martin 1983).

Το όπιο, ως κύρια ουσία, παράγεται από την οικογένεια των παπαρουνοειδών (papaveraceae) με κύριο εκπρόσωπο την μήκωνα την υπνοφόρο με χαρακτηριστικά μονήρη φύλλα και καρπούς σχήματος κάψας. Η συγκεκριμένη ποικιλία ανευρίσκεται σε πολλές ασιατικές χώρες καθώς και στις περιοχές γύρω από τη Μεσόγειο θάλασσα (Booth 1998).

Η πρώτη χρήση τους καταγράφεται στις απώτατες αρχές της ανθρώπινης ιστορίας, αφού τα πρώτα στοιχεία για τη χρήση τους αντλούνται από τη νεολιθική εποχή, όπου ανευρέθησαν χαρακτηριστικοί καψοειδή καρποί σε ένα Ελβετικό Νεολιθικό χωριό. Η παλαιότερη όμως απόδειξη για τη χρήση των οπιοειδών καταγράφεται στους Σουμέριους (5000 π.Χ.) (Booth 1998), όπου απεικονίζεται η παπαρούνα σε ιδεόγραμμα ως φυτό ευφορίας (Cohen 1969). Η χρήση του φυτού περνά στους Ασσύριους και στους αρχαίους Αιγύπτιους, όπου υπολείμματα του οπίου ανακαλύφθηκαν σε Αιγυπτιακό τάφο του 15<sup>ου</sup> π.Χ. αιώνα. Κατά την ίδια περίοδο, σε πάπυρο περιγράφεται η δημιουργία ενός μείγματος ουσιών με κύριο στοιχείο το όπιο

για την αποτελεσματική καταπράυνση των μικρών παιδιών (Cohen 1969), σύμφωνα με το παράδειγμα της θεάς Ίσιδος που καταπράυνε τον υιό της Ωρο (Baraka 2000).

Στην αρχαία Ελλάδα, το όπιο ήταν γνωστό για τις υπνωτικές και καταπραϋντικές ιδιότητες του από τον 7<sup>ο</sup> π.Χ. αιώνα. Ευρήματα καρπών σχήματος κάψας από την παπαρούνα ανακαλύφθηκαν σε αρχαιολογική ανασκαφή στη Σάμο και στις Μυκήνες (Kritikos 1968). Αναφέρεται ότι η θεά Δήμητρα, προκειμένου να κοιμηθεί και να ηρεμήσει λόγω της απαγωγής της κόρης της, Περσεφόνης, από τον Πλούτωνα, έλαβε όπιο. Επίσης, σύμφωνα με την μυθολογία η ίδια θεά έδωσε όπιο στον βασιλιά της Ελευσίνας, Τριπτόλαιμο, για να μπορεί να κοιμάται. Στην Ομήρου Οδύσσεια γίνεται αναφορά σε μία ουσία, ονομαζόμενη ως νηπενθές, και χαρακτηρίζεται ως φάρμακο της λησμονιάς. Θεωρείται, σύμφωνα με τους μελετητές (Kritikos & Papadaki 1967), ότι το φάρμακο νηπενθές περιείχε όπιο. Οι θεραπευτές-ιερείς στα Ασκληπιεία προσέδιδαν μαγικές ιδιότητες στο φάρμακο νηπενθές (Booth 1998). Ο Ιπποκράτης συνταγογραφούσε το φάρμακο «μηκόνιο» (πιθανόν χυμό παπαρούνας), ως καθαρτικό, ναρκωτικό και για τη θεραπεία της λευκόρροιας (Macht 1915, Booth 1998).

Το όπιο είναι ελληνική λέξη, που σημαίνει χυμός. Ο ίδιος όρος αναφέρεται στα εβραϊκά καθώς και στη Βίβλο (Macht 1915). Ο Θεόφραστος κατά τον 3<sup>ο</sup> π.Χ. αιώνα αναφερόταν στη σύνθλιψη των καυοειδών καρπών της παπαρούνας και την εξαγωγή του οπίου (Booth 1998).

Στα ρωμαϊκά χρόνια, το όπιο είχε ευρεία χρήση τόσο ως υπναγωγό όσο και για να επιφέρει το θάνατο (Booth 1998). Η Αγριπίνα, τελευταία σύζυγος του αυτοκράτορα Κλαύδιου, έσταζε στο κρασί του προγονού της Βρετανικού, όπιο προκειμένου να πεθάνει έτσι ώστε στο θρόνο να αναρριχηθεί ο δικός της υιός Νέρωνας. Το 40 μ.Χ., ο Σκριβόνιος – ιατρός του αυτοκράτορα Κλαύδιου, περιγράφει στο εγχειρίδιο του, «Ιατρικές Εκθέσεις», την εξαγωγή του οπίου χαράσσοντας τους

κόκκους της παπαρούνας (Macht 1915, Booth 1998). Στο 2<sup>ο</sup> μ.Χ. αιώνα, ο Γαληνός είχε αντιληφθεί τους κινδύνους από την κατάχρηση του οπίου, του οποίου είχε γενικευθεί η εφαρμογή στην έλευση της ευφορίας σε όλες τις κοινωνικές τάξεις της αυτοκρατορίας. Ακόμα και ο αυτοκράτορας Αντωνίνος ήταν θύμα της χρήσης του οπίου (Wright 1968).

. Μετά την πτώση της Ρωμαϊκής Αυτοκρατορίας, τον 5<sup>ο</sup> μ.Χ. αιώνα, εξαπλώθηκε παντού το σκοταδιστικό πέπλο του μεσαίωνα και οι μέχρι τότε ανακαλύψεις σε όλες τις επιστήμες, λησμονήθηκαν (Duarte 2005). Η κατάσταση αυτή άρχισε να αλλάζει μετά το 12<sup>ο</sup> μ.Χ. αιώνα, όπου οι γνώσεις για τις ιδιότητες του οπίου ανακαλύφθηκαν εκ νέου και βγήκαν στην επιφάνεια οι μελέτες του Πεδάνιου Διοσκουρίδη, ιατρού του ρωμαϊκού στρατού (Baraka 2000). Στην Ανατολή, η ανάπτυξη της Οθωμανικής Αυτοκρατορίας μεταξύ 9<sup>ου</sup> και 16<sup>ου</sup> μ.Χ. αιώνα βοήθησε την αναγέννηση των επιστημών και μεταξύ αυτών της Ιατρικής. Ο Avicenna, περίφημος μουσουλμάνος ιατρός, χρησιμοποίησε το όπιο για τη θεραπεία πολλών συμπτωμάτων, όπως των διαρροϊκών κενώσεων, της ωταλγίας χορηγούμενο είτε από το στόμα είτε από το απευθυσμένο και αναφέρεται ότι πέθανε ο ίδιος από υπερδοσολογία (Al-Mazroa & Halim 1989). Εν συνεχεία, από τους οθωμανούς το όπιο, μέσω των εμπορικών συναλλαγών, εισήχθη στη Κίνα και την Ινδία (Duarte 2005).

Στο Δυτικό κόσμο, την περίοδο της Αναγέννησης, ο Παράκελσος, Ελβετός αλχημιστής παρασκευάζει, μέσω του οπίου, το φάρμακο λαύδανο, το οποίο ονομάζει χαρακτηριστικά "Πέτρα της Αθανασίας" (Baraka 2000, Macht 1915). Παράλληλα κατά την εποχή των Ανακαλύψεων, η καλλιέργεια του οπίου διαδίδεται και στον Νέο Κόσμο και συνεισφέρει στην υποταγή των ινδιάνικων πληθυσμών. Τα τεράστια κέρδη και τα αλληλοσυγκρουόμενα συμφέροντα οδήγησαν στις αρχές του 19<sup>ου</sup> αιώνα στο «Πόλεμο του Οπίου», μεταξύ Κίνας, Αγγλίας και Γαλλίας (Booth 1998).

Το 1803, όταν ο Freidrich Sertuner απομονώνει το ενεργό συστατικό του οπίου, παράγεται το πρώτο ημισυνθετικό, η μορφίνη, που πήρε το όνομα της από τον Μορφέα, το θεό του ύπνου και των ονείρων (Macht 1915, Hamilton 2000). Από την πρώτη αυτή ανακάλυψη, ακολούθησαν πολλές ακόμη και σήμερα γνωρίζουμε ότι το όπιο περιέχει τουλάχιστον 25 αλκαλοειδή διαχωρισμένα σε δύο χημικές κατηγορίες - τα παράγωγα του φαινανθρενίου και τα παράγωγα της βενζυλισοκινόλης (Λιάππας 1992). Μετά την ανακάλυψη της σύριγγας, η χρήση της μορφίνης εξαπλώθηκε και άρχισε να αναγνωρίζεται τόσο η ισχυρή αναλγητική δράση της όσο και η εξαρτησιογόνος επίδραση της (Booth 1998, Howard-Jones 1947). Χρησιμοποιήθηκε ευρέως σε όλες τις πολεμικές συρράξεις – Αμερικανικός Εμφύλιος Πόλεμος, Κριμαϊκός Πόλεμος, Γαλλογερμανικός πόλεμος (1870) (Baraka 2000, Booth 1998).

Έκτοτε οι ανακαλύψεις συνεχίστηκαν και από τη μορφίνη, παράχθηκε η ηρωΐνη (1899), η υδροκωδεΐνη, η πεθιδίνη, η μεθαδόνη (Β΄ Παγκόσμιος Πόλεμος), η φεντανύλη (1960) και τα παράγωγα της (Λιάππας 1992, Murphee 1969, Janssen 1982). Αναγνωρίστηκε ο τρόπος δράσης τους και οι υποδοχείς των οπιοειδών (μ, κ, σ και δ) (Duarte 2005, Harvey & Champe 1995, Finck 1979). Παράλληλα, το 1975 απομονώθηκαν τα ενδογενή οπιοειδή (Hughes 1975), τα οποία ταξινομήθηκαν σε τρεις κατηγορίες: εγκεφαλίνες, ενδορφίνες και δυνορφίνες και των οποίων η σημασία τους δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί. Φαίνεται ότι παίζουν ρόλο ως νευρομεσολαβητές, νευροδιαβιβαστές και σε κάποιες περιπτώσεις συμμετέχουν σε νευροορμονικές λειτουργίες (Inturissi 2002). Εξίσου σημαντικές ήταν οι μελέτες για την ανακάλυψη των ανταγωνιστών ουσιών που θα περιόριζαν τα φαινόμενα της εξάρτησης και της ευφορίας με κύριους εκπροσώπους τη ναλοξόνη και τη ναλτρεξόνη (Gutstein 2001).

Τα οπιοειδή χρησιμοποιούνται στην κλινική πρακτική, ως ισχυρό αναλγητικό, όμως η χρήση τους και κυρίως της ηρωΐνης έχει εξαπλωθεί σε δραματικά



υψηλά ποσοστά ανά τον κόσμο, με εκατομμύρια εξαρτημένους, και κρίθηκε απαραίτητη η δημιουργία ειδικών δομών για την απεξάρτηση των χρηστών τοξικών ουσιών.

## 1.2. Οπιοειδή

Τα οπιοειδή συνδέονται σε ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) (Mansour et al 1995, Vogt et al 1995, Xia et al 2001, Abbadie et al 2004, Beadles-Bohling & Wiren 2005), του γαστρεντερικού σωλήνα, του καρδιακού μυός, των πνευμόνων, του ήπατος, του αναπαραγωγικού συστήματος (Wittert et al 1996, Willemagne et al 2002), στους καρωτιδικούς χημειούποδοχείς, στα φαγοκυτταρικά λεμφοκύτταρα και στα Τ λεμφοκύτταρα (Yaksh 1989).

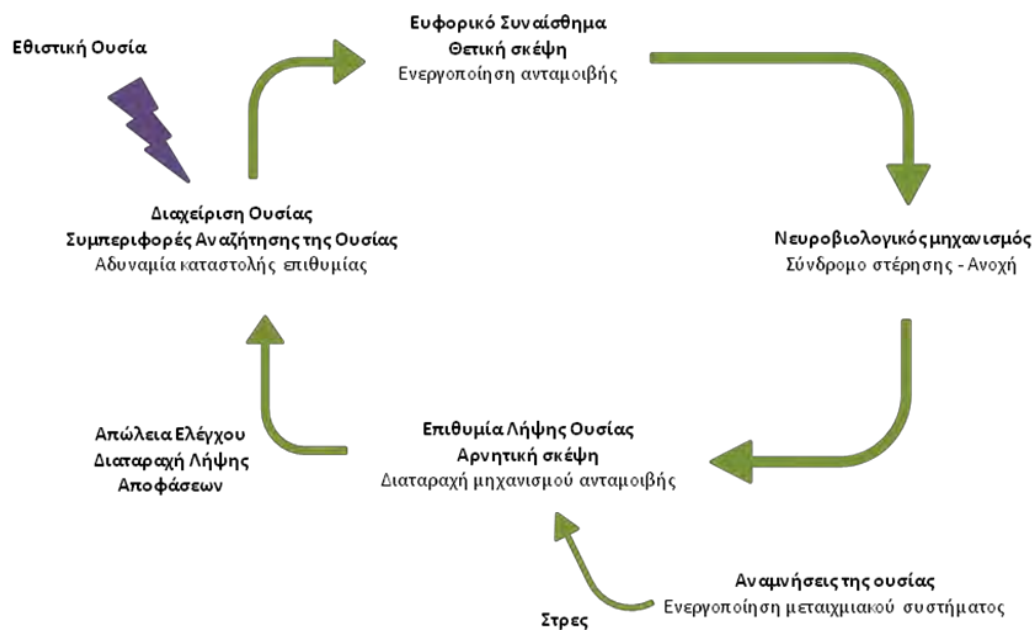
Στον εγκέφαλο εντοπίζονται στο θάλαμο, στον υποθάλαμο, στον ιππόκαμπο, στη φαιά ουσία γύρω από τον υδραγωγό (κυρίως οι μ υποδοχείς), στο φλοιό, στην αμυγδαλή, στους πυρήνες της γέφυρας (κυρίως οι δ υποδοχείς) (Ανισόγλου-Αναστασιάδου 1994). Η εντόπιση τους εκτιμήθηκε με τη χρήση ραδιοσημασμένων αγωνιστών και βρέθηκε ότι είναι κατανεμημένοι παράλληλα με την παλαιοθαλαμική οδό του πόνου και σε περιοχές του μεταχιακού συστήματος και ενέχονται σε μεγάλο βαθμό στη συγκινησιακή συμπεριφορά και επομένως σχετίζονται με τις επιδράσεις ευφορίας των οπιοειδών (Berrocoso 2009). Στο στέλεχος του εγκεφάλου είναι εντοπισμένοι στο μονήρη πυρήνα, και γι' αυτό καταστέλλουν το βήχα. Επιπλέον βρίσκονται στο έδαφος της 4<sup>ης</sup> κοιλίας προκαλώντας αναπνευστική καταστολή, ναυτία και έμετο (Ανισόγλου-Αναστασιάδου 1994). Στον νωτιαίο μυελό, εντοπίζονται στην πηκτωματώδη ουσία των οπίσθιων κεράτων και λιγότερο στη λευκή ουσία (Kitahata et al 1974, Inturissi 2002, Ιατρού 2003).

Οι υποδοχείς αυτοί είναι οι  $\mu$  ( $\mu$ -opioid receptor/MOR),  $\kappa$  ( $\kappa$ -opioid receptor/KOR),  $\delta$  ( $\delta$ -opioid receptor/DOR) (Law & Loh 1999, Pasternack 2004, Feng et al 2012) και ένας τέταρτος υποδοχέας, ο υποδοχέας της ορφανίνης (nonicriptin or orphanin FQ receptor - NOP) (Mollereau et al 1994). Επιπλέον υπάρχουν οι  $\sigma$  υποδοχείς, αλλά η ναλοξόνη ως ανταγωνιστής είναι ανενεργής και γι' αυτό δεν θεωρείται ότι ανήκει στους οπιοειδείς υποδοχείς (Quiron et al 1992, Walker et al 1990), συνδέεται όμως με ψυχομιμητικές δραστηριότητες των οπιοειδών (Ανισόγλου-Αναστασιάδου 1994). Στις οικογένειες αυτές έχουν αναγνωριστεί υπότυποι, ανάλογα με τις κλινικές εκδηλώσεις που εμφανίζουν (Traynor 1989, Traynor & Elliot 1993, Borsodi & Toth 1995, Zaki et al 1996). Η οικογένεια των  $\mu$ -υποδοχέων περιλαμβάνει τους MOR1, MOR2, MOR3. Όμοια, ο  $\kappa$ -υποδοχέας διακρίνεται σε KOR1a, KOR1b, KOR2, KOR3 (Butelman et al 1998, Claude et al 1998), αν και η ταξινόμηση αυτή είναι ακόμη υπό αμφισβήτηση (Feng et al 2012). Στο  $\delta$ -υποδοχέα έχουν αναγνωριστεί δύο υπότυποι, ο DOR1 και DOR2 (Simonin et al 1994). Συνεπώς, τόσο η έκφραση όσο και η εκδήλωση συμπτωμάτων ποικίλλει στα διάφορα όργανα (Bary & Zuo 2005). Κάθε ένας από αυτούς τους υποδοχείς προκαλεί διαφορετικό αποτέλεσμα. Ο  $\mu$ -υποδοχέας συμμετέχει στη πρόκληση ευφορίας, αναλγησίας, καταστολής του αναπνευστικού, σωματική εξάρτηση και σε αυτόν συνδέονται κατ' εξοχήν η μορφίνη και η ηρωίνη. Ο  $\kappa$ -υποδοχέας προκαλεί αναλγησία, καταστολή, μύση. Ο  $\sigma$ -υποδοχέας προκαλεί ευφορία και ψευδαισθήσεις και ο  $\delta$ -υποδοχέας συμμετέχει στη πρόκληση αναλγησίας και σωματικής εξάρτησης (Κοκκώλης 2001, Harvey & Champe 1995).

Οι υποδοχείς των οπιοειδών μετά τη σύνδεση τους με τον αγωνιστή συνδέονται με τις πρωτεΐνες G, οι οποίες βρίσκονται στη κυτταρική επιφάνεια και στη συνέχεια αντιδρούν με τους διαύλους ιόντων  $Ca^{++}$  και  $K^{+}$  καθώς και με άλλα συστήματα δεύτερων αγγελιοφόρων. Το  $Ca^{++}$  διευκολύνει ενδοκυττάρειες διεργασίες με την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών ή την παραγωγή δυναμικού ενέργειας. Οι

αγωνιστές των κ-υποδοχέων δεσμεύονται στους διαύλους  $Ca^{++}$ . Οι αγωνιστές των μ και δ-υποδοχέων αυξάνουν την αγωγιμότητα του  $K^+$ . Αποτέλεσμα αυτών των διεργασιών είναι η ελάττωση της αδενοκυκλάσης με ελάττωση του cAMP, που είναι ο δεύτερος αγγελιοφόρος εμποδίζοντας την εκπόλωση της μεμβράνης. Οι αναστολείς των διαύλων  $Ca^{++}$  αυξάνουν την δράση των οπιοειδών που προκαλείται είτε από φάρμακα είτε από στρεσογόνους παράγοντες (Kavaliers 1987, Law 1999, Bohn & Raehal 2006).

Τα οπιοειδή καθώς και οι άλλες εξαρτησιογόνες ουσίες αυξάνουν την έκλυση ενός νευροδιαβιβαστή, της ντοπαμίνης, στον επικλινή πυρήνα (Sturm et al 2003), που βρίσκεται στο κατώτερο τμήμα του ραβδωτού σώματος και συνδέεται με το μεταχιακό και το εξωπυραμιδικό σύστημα (Nolte & Angevine 2007, Neto et al 2008, Herrero et al 2002). Ο επικλινής πυρήνας θεωρείται ως ο νευρικός διαμεσολαβητής μεταξύ κινήτρων και δράσης, παίζοντας σημαντικό ρόλο στη πρόσληψη τροφής, στη σεξουαλική συμπεριφορά, στη συμπεριφορά με κίνητρο την ανταμοιβή, στη σχετιζόμενη με το στρες συμπεριφορά και στην εξάρτηση από ουσίες (Μαυρίδης 2012, Kauer 2004). Η εξάρτηση φαίνεται να οφείλεται στην αυξημένη έκλυση της ντοπαμίνης σε ερεθίσματα, που σχετίζονται με την πρόκληση ευχαρίστησης από την ουσία, απομνημονεύοντας σήματα που αναγγέλουν την ανταμοιβή. Επομένως όταν το σύστημα της ντοπαμίνης υπερδιεγείρεται, λόγω της χρήσης ναρκωτικών, η επιθυμία επανάληψης της συγκεκριμένης εμπειρίας μπορεί να επικρατήσει σε βάρος άλλων σημαντικών στοχοθετημένων δραστηριοτήτων (Cami & Farre 2003, Womersley & Joachim 2016)



Εικόνα 1: Ο κύκλος της εξάρτησης. Μετάφραση από: Dackis & O'Brien 2005.

Τα οπιοειδή προκαλούν αύξηση της ντοπαμίνης στον επικλινή πυρήνα. Ο κύριος στόχος των οπιοειδών είναι οι υποδοχείς των οπιοειδών. Εξαιτίας των δομικών ομοιοτήτων τους με τα ενδογενή οπιοειδή, μπλοκάρουν τους μ-υποδοχείς, εμποδίζουν την έκκριση του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA), ο οποίος είναι ένας νευροδιαβιβαστής που δρα στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες αναστέλλοντας την απελευθέρωση της ντοπαμίνης. Η δράση των οπιοειδών στον GABA, έχει σαν αποτέλεσμα αύξηση της απελευθέρωσης της ντοπαμίνης από τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του κοιλιακού καλυπτρικού πεδίου, το οποίο σχετίζεται με το σύστημα ανταμοιβής (Nestler 2004).

Επιπλέον, οι χημικές ιδιότητες των ναρκωτικών εμπλέκονται στην κυτταροπλασματική αύξηση της ντοπαμίνης. Ως λιπόφιλα μόρια, διαχέονται εντός των νευρικών απολήξεων και των κυστιδικών μεμβρανών και συσσωρεύονται σε μεγάλες ποσότητες εντός των συναπτικών κυστιδίων (Fleckenstein et al 2007).

Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι επαναλαμβανόμενες μεγάλες δόσεις προκαλούν μόνιμη βλάβη στο μηχανισμό της ντοπαμίνης, εξαιτίας της σύνδεσης της

με δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS – reactive oxygen species), οι οποίες συμβάλλουν στη αδυναμία αποθήκευσης της ντοπαμίνης εντός των συναπτικών κυστιδίων (Fleckenstein et al 2007). Η συνδεδεμένη με δραστικές μορφές οξυγόνου ναρκωτική ουσία ενεργοποιεί την οδό της Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase (JNP/SAPK) προκαλώντας απόπτωση του νευρικού κυττάρου (Cadet et al 2003). Οι JNP/SAPK είναι γνωστές σαν κινάσες που ενεργοποιούνται από το στρες και είναι υπεύθυνες για διάφορα εξωγενή και ενδογενή που προάγουν το στρες, συμπεριλαμβανομένων της υπεργλυκαιμίας, του οσμωτικού stress, της ενεργοποίησης των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και του οξειδωτικού stress (Ho et al 2000, Μπουγουλιά 2006, Nishina et al 2004).

## Κεφάλαιο 2: Οξειδωτικό stress – Ελεύθερες ρίζες

### 2.1. Ελεύθερες ρίζες και δραστικές μορφές οξυγόνου

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα μόριο ή άτομο, που έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα σθένους (Jenkins 1988). Αυτό μπορεί να γίνει είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική ηλεκτρονιακή στιβάδα (Mylonas & Kouretas 1999). Τα μόρια αυτά είναι ιδιαίτερα ασταθή κι έτσι μπορούν να αντιδρούν με άλλα μόρια οξειδώνοντάς τα. Η αντίδραση αυτή γίνεται με σκοπό να συμπληρωθεί η εξωτερική στιβάδα των ελεύθερων ριζών. Στον οργανισμό, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με διάφορα βιομόρια επηρεάζοντας τη φυσιολογική λειτουργία τους.

Οι ελεύθερες ρίζες είναι μια ετερογενής ομάδα μορίων. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου με ένα πρωτόνιο κι ένα ηλεκτρόνιο. Ανάλογα με το κεντρικό τους άτομο, οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να ανήκουν στις δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), τις δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS), τις δραστικές μορφές θείου (Reactive Sulphur Species, RSS) ή τις δραστικές μορφές χλωρίου (Reactive Chlorine Species, RCIS). Οι τρεις τελευταίες κατηγορίες μπορούν να παραχθούν μετά από αντίδραση με τις ROS ή να αυξήσουν την παραγωγή τους (Giles et al 2002). Στον οργανισμό, οι ROS είναι οι ρίζες που συναντώνται συνηθέστερα. Στις ROS ανήκουν οι ρίζες σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ), υδροξυλίου ( $OH^{\cdot}$ ), περοξυλίου ( $ROO^{\cdot}$ ), αλκοξυλίου ( $RO^{\cdot}$ ), υδροπεροξυλίου ( $HO_2^{\cdot}$ ) και οι μη ρίζες υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), υποχλωριώδες οξύ ( $HOCl$ ), υποβρωμιώδες οξύ ( $HOBr$ ), όζον ( $O_3$ ) και μονήρες οξυγόνο ( $^1O_2$ ).

### 2.1.1. Παραγωγή ελευθέρων ριζών

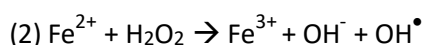
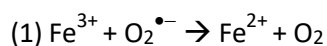
Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν είτε από ενδογενείς είτε από εξωγενείς πηγές.

#### Ενδογενείς πηγές

Η μεγαλύτερη ποσότητα ελευθέρων ριζών παράγεται ενδογενώς κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, που πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Di Meo & Venditti 2001). Κατά τη διαδικασία παραγωγής του ATP πολλά ηλεκτρόνια μπορούν να διαφύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως παραπροϊόντων. Επειδή το οξυγόνο είναι αυτό που καταναλώνεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες ανήκουν στις ROS.

Η αναγωγή της NADH-ουβικινόνης (σύμπλοκο I) και η αναγωγή του κυτοχρώματος (σύμπλοκο II) είναι γνωστές θέσεις παραγωγής  $O_2^{\cdot-}$  και  $H_2O_2$  (Chance et al. 1979). Το  $H_2O_2$  δημιουργείται με τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH και το FADH<sub>2</sub> στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει  $O_2^{\cdot-}$  (Chance et al. 1979). Η  $O_2^{\cdot-}$  ανάγεται σε  $H_2O_2$  από τη μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (Mn-SOD).

Μέσω των αντιδράσεων Haber-Weiss (1) και Fenton (2) ανάμεσα στην  $O_2^{\cdot-}$  και στο  $H_2O_2$  παράγεται  $OH^{\cdot}$ .



Εκτός από τις ROS στα μιτοχόνδρια μπορεί να παραχθεί και μονοξειδίο του αζώτου ( $NO^{\cdot}$ ) από τη συνθάση του  $NO^{\cdot}$ . Εκτός από τα μιτοχόνδρια, μια άλλη πηγή ROS και κυρίως  $H_2O_2$  είναι τα υπεροξειδιοσώματα, τα οποία είναι μικρά

μεμβρανικά οργανίδια, που περιέχουν οξειδωτικά ένζυμα για τη διάσπαση διαφόρων βλαβερών ουσιών για το κύτταρο. Σε κάποια κύτταρα και κυρίως στα ηπατικά, μπορούν να παραχθούν ελεύθερες ρίζες κατά τις αντιδράσεις του συστήματος του κυτοχρώματος P-450. Τα κυτοχρώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό ξеноβιοτικών ουσιών με κύριο μηχανισμό τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή το NADPH στο μοριακό οξυγόνο οξειδώνοντάς το υπόστρωμα, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Η αιμοσφαιρίνη είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά οξυγόνου στα κύτταρα με σκοπό αυτό να συμμετάσχει στη διαδικασία παραγωγής ενέργειας. Κατά τη διάρκεια, όμως, έντονης άσκησης οι απαιτήσεις για οξυγόνο είναι μεγάλες. Σε τέτοιες συνθήκες, ωστόσο, η αιμοσφαιρίνη μπορεί να αυτοοξειδωθεί και να οδηγήσει σε παραγωγή ROS (Ames et al. 1981, Thomas 2000) και συγκεκριμένα  $O_2^{\bullet-}$  (Cooper et al. 2002). Το ίδιο μπορεί να συμβεί και με τη μυοσφαιρίνη, η οποία οδηγεί στην παραγωγή  $H_2O_2$  (Brandley et al. 1993). Επίσης, οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις μπορούν να αποτελέσουν πηγή ελεύθερων ριζών, όπως και τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και ουδετερόφιλα.

### Εξωγενείς πηγές

Σε αυτές περιλαμβάνονται διάφοροι ετερογενείς παράγοντες όπως είναι το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου, η ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και τα βιομηχανικά απόβλητα. Πολλά φάρμακα, επίσης, ευθύνονται για την παραγωγή ελευθέρων ριζών αλλά και άλλες ξеноβιοτικές ουσίες, όπως τοξίνες, εντομοκτόνα και το αλκοόλ. Η διατροφή μπορεί, επίσης, να παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ελευθέρων ριζών



(Ames 1981, Halliwell & Gutteridge 2015).

### 2.1.2. Επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στον άνθρωπο

Οι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται σε κυτταρικές διεργασίες προκαλώντας θετικές και αρνητικές επιδράσεις.

#### Θετικές επιδράσεις

Οι ROS έχουν καίριο ρόλο σε ορισμένους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος, δρώντας ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης. Ο ρόλος τους αυτός ενισχύεται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής (Finaud 2006). Επιπλέον οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν σε αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια, τόσο ενδοκυτταρικά όσο και διακυτταρικά (Linnane et al 2002, Reid 2001, Rimbach et al 1999, Sen et al 1996). Για παράδειγμα, η προσθήκη υπεροξειδίου ή υπεροξειδίου του υδρογόνου σε μια ποικιλία καλλιεργημένων κυττάρων οδηγεί σε αυξημένο ρυθμό αντιγραφής του DNA τους και στον πολλαπλασιασμό αυτών, με άλλα λόγια, αυτές οι ρίζες λειτουργούν ως μιτογόνα. Επιπλέον ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό, την απόπτωση, τη μυϊκή συστολή και την αγγειογένεση (Linnane et al 2002, Reid 2001). Η αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγή ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης. Ακόμα, αιμοπετάλια που βρίσκονται σε περιοχή που έχει υποστεί τραυματική βλάβη απελευθερώνουν ROS, τα οποία αποτελούν σήμα για τη στρατολόγηση κι άλλων αιμοπεταλίων στην περιοχή καθώς και λευκοκυττάρων.

### Αρνητικές επιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν κυρίως αρνητικές επιπτώσεις στον οργανισμό, εμπλεκόμενες στη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Halliwell & Gutteridge 2015), τη μυϊκή καταστροφή (Nikolaidis et al. 2008), τη διαταραχή του καρδιακού μυός (Lassegue & Griendling 2010), την κόπωση (Betters et al 2004), στην αύξηση φλεγμονωδών διεργασιών στο αγγειακό τοίχωμα (Iadecola et al 2009, Harrison et al 2010), στη νόσο Alzheimer και τη γεροντική άνοια (Iadecola et al 2009), στην ενδοεγκεφαλική ενδοκρινική λειτουργία (Cottrell & Ferguson 2004), στην έκκριση κυτταροκινών (Hahn et al 2014) και προσβάλλουν βιολογικά μακρομόρια (τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα) προκαλώντας την καταστροφή ή αλλοίωσή τους (Halliwell & Gutteridge 2015).

## **2.2. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί**

Αντιοξειδωτική ουσία θεωρείται η κάθε ουσία, που όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα μπορεί να καθυστερήσει ή να αναστείλει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Halliwell & Gutteridge, 2015) είτε εμποδίζοντας το σχηματισμό ριζών είτε αδρανοποιώντας τις και μετατρέποντας τις σε λιγότερο δραστικά μόρια συμβάλλοντας έτσι στην επιδιόρθωση των βλαβών. Οι μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών διακρίνονται σε ενζυμικούς και σε μη ενζυμικούς.

### **2.2.1. Ενζυμικοί μηχανισμοί**

Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν ενδογενή ένζυμα, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide Dismutase, SOD), η καταλάση (Catalase,

CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione Peroxidase, GPx) και η αναγωγή της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase, GR).

#### Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

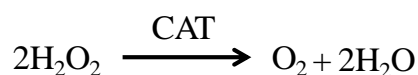
Είναι ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα. Καταλύει την αντίδραση μετατροπής του  $O_2^{\cdot-}$  σε  $H_2O_2$ , όπως φαίνεται παρακάτω:



Η  $O_2^{\cdot-}$  παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορλίωση στα μιτοχόνδρια και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD ενώ όταν διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD, ή οποία βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στα μυϊκά κύτταρα.

#### Καταλάση (CAT)

Η καταλάση βρίσκεται στα υπεροξειδιοσώματα, τα οποία συμβάλλουν στην αποτοξίνωση του κυττάρου χρησιμοποιώντας οξυγόνο και παράγοντας  $H_2O_2$  (Antunes et al. 2002). Η καταλάση καταλύει την αντίδραση μετατροπής του  $H_2O_2$  σε  $H_2O$  και  $O_2$ , όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση.



#### Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

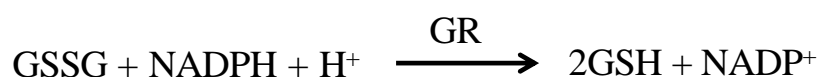
Είναι ένα ένζυμο, που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα και τον εξωκυττάριο χώρο. Όπως και η καταλάση, καταλύει την αντίδραση μετατροπής του  $H_2O_2$  σε  $H_2O$  και  $O_2$  χρησιμοποιώντας την ανηγμένη

γλουταθειόνη, η οποία κατά τη διάρκεια της αντίδρασης οξειδώνεται (Antunes et al. 2002). Ωστόσο, η GPx ενεργοποιείται όταν το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενώ η καταλάση δρα όταν η συγκέντρωση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> είναι υψηλή (Halliwell & Gutteridge 2015). Παρακάτω φαίνεται η αντίδραση, την οποία καταλύει η GPx.



#### Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η GR καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί σε φυσιολογικά επίπεδα το λόγο GSH/GSSG ενδοκυτταρικά. Η GR χρησιμοποιεί σα συνένζυμο το φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (Flavin adenine dinucleotide, FAD). Το Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) ανάγει το FAD, το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης. Έτσι, σχηματίζονται δυο σουλφυδρυλομάδες και δύο μόρια GSH. Παρακάτω φαίνεται η αντίδραση, την οποία καταλύει η GR.



#### **2.2.2. Μη ενζυμικοί μηχανισμοί**

Οι μη ενζυμικοί μηχανισμοί βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες. Περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τη γλουταθειόνη, τη βιταμίνη E, τη βιταμίνη C, το β-καροτένιο, το συνένζυμο Q-10 και το σελήνιο.

## Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι μία ένωση που κατατάσσεται στην κατηγορία των θειολών. Πρόκειται για ένα τριπεπτίδιο ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη και περιέχει μία σουλφυδρυλομάδα. Η σουλφυδρυλική κυστεΐνη λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων και είναι υπεύθυνη για τη βιολογική δραστηριότητα της γλουταθειόνης. Η κυστεΐνη είναι περιοριστικός παράγοντας στην κυτταρική σύνθεση της γλουταθειόνης, δεδομένου ότι αυτό το αμινοξύ είναι σχετικά σπάνιο στα τρόφιμα. Ωστόσο, σε ελεύθερη μορφή, η κυστεΐνη είναι τοξική και καταβολίζεται στο γαστρεντερικό σωλήνα και στο πλάσμα αίματος.

Η γλουταθειόνη είναι ένα υδατοδιαλυτό μόριο, το οποίο συντίθεται στο ήπαρ και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταφέρεται στους ιστούς. Είναι ένα σημαντικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό καθώς συμβάλλει στην προστασία από οξειδωτική βλάβη (Meyer 2008). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να ανακυκλώνεται διαρκώς από την οξειδωμένη (GSSG) προς την ανηγμένη μορφή (GSH), η οποία εμφανίζει τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Halliwell & Gutteridge 1998) και το αντίστροφο. Η σύνθεσή της ελέγχεται από αυτή την επανατροφοδοτική αναστολή (feedback) του ενζύμου που την συνθέτει (συνθετάση της  $\gamma$ -γλουταμυλοκυστεΐνης). Η ανηγμένη μορφή, συναντάται συχνότερα σε σχέση με την οξειδωμένη και συνήθως, η GSSG είναι το 10% της GSH. Ειδικότερα, ο λόγος της ανηγμένης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη στα κύτταρα χρησιμοποιείται συχνά σαν δείκτης της παρουσίας ελεύθερων ριζών, δηλαδή της ύπαρξης οξειδωτικού στρες (Meyer 2008, Flohe 2013, Popov 2014). Η γλουταθειόνη δρα ενάντια του οξειδωτικού στρες απομακρύνοντας τις δραστικές μορφές του οξυγόνου (ROOH,  $H_2O_2$ ) και τις εξωγενείς ηλεκτρονιόφιλες (πχ. κινόνες). Εκτός αυτού, η GSH συμβάλλει στην αναγωγή και άλλων αντιοξειδωτικών του κυττάρου (ασκορβικού

οξέος, βιταμίνης E) συμμετέχοντας έτσι στη διατήρηση της ισορροπίας των επιπέδων των συγκεκριμένων βιταμινών (Παπαγεωργίου 2005).

### Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη, που αποτελείται από διάφορες τοκοφερόλες. Η πιο δραστική αλλά και πιο άφθονη είναι η α-τοκοφερόλη. Βρίσκεται στην κυττοπλασματική αλλά και τη μιτοχονδριακή μεμβράνη και προστατεύει τα λιπίδια από την υπεροξειδωση, που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης, προστατεύει τη βιταμίνη A από την οξειδωση (Halliwell & Gutteridge 2015).

### Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C ή αλλιώς, ασκορβικό οξύ είναι ένα υδατοδιαλυτό, ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο και μπορεί να εξουδετερώνει άμεσα τις ROS (Halliwell & Gutteridge 2015). Πολλοί οργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να συνθέτουν τη βιταμίνη C. Είναι ένα απαραίτητο διατροφικό στοιχείο για τον άνθρωπο, ο οποίος δε μπορεί να τη βιοσυνθέσει, επειδή το ένζυμο οξειδάση της γουλονολακτόνης, που καταλύει τη τελευταία αντίδραση της βιοσύνθεσης του ασκορβικού οξέος από γλυκόζη, απουσιάζει.

Το ασκορβικό οξύ αποτελεί ένα συμπράγοντα ή συνένζυμο οχτώ ενζυμικών αντιδράσεων που συμβαίνουν στον οργανισμό. Αυτές αφορούν τη βιοσύνθεση του κολλαγόνου, της καρτινίνης, το μεταβολισμό της τυροσίνης καθώς και είναι άκρως απαραίτητες στη σύνθεση ορμονών και την απελευθέρωσή τους από τα επινεφρίδια. Ανήκει στα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά και φαίνεται να βρίσκεται στη πρώτη γραμμή άμυνας κατά των οξειδωτικών βλαβών.

Το ασκορβικό οξύ είναι αναγωγικό αντιδραστήριο (δότης ηλεκτρονίων), πράγμα που σημαίνει ότι μπορεί να προμηθεύσει ηλεκτρόνια τόσο σε ένζυμο όσο και

σε οξειδωτικές ενώσεις με τα οποία εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες. Έτσι, μπορεί να ανάγει το σουπεροξειδίο, τις υδροξυλικές ρίζες, το υποχλωριώδες οξύ καθώς και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου μέσα και έξω από τα κύτταρα.

### B-Καροτένιο

Εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες και μετατρέπεται σε βιταμίνη Α, ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού. Το β-καροτένιο πιστεύεται ότι αδρανοποιεί τις ελεύθερες ρίζες και περιορίζει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C και E καθώς και με το σελήνιο. Παίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω της αντιοξειδωτικής της δράσης (Halliwell & Gutteridge 2015).

### Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Κατά τη διάρκεια της άσκησης αυξάνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος (Green & Fraser IG 1988). Από εκεί μπορεί να διαχυθεί στα μυϊκά κύτταρα και με αυτό τον τρόπο τα προστατεύει από τις ROS.

### Συνένζυμο Q10

Το συνένζυμο Q10 (ουβικινόνη) αποτελεί βασικό συστατικό των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κατά την παραγωγή ATP. Έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση όταν βρίσκεται στην ανηγμένη μορφή του προστατεύοντας τα λιπίδια και της πρωτεΐνες από υπεροξειδωση καθώς και το μιτοχονδριακό DNA. Παράλληλα είναι υπεύθυνο για την αναγέννηση της α-τοκοφερόλης (Halliwell & Gutteridge 2015).

## Σελήνιο

Είναι ένα απαραίτητο μέταλλο που συγκαταλέγεται στα ιχνοστοιχεία. Φαίνεται ότι βοηθά στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Λειτουργεί ως συμπαράγοντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και με αυτό τον τρόπο συμμετέχει στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Halliwell & Gutteridge 2015).

## **2.2. Οξειδωτικό stress**

Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται σε μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ της παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου και αζώτου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού. Το οξειδωτικό στρες προκαλείται συνήθως είτε από μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, εξαιτίας μεταλλάξεων ή τοξικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων και μείωση των διατροφικών αντιοξειδωτικών ουσιών είτε από αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS) λόγω της έκθεσης των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS ή λόγω της ύπαρξης παραγόντων που οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή σε ROS.

Αποτελεί διαταραχή στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία του οργανισμού, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή βιομορίων. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει μείωση των αμυντικών συστημάτων του οργανισμού και οξείδωση μορίων όπως λιπιδίων, πρωτεϊνών, υδατανθράκων και DNA. Συνεπώς, αυτή η οξειδοαναγωγική ισορροπία είναι απαραίτητη για την επιβίωση των κυττάρων και την επιτέλεση των λειτουργιών τους (Hansen et al 2006), ενώ κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική για τον εγκέφαλο, όπου καταναλώνεται το 20% του απαιτούμενου από τον οργανισμό οξυγόνου και εμφανίζει μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων (Sayre et al 2008, Schulz et al 2000, Dringen 2000,



Aoyama & Nakaki 2013). Μελέτες έχουν δείξει ότι η διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ROS και της μειωμένης αντιοξειδωτικής επάρκειας με αποτέλεσμα την εμφάνιση οξειδωτικού stress, εμπλέκεται σε νευρολογικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένου της ανάπτυξης φλεγμονωδών και εκφυλιστικών διεργασιών των νευρικών κυττάρων (Dringen 2000, Dringen et al 2000, Chiurchiù & MacCarrone 2011, von Bernhardt & Eugenín 2012).

### 2.2.1. Οξειδωτικό stress και Εξάρτηση

Εξάρτηση είναι το αποτέλεσμα των συμπεριφορικών, νοητικών και ψυχοσωματικών προβλημάτων που αναπτύσσονται μετά από επαναλαμβανόμενη χρήση τοξικών ουσιών. Σύμφωνα με τον ICD-10, τα κριτήρια για την εξάρτηση είναι τα εξής: α) έντονη επιθυμία για την ουσία, β) απώλεια ελέγχου υπερδοσολογίας, γ) συμπτώματα στέρησης, δ) ανοχή (λήψη αυξανόμενης ποσότητας για να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα), ε) παραμέληση άλλων ενδιαφερόντων με μόνο πρωταρχικό σκοπό την ανεύρεση της ουσίας, στ) επίμονη χρήση παρά την εμφάνιση αρνητικών σωματικών ή ψυχολογικών επιδράσεων, ζ) λήψη μεγάλων ποσοτήτων φαρμακευτικών ουσιών, η) ανεπιτυχείς προσπάθειες ελέγχου της χρήσης ή έλλειψη επιθυμίας ελέγχου της χρήσης, θ) μείωση των κοινωνικών και εργασιακών δραστηριοτήτων, ως συνέπεια της χρήσης και ι) αφιέρωση σημαντικού χρόνου για την ανεύρεση και λήψη της ουσίας (Cami & Farre 2003). Θα πρέπει να πληρούνται τρία (3) από τα έξι (6) κριτήρια, για ένα (1) μήνα μέσα στο τελευταίο χρόνο. Η επαναλαμβανόμενη χρήση της ουσίας έχει σαν αποτέλεσμα νευροχημικές δραστηριότητες, οι οποίες οδηγούν σε νευροβιολογικές αλλαγές στην εγκεφαλική ουσία με ενεργοποίηση του «συστήματος ανταμοιβής» και την εμφάνιση χαρακτηριστικών συμπεριφορών εθισμού: ανοχή στην

ουσία, ευαισθητοποίηση, εξάρτηση, στέρηση και έντονη επιθυμία χρήσης (Kreek et al 2002).

Σύμφωνα με το σύστημα ανταμοιβής και τον κύκλο της εξάρτησης, η χρήση εξαρτησιογόνων ουσιών προκαλεί αύξηση στην έκλυση της ντοπαμίνης, η οξείδωση της οποίας οδηγεί στη παραγωγή ριζών κινόνης, οι οποίες προκαλούν μείωση του λόγου GSG:GSSG (Schulz et al 2000, Hirrlinger et al 2002, Rabinovic & Hastings 1998, Moszczynska et al 1998). Επιπλέον, εξαιτίας της δυνητικά σε υψηλά επίπεδα οξείδωσης της ντοπαμίνης, έχει τεθεί η υπόθεση ότι οι ντοπαμινεργικές νευρικές απολήξεις προσπαθούν περισσότερο να διατηρήσουν τα επίπεδα της ντοπαμίνης εντός των συναπτικών κυστιδίων, παρά να εξουδετερώσουν τις παραγόμενες από την οξείδωση της ντοπαμίνης ROS, οι οποίες θα έχουν σαν αποτέλεσμα την πρόκληση νευροτοξικών επιδράσεων (Hastings et al 1996, Oliveira al 2003). Σύμφωνα με μελέτες, φαίνεται ότι η ανίχνευση υψηλών επιπέδων ελεύθερης κυστεΐνης και συνδεδεμένης με κατεχόλη στο ραβδωτό σώμα, προάγει την υπόθεση της νευροτοξικής δράσης της ντοπαμίνης (Hastings et al 1996), αφού αυτές αποτελούν δείκτες οξειδωτικής βλάβης. Η σχέση της τοξικότητας της ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα και της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας αποδίδεται κυρίως στην GSH. Σε μελέτη των Stokes et al (2000), σε καλλιέργεια κυτταρικής σειράς από τα SK-N-SH κύτταρα νευροβλαστώματος, στα οποία είχε προχορηγηθεί GSH, πραγματοποιήθηκε έγχυση ντοπαμίνης και βρέθηκαν αυξημένοι αποπτωτικοί κυτταρικοί δείκτες, κατάτμηση του πυρηνικού DNA και βλάβες στη κυτταρική μεμβράνη. Επίσης, σε άλλη πειραματική μελέτη, όπου αστροκύτταρα καλλιεργήθηκαν σε διάλυμα πλούσιο σε ντοπαμίνη, παρατηρήθηκε μείωση της εξωκυττάριας GSH, γεγονός που υποδεικνύει την οξειδωτική δράση της ντοπαμίνης (Rabinovic & Hastings 1998). Ειδικότερα για την εμφάνιση οξειδωτικού stress ως αποτέλεσμα των εξαρτησιογόνων ουσιών, χαρακτηριστική είναι η μελέτη των Moszczynska et al (1998) σε αρουραίους στους

οποίους χορηγήθηκε μεθαμφεταμίνη, όπου παρατηρήθηκε μείωση της GSH στο ραβδωτό σώμα.

Ωστόσο, θα πρέπει να ειπωθεί ότι υπάρχει πολύ μικρός αριθμός μελετών για την ανάπτυξη οξειδωτικού stress και τη συσχέτιση με την ντοπαμίνη σε χρήστες εξαρτησιογόνων ουσιών υπό υποκατάσταση καθώς και ο μηχανισμός ακόμη δεν έχει διευκρινιστεί επαρκώς.

### Κεφάλαιο 3: Θεραπευτικά προγράμματα φαρμακευτικής υποστήριξης εξαρτημένων από οπιοειδή

Η χρήση εξαρτησιογόνων ουσιών αποτελεί ένα σύνθετο πεδίο στο οποίο διασταυρώνονται η δημόσια υγεία, η δημόσια τάξη και η δικαιοσύνη. Μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του '70, οι διεθνείς συμβάσεις ελάχιστα έκαναν λόγο για κάποια μορφή θεραπευτικής αντιμετώπισης, δίνοντας κυρίως έμφαση στην καταστολή της χρήσης και της διακίνησης των ναρκωτικών (Μαρσέλλος 1997).

Το 1914, επιβάλλεται για πρώτη φορά στις εξαρτησιογόνες ουσίες το νομικό καθεστώς της απαγόρευσης με τη Πράξη του Harrison, που απαγορεύει τη χορήγηση ηρωΐνης χωρίς ιατρική συνταγή. Στα τέλη της δεκαετίας του '30 ανακαλύπτεται η μεθαδόνη στη Γερμανία, για την αντιμετώπιση ενδεχόμενης έλλειψης σε ακατέργαστο όπιο κατά τον επικείμενο πόλεμο. Το 1947 η μεθαδόνη εισήχθη στην Αμερική, ως αναλγητικό και μετά από σειρά μελετών στο Πανεπιστήμιο Rockefeller της Νέας Υόρκης από τον καθηγητή Vincent Dole σε συνεργασία με τη Marie Nyswander και τη Mary Jeanne Kreek, διαπιστώθηκε η δυνατότητα χρήσης της στη θεραπεία ατόμων εξαρτημένων από ηρωΐνη. Κατά τη δεκαετία του '50, η εξάρτηση αρχίζει να αντιμετωπίζεται ως ψυχική νόσος και οι εξαρτημένοι από ηρωΐνη παραπέμπονται σε ψυχιατρικά νοσηλευτικά ιδρύματα, όπου υποβάλλονται σε φαρμακευτική θεραπεία (Γλυκιώτη 2011).

Η έναρξη για την αλλαγή πολιτικής σηματοδοτείται το 1971 με τη σύμβαση για τις ψυχοτρόπες ουσίες του ΟΗΕ (N. 348/1976, N.1105/1972), όπου δίνεται έμφαση στη λήψη θεραπευτικών μέτρων από την πλευρά των κρατών μελών του οργανισμού. Το 1987, η Διεθνής Διάσκεψη για την Τοξικοεξάρτηση και το Παράνομο Εμπόριο υπό την αιγίδα του ΟΗΕ, υιοθετεί το Ολοκληρωμένο Διεπιστημονικό Πλαίσιο Μελλοντικών Δραστηριοτήτων για τον Έλεγχο της Κατάχρησης Ναρκωτικών (UNGASS 1999). Σήμερα, τα 2/3 των χωρών μελών του ΟΗΕ διαθέτουν κρατικές

υπηρεσίες για τη θεραπεία των εξαρτήσεων (WHO 2010), ενώ υπολογίζεται ότι 1,6 εκατομμύρια χρήστες ναρκωτικών παρακολούθησαν θεραπευτικά προγράμματα στην Ευρώπη (1,4 εκατομμύρια στην Ευρωπαϊκή Ένωση) το 2013, αριθμός αυξημένος κατά 0,3 εκατομμύρια σε σύγκριση με την εκτίμηση του 2012 (EMCDDA 2015).

Οι βασικοί τύποι θεραπείας απεξάρτησης, που παρέχονται, στον ευρωπαϊκό χώρο, συμπεριλαμβάνουν τις ψυχοκοινωνικές παρεμβάσεις, τη θεραπεία υποκατάστασης οπιοειδών και τη σωματική αποτοξίνωση. Οι υπηρεσίες παρέχονται σε εξειδικευμένες μονάδες (κέντρα εξωτερικής και εσωτερικής παραμονής), ψυχιατρικές κλινικές και νοσοκομεία, μονάδες σε φυλακές, υπηρεσίες άμεσης πρόσβασης και ιδιωτικά ιατρεία για συνταγογραφούμενη θεραπεία υποκατάστασης οπιοειδών. Σημαντικό είναι το ποσοστό των χρηστών στην Ευρώπη που παρακολουθούν θεραπευτικό πρόγραμμα σε κέντρα εσωτερικής διαμονής, όπως κέντρα ενταγμένα σε νοσοκομεία (π.χ. ψυχιατρεία), θεραπευτικές κοινότητες και εξειδικευμένα κέντρα εσωτερικής διαμονής. Σύμφωνα με τα στοιχεία των εισαγωγών σε θεραπεία, μετά τα άτομα που καταναλώνουν οπιοειδή, τη δεύτερη πολυπληθέστερη ομάδα αποτελούν αυτοί που καταναλώνουν κάνναβη, ακολουθούμενοι από αυτούς της κοκαΐνης. Η θεραπεία υποκατάστασης συνιστά την επικρατέστερη θεραπευτική επιλογή, κατά κανόνα σε συνδυασμό με ψυχοκοινωνικές παρεμβάσεις. Τα διαθέσιμα στοιχεία συνηγορούν υπέρ αυτής της προσέγγισης, καθώς διαπιστώνεται θετική επίδραση όσον αφορά την παραμονή των ασθενών σε θεραπεία, τη μείωση της χρήσης παράνομων οπιοειδών, τη μείωση των επικίνδυνων συμπεριφορών και τη μείωση της βλάβης και της θνησιμότητας λόγω υπερδοσολογίας (EMCDDA 2015).

Σε σχέση με τα φαρμακευτικά υποκατάσταση, το πιο συχνά συνταγογραφούμενο υποκατάστατο είναι η μεθαδόνη, η οποία χορηγείται στο 69% (άνω των 2/3) των θεραπευομένων, στο 28% βουπρενορφίνη, και στο υπόλοιπο ποσοστό άλλες ουσίες υποκατάστασης, όπως μορφίνη βραδείας αποδέσμευσης ή

διακετυλμορφίνη (ηρωίνη). Ο αριθμός των χρηστών οπιοειδών που έλαβαν θεραπεία υποκατάστασης υπολογίζεται ότι το 2013 ανήλθε σε 700000, τα δε στοιχεία αποτυπώνουν μια ελαφρώς πτωτική τάση από το 2011. Σε σχέση με τη χρήση ουσιών, σε ποσοστό 71,7% βρέθηκε χρήση πολλών εξαρτησιογόνων ουσιών. Πολλαπλή χρήση ανέφεραν σε υψηλότερο ποσοστό τα άτομα με ιστορικό προηγούμενης εισόδου σε θεραπεία συγκριτικά με τις νέες αιτήσεις, καθώς και οι χρήστες κοκαΐνης (80,8%) και οπιοειδών (76,8%) (EMCDDA 2015).

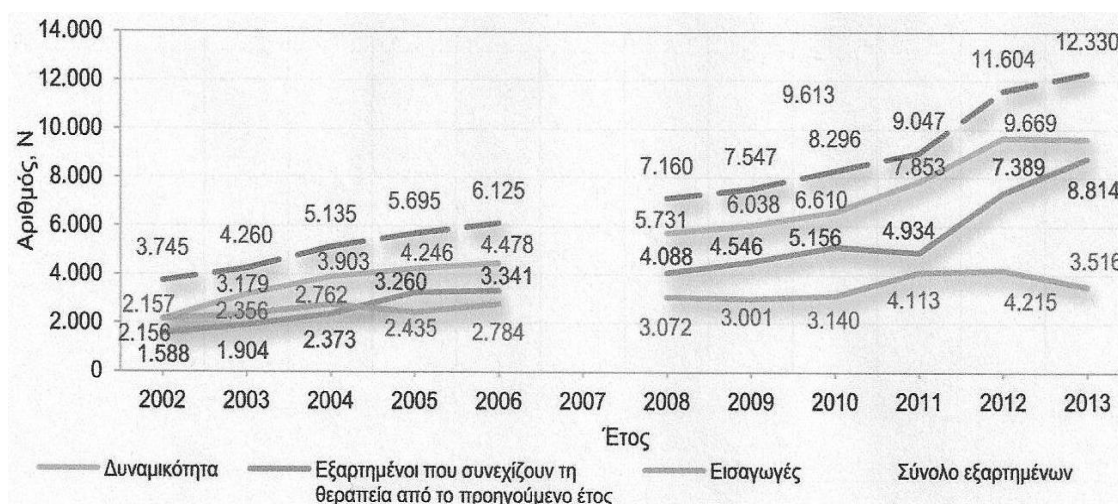
Όσον αφορά στη θεραπεία, οι εισοδοί αφορούσαν στην πλειονότητά τους (69,2%) προβλήματα από τη χρήση οπιοειδών, η κάνναβη αναφέρθηκε σε ποσοστό 21,5%, με την κοκαΐνη και τις άλλες ουσίες να ακολουθούν σε χαμηλότερα ποσοστά (5,1% και 4,1%, αντίστοιχα). Η χρήση οπιοειδών αναφέρεται σε σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό στις νέες αιτήσεις θεραπείας συγκριτικά με τις αιτήσεις με ιστορικό προηγούμενης εισόδου σε θεραπεία (54,9% και 80,0%, αντίστοιχα). Στις νέες αιτήσεις, αντίθετα, περιλαμβάνεται σημαντικά υψηλότερο ποσοστό χρηστών κάνναβης (35,3%) (EMCDDA 2015).

### **3.1. Θεραπευτικές Μονάδες Φαρμακευτικής Αντιμετώπισης της Εξάρτησης στην Ελλάδα**

Τα προγράμματα υποκατάστασης ανήκουν στην πολιτική μείωσης της βλάβης, μείωση της χρήσης ναρκωτικών, καθώς και των συναφών με τη χρήση προβλημάτων (κοινωνικών και υγείας), τη διασφάλιση της δημόσιας υγείας από τη μετάδοση μολυσματικών ασθενειών, καθώς και τη παροχή υποστήριξης σε άτομα τα οποία επιθυμούν να απεξαρτηθούν από τις ουσίες (EMCDDA 2015).

Στην Ελλάδα, σύμφωνα με τα στοιχεία της τελευταίας έκθεσης του ΕΚΤΕΠΝ (2013), 4.894 άτομα εισήλθαν σε θεραπεία για χρήση ουσιών. Τρεις στις 5 εισόδους

έγιναν σε μονάδες εξωτερικής παραμονής (61,0%, μείωση συγκριτικά με το 2012), μία στις 3 σε εσωτερικής παραμονής (33,1%, αύξηση σε σύγκριση με το 2012), ενώ το 5,9% αφορούσε χρήστες που έλαβαν υπηρεσίες σε μονάδες άμεσης πρόσβασης. Στην πλειονότητά τους (71,7%), οι εισοδοί στη θεραπεία αφορούσαν ένταξη σε «στεγνά» προγράμματα, ενώ σε ποσοστό 22,5% εισήχθησαν σε προγράμματα υποκατάστασης (μείωση συγκριτικά με το 2012).



Γράφημα 1: Διαχρονική τάση της δυναμικότητας και του αριθμού των θεραπευομένων.  
Πηγή: ΕΚΤΕΠΝ (2015).

Δύο στις 5 εισόδους (43,1%) αφορούσαν χρήστες ουσιών οι οποίοι δεν είχαν ζητήσει θεραπεία ποτέ στο παρελθόν, ενώ η «οικογένεια» ή οι «φίλοι» (39,9%) αποτέλεσαν τις συχνότερα αναφερόμενες πηγές παραπομπής σε θεραπεία και σε ποσοστό 33,2% ανέλαβαν οι ίδιοι οι χρήστες πρωτοβουλία να ενταχθούν σε πρόγραμμα θεραπείας (ΕΚΤΕΠΝ 2015).

Όπως ορίζεται στο άρθρο 48 της Υπουργικής Απόφασης αριθμ.Υ5γ/Γ.Π.οικ.100847 (ΦΕΚ 1343/Β/2002) και (ΦΕΚ 191/Α/2007) Κεφάλαιο 1 και στο Πλαίσιο Λειτουργίας των Θεραπευτικών Δομών του ΟΚΑΝΑ (2012), οι στόχοι των προγραμμάτων υποκατάστασης είναι οι εξής:

α) σε σχέση με την ελαχιστοποίηση των κινδύνων από τη χρήση:

- η συγκράτηση του ασθενούς στο πρόγραμμα με θέσπιση κινήτρων,

- η μείωση της παράλληλης χρήσης,
- η μείωση της παραβατικότητας,
- ο περιορισμός του ενδεχόμενου προσβολής από μολυσματικές ασθένειες και η μετάδοσή τους σε τρίτους,
- η σταθεροποίηση σε έναν κανονικό τρόπο ζωής που συνοδεύεται από βελτίωση των οικογενειακών και κοινωνικών σχέσεων, καθώς και από ενδιαφέρον για εκπαίδευση/κατάρτιση, με σκοπό την επαγγελματική αποκατάσταση

*β) σε σχέση με την απεξάρτηση*

- η αποχή από τη χρήση οπιοειδών,
- η αποχή από τη χρήση άλλων ναρκωτικών,
- η αποχή από την κατάχρηση αλκοόλ,
- η μείωση της παραβατικότητας και η διασφάλιση της υγείας,
- η εξεύρεση εργασίας/παραγωγικής απασχόλησης, η βελτίωση του επιπέδου σπουδών και η επαγγελματική αποκατάσταση».

Κύρια επιδίωξη αποτελεί η ιατρική συντήρηση, η σταθεροποίηση σε έναν ομαλό τρόπο ζωής, που θα συνοδεύεται από βελτίωση των οικογενειακών και κοινωνικών σχέσεων, καθώς και από ενδιαφέρον για ανάπτυξη κοινωνικών δραστηριοτήτων. Καθίσταται σαφές ότι οι στόχοι του προγράμματος είναι πολύπλευροι, δίνοντας έμφαση στην ολιστική αντιμετώπιση με βάση το βιοψυχοκοινωνικό μοντέλο θεώρησης της υγείας και της ασθένειας.

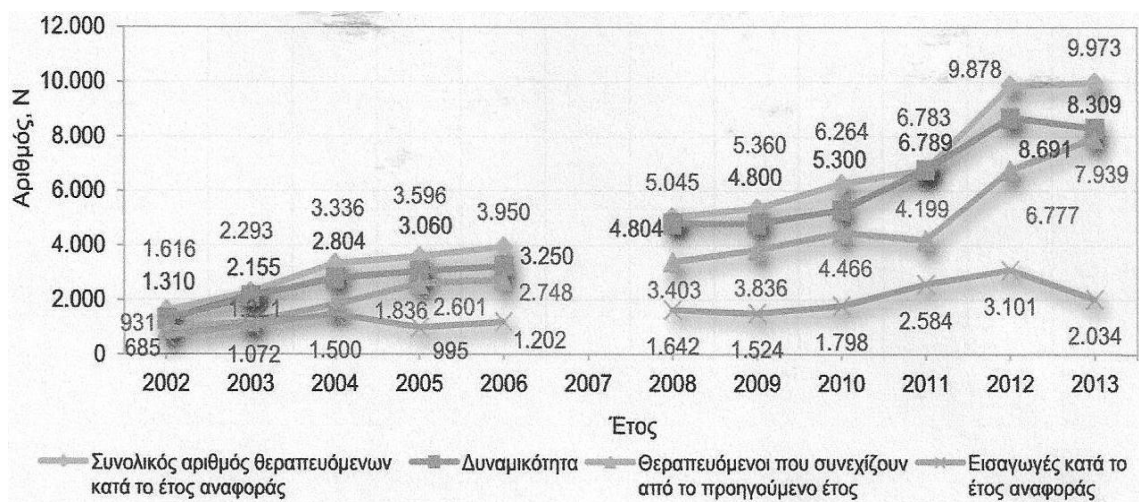
Οι επίσημα αναγνωρισμένοι φορείς οι οποίοι παρέχουν τους τύπους θεραπείας στη χώρα μας είναι ο ΟΚΑΝΑ, το ΚΕΘΕΑ, η Μονάδα Απεξάρτησης 18 ΑΝΩ του Ψυχιατρικού Νοσοκομείου Αττικής (ΨΝΑ), το Ψυχιατρικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης (ΨΝΘ), η Ψυχιατρική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών, γενικά δημόσια νοσοκομεία (σε συνεργασία με τον ΟΚΑΝΑ), το ανεξάρτητο σωματείο



ΘΗΣΕΑΣ στο πλαίσιο του Δήμου Καλλιθέας, το Ελληνικό Κέντρο Ψυχικής Υγιεινής και Ερευνών και το Υπουργείο Δικαιοσύνης (φυλακές Ελεώνα). Το 2013 στην Ελλάδα λειτουργούσαν συνολικά 105 θεραπευτικά προγράμματα/μονάδες που παρείχαν θεραπεία, εκ των οποίων 53 Θεραπευτικές Μονάδες Φαρμακευτικής Αντιμετώπισης της Εξάρτησης – ΘΜΦΑΕ (44 μονάδες χορηγούν κυρίως βουπρενορφίνη και 9 μονάδες μεθαδόνη), 44 θεραπευτικά προγράμματα ψυχοκοινωνικών παρεμβάσεων – «στεγνά» (11 εσωτερικής διαμονής ενηλίκων, 21 εξωτερικής παραμονής ενηλίκων, 11 εξωτερικής παραμονής εφήβων και 1 πρόγραμμα σωματικής αποτοξίνωσης), καθώς και 8 θεραπευτικά προγράμματα για φυλακισμένους και αποφυλακισμένους χρήστες (Σκανδάμη και συν 2016, ΕΚΤΕΠΝ 2015).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι από το 2010 ξεκίνησε το τεράστιο εγχείρημα λειτουργίας νέων θεραπευτικών μονάδων υποκατάστασης σε όλη τη χώρα με ένταξη και σύνδεση με τα νοσηλευτικά ιδρύματα. Δημιουργήθηκαν 42 νέες μονάδες υποκατάστασης του OKANA, σε νοσοκομεία της Αθήνας και της Θεσσαλονίκης, και από το 2012 και σε άλλες επαρχιακές πόλεις, έτσι ώστε να δοθεί η δυνατότητα σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο αριθμό χρηστών να εισέλθουν σε θεραπεία (ΕΚΤΕΠΝ 2014).

Όσον αφορά το σύνολο των ατόμων που παρακολούθησαν την κυρίως θεραπευτική φάση πρόκειται για 12.330 άτομα, εκ των οποίων ποσοστό 71,5% αφορούσε σε άτομα που βρίσκονταν ήδη υπό θεραπεία, ενώ ο συνολικός αριθμός των εισαγωγών ανέρχεται σε ποσοστό 28,5%. Επιπρόσθετα, το 80,9% (Γράφημα 6.5) από τον συνολικό αριθμό των θεραπευομένων για το 2013 βρίσκονταν σε ΘΜΦΑΕ, ενώ το υπόλοιπο 19,1% σε «στεγνό» θεραπευτικό πρόγραμμα.



Γράφημα 2: Διαχρονική εξέλιξη της δυναμικότητας και του αριθμού των θεραπευόμενων στις ΘΜΦΑΕ. Πηγή: ΕΚΤΕΠΝ 2015.

Σε σχέση με την έκβαση της θεραπευτικής διαδικασίας, 9.105 θεραπευόμενοι (73,8%) συνέχιζαν την παρακολούθηση του προγράμματος μέχρι το τέλος του 2013, ενώ 587 θεραπευόμενοι (4,8%) ολοκλήρωσαν τη θεραπεία. Οι υπόλοιποι 2.638 θεραπευόμενοι (21,4%) που αποχώρησαν από τα θεραπευτικά προγράμματα είχαν ως κυριότερους λόγους: α) την οικειοθελή αποχώρηση (10,1%, 1.240 άτομα), β) την πρόωρη χορήγηση εξιτηρίου (6,4%, 789 άτομα) και γ) την παραπομπή σε άλλη μονάδα ή υπηρεσία (2,7%, 334 άτομα) (ΕΚΤΕΠΝ 2015).

### 3.2 Θεραπεία υποκατάστασης οπιοειδών

Οι χρήστες οπιοειδών αντιπροσωπεύουν την πολυπληθέστερη ομάδα χρηστών σε θεραπεία σε εξειδικευμένα κέντρα (μονάδες) και απορροφούν το μεγαλύτερο μέρος των διαθέσιμων θεραπευτικών πόρων. Η θεραπεία υποκατάστασης εφαρμόζεται με φαρμακευτικές ουσίες που σκοπό έχουν να συνδεθούν με τους υποδοχείς των οπιοειδών και να παράγουν παρόμοια αποτελέσματα με τα ενδογενή οπιοειδή (Julien 1998), για μείωση της βλάβης και βελτίωση του επιπέδου ποιότητας της ζωής. Στην Ελλάδα για τη θεραπεία υποκατάστασης χρησιμοποιούνται οι ουσίες – μεθαδόνη

(διάλυμα) και βουπρενορφίνη (δισκία) αποκλειστικά από τον OKANA και σε ειδικά προφυλαγμένους χώρους εντός των θεραπευτικών μονάδων.

### 3.2.1. Αγωνιστής οπιοειδών: Μεθαδόνη

Η μεθαδόνη είναι ένα συνθετικό οπιοειδές, το οποίο δεσμεύεται στους  $\mu$ ,  $\kappa$  και  $\delta$  υποδοχείς των οπιοειδών. Η μεγαλύτερη δράση της ασκείται στους  $\mu$  υποδοχείς, η ενεργοποίηση των οποίων προκαλεί αναλγησία, αναπνευστική καταστολή, φυσική εξάρτηση και ανοχή (Harvey & Champe 1995). Αποτελείται από δύο εναντιομερή σε ίση ποσότητα: το ενεργό  $l(R)$ , το οποίο έχει χρόνο ημίσειας ζωής περίπου 36-48 ώρες και το ανενεργό  $d(S)$  εναντιομερές με χρόνο περίπου δεκαέξι (16) ώρες (Hachey et al 1977, Kreek et al 1979, Ferrari et al 2004). Παρουσιάζει πολύ μεγάλη βιοδιαθεσιμότητα (>90%) διά της πεπτικής οδού χορήγησης με μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής για εκτεταμένο θεραπευτικό διάστημα (Nilsson et al 1982, Wollff et al 1993). Εμφανίζει υψηλή απορρόφηση ανιχνεύσιμη στο πλάσμα μέσα σε 30min από την ώρα χορήγησης ανερχόμενη στα ανώτερα επίπεδα μέσα σε 2-4 ώρες με χρονική διάρκεια 24 ωρών (Ear et al 2002, Kling et al 2000) και λόγω του NMDA υποδοχέα παρουσιάζει σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη ανοχής (Davis & Inturrisi 1999).

Κατά τη διάρκεια του προγράμματος απεξάρτησης, τα επίπεδα της ουσίας διατηρούνται σταθερά εξαιτίας της σταδιακής απελευθέρωσης της στην αιματική κυκλοφορία από το ήπαρ (Kreek et al 1978). Η μεθαδόνη μεταβολίζεται στο ήπαρ από το ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος P450 (CYP3A4, CYP2D6, CYP2B6, CYP1A2) σε δύο μεταβολίτες, την πυρρολίνη και την πυρρολιδίνη (Lugo et al 2005) και απεκκρίνεται στα ούρα και στα κόπρανα (Kreek et al 2010).

Κατά την είσοδο στο πρόγραμμα, χορηγούνται αρχικά 20-40mg/24ωρο με σταδιακή αύξουσα πορεία μέχρι τα 80-150mg/24ωρο περίπου, προκειμένου να μην

ξεπεραστεί το επίπεδο ανοχής με αποτέλεσμα να υπάρξει αθροιστική δράση και να προκληθεί καταστολή και αναπνευστική ανεπάρκεια (Kreek et al 2010). Μελέτες έχουν δείξει ότι κατά τη διάρκεια της σταθεροποίησης της δοσολογίας μπορεί να υπάρχουν φαινόμενα συνδρόμου στέρησης είτε λόγω της αλληλεπίδρασης με άλλες ουσίες είτε λόγω ψυχοπαθολογικού υπόβαθρου (McCance-Katz et al 2010). Από τη στιγμή που θα επιτευχθεί η δόση συντήρησης, σπάνια χρειάζεται αύξηση της δοσολογίας εξαιτίας ανάπτυξης ανοχής (Davis & Inturrisi 1999).

Επιπλέον, λόγω του ότι αποκλείει κατά 30% τους  $\mu$  υποδοχείς, επιτρέπει τη φυσιολογική λειτουργία τους έναντι του πόνου, του συστήματος ανταμοιβής και των αλλαγών της διάθεσης (Kling et al 2000).

### **3.2.2. Αγωνιστής οπιοειδών: Βουπρενορφίνη**

Αντίστοιχα με τη μεθαδόνη, εφαρμόζεται και η βουπρενορφίνη (Prenorvine), ως ουσία υποκατάστασης, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Αποτελεί μερικό αγωνιστή των  $\mu$  υποδοχέων των οπιοειδών και ανταγωνιστή των  $\kappa$  υποδοχέων (Strain 2006). Η ενεργοποίηση των  $\kappa$  υποδοχέων παίζει ρόλο στην εμφάνιση συμπτωμάτων στέρησης και κατάθλιψης. Ανταγωνιζόμενη όμως αυτή τούς την δραστηριότητα, επιβραδύνοντας την ουσιαστικά, η βουπρενορφίνη συμβάλλει στην ανάπτυξη θετικής διάθεσης και ευχάριστων συναισθημάτων. Λαμβάνεται υπογλωσσίως υπό τη μορφή δισκίου και συγκρινόμενη με τη μεθαδόνη (πλήρης αγωνιστής) εμφανίζει μικρότερου βαθμού ευφορικά φαινόμενα (Saidak et al 2006) με μικρού βαθμού κίνδυνο υπερδοσολογίας ή καρδιοαναπνευστικής καταπληξίας (Helm et al 2008). Επειδή είναι διαλυτή στο νερό, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ενδοφλέβια (IV) χρήση (Strain 2006). Για την αποφυγή αυτού του φαινομένου κυκλοφορεί συνδυασμένη με τον ανταγωνιστή των οπιοειδών, τη ναλοξόνη (Suboxone) σε ενοποιημένο δισκίο, όπου

στην περίπτωση που χρησιμοποιηθεί IV, τότε αναπτύσσονται οι ιδιότητες του ανταγωνιστή (Strain 2006, Helm et al 2008, Larance et al 2011). Αντίθετα, η ναλοξόνη εμφανίζει ελάχιστη βιοδιαθεσιμότητα από την υπογλώσσια οδό, για να παρουσιάσει κάποιο κλινικό αποτέλεσμα (Comer et al 2010).

Τα δισκία βουπρενορφίνης παρέχονται στη δοσολογία των 8mg και 2mg, καθώς και τα δισκία βουπρενορφίνης/ναλοξόνης διατίθενται σε περιεκτικότητα των 8mg βουπρενορφίνης/2mg ναλοξόνης και των 2mg βουπρενορφίνης/0.5mg ναλοξόνης. Στο εξωτερικό κυκλοφορούν τα φιλμ βουπρενορφίνης/ναλοξόνης, τα οποία τοποθετούνται εντός του στοματικού βλεννογόνου για ταχεία διάλυση. Επιπλέον, ερευνητικές δοκιμές πραγματοποιούνται για την παρασκευή υποδόριου εμφυτεύματος βουπρενορφίνης με σταδιακή απελευθέρωση της ουσίας διάρκειας 6 μηνών (Ling et al 2010).

Εμφανίζει εκτεταμένης διάρκειας χρόνο ημίσειας ζωής – περίπου 32 ώρες, σε αντίθεση με τη μεθαδόνη, που παρουσιάζει 24 ώρες (Chiang & Hawks 2003). Εξαιτίας αυτού, υπάρχει η δυνατότητα υπέρβασης της 24ωρης δοσολογίας και μπορεί να χορηγείται ανά διήμερο, ενισχύοντας την κοινωνική ζωή των θεραπευομένων, το αίσθημα αυτοφροντίδας και την ανάπτυξη δραστηριοτήτων για μια πιο φυσιολογική ζωή (Nutt 2015). Η επίδραση της ουσίας εμφανίζεται περίπου σε 30min μετά τη χορήγηση, ανερχόμενη στα υψηλότερα επίπεδα στο πλάσμα σε περίπου 1-3 ώρες (Bart 2012). Αξιοσημείωτο είναι ότι, λόγω του υψηλού βαθμού συγγένειας με τους υποδοχείς των οπιοειδών, παρουσιάζει βραδεία αποδέσμευση (Cowan 2003) αναστέλλοντας τη δράση άλλων οπιοειδών όπως της ηρωίνης ή της μεθαδόνης (Maremmani et 2011) μειώνοντας, κατά αυτό τον τρόπο, τον κίνδυνο υποτροπών, ιδιαίτερα των θεραπευομένων που εμφανίζουν τη τάση αυτοδιαχείρισης της θεραπείας (Walsh & Eissenberg 2003).

Η έναρξη στη θεραπεία χαρακτηρίζεται από χαμηλή αρχική δοσολογία (2-4mg), η οποία σταδιακά αυξάνεται μέχρι να φτάσει στα 14-16mg/24ωρο (Saxon et al 2013a). Όταν τα συμπτώματα του συνδρόμου στέρησης υποχωρήσουν, τότε δίνεται η δυνατότητα αύξησης της με διακύμανση από 2-32mg/24ωρο (Nutt 2015, Saxon et al 2013b). Αν και, σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, η θεραπεία συντήρησης με τη βουπρενορφίνη είναι αρκετά ασφαλής (Fudala et al 2003, Ling et al 1996, Johnson et al 2000), ωστόσο έχουν αναφερθεί θάνατοι κυρίως είτε λόγω IV έγχυσης της ουσίας είτε σε συνδυασμό με βενζοδιαζεπίνες (Kintz 2001).

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Κεφάλαιο 4: Σκοπός

Ερευνητικά δεδομένα έχουν αναδείξει τη σημαντική επίδραση των οπιοειδών στον οργανισμό προκαλώντας νευροβιολογικές αλλαγές μέσω της εμφάνισης οξειδωτικού stress (Dringen 2000, Dringen et al 2000, Chiurchiù & MacCarrone 2011, von Bernhardt & Eugenin 2012).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία:

- Έχει αναγνωρισθεί το ψυχοκοινωνικό πλαίσιο που ωθεί στη λήψη της ουσίας.
- Έχουν αναληφθεί δράσεις για την πρόληψη έναρξης χρήσης ουσιών.
- Έχει πλήρως κατανοηθεί ο νευροβιολογικός μηχανισμός της απόκρισης στα οπιοειδή.
- Έχουν ανακαλυφθεί και εφαρμοσθεί στη κλινική πρακτική φαρμακευτικές ουσίες (υποκατάστατα) για την απεξάρτηση και τη μείωση της βλάβης.
- Έχει τεθεί η επίδραση των υποκαταστάτων στην ανάπτυξη φλεγμονωδών καταστάσεων με την κινητοποίηση προφλεγμονωδών και χημειοτακτικών παραγόντων.

Τίθεται όμως το εξής ερώτημα:

Αφού εφαρμόζονται όλες αυτές οι παρεμβάσεις, γιατί παραμένει μικρό το ποσοστό των θεραπευομένων που επανεισέρχονται στον κοινωνικό ιστό και συνεχίζονται οι υποτροπές ακόμη και κατά τη διάρκεια της θεραπευτικής αντιμετώπισης;

Παρόλο που έχουν κατανοηθεί οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη θεραπευτική αντιμετώπιση, δεν έχει επαρκώς μελετηθεί η επίδραση των υποκαταστάτων στη κινητοποίηση μηχανισμών πρόκλησης νευροβιολογικών αλλαγών μέσω της εμφάνισης οξειδωτικού stress.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μέτρηση δεικτών οξειδωτικού stress στο αίμα χρηστών ηρωΐνης ενταγμένους σε προγράμματα υποκατάστασης υπό μεθαδόνη και βουπρενορφίνη.

Επιμέρους στόχοι της μελέτης αποτελούν τα κάτωθι:

- Προσδιορισμός της βιολογικής απόκρισης μέσω της μέτρησης δεικτών οξειδωτικού stress (προσδιορισμός ανηγμένης γλουταθειόνης – GSH, προσδιορισμός καταλάσης – CAT, προσδιορισμός Ολικής Αντιοξειδωτικής ικανότητας – TAC, προσδιορισμός ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ – TBARS και προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων - CARB).
- Σύγκριση των δύο παρεχόμενων στον ελλαδικό χώρο υποκατάστατων ως προς την επίδραση τους στους οξειδωτικούς δείκτες.



## Κεφάλαιο 5 : Μεθοδολογία

Η μελέτη είναι τυχαιοποιημένη περιγραφική συσχέτισης με ομάδα ελέγχου. Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελείται από θεραπευόμενους ασθενείς οπιοειδών ενταγμένους σε πρόγραμμα υποκατάστασης του ΟΚΑΝΑ με μεθαδόνη και βουπρενορφίνη επιλεγμένους με τυχαίο τρόπο, με βάση τον μοναδικό για κάθε ασθενή αριθμό πρωτοκόλλου κατά την αίτηση εισαγωγής του στα προγράμματα του Οργανισμού. Όλοι οι θεραπευόμενοι είχαν άμεση επικοινωνία με τον ερευνητή για την ενημέρωση σχετικά με το σκοπό και τους στόχους της μελέτης καθώς και πλήρης αναφορά όλων των απαραίτητων πληροφοριών και ασφαλιστικών δικλείδων για την εξασφάλιση του απορρήτου των στοιχείων και των δεδομένων. Επιπλέον, κάθε θεραπευόμενος και ο ερευνητής υπέγραψαν το έντυπο συναίνεσης της μελέτης.

### 5.1. Κριτήρια επιλογής του δείγματος

Τα κριτήρια επιλογής του δείγματος στην ομάδα μελέτης είναι ίδια με τα κριτήρια εισαγωγής στα προγράμματα υποκατάστασης του Ο.ΚΑ.ΝΑ. (ΟΚΑΝΑ 2011, Υ5γ/Γ.Π.οικ.100847 - ΦΕΚ 1343/ Β'/2002).

Οι προϋποθέσεις για την ένταξη εξαρτημένων ατόμων σε πρόγραμμα υποκατάστασης είναι οι εξής:

- Ο εξαρτημένος να είναι άνω των 20 ετών
- Να κάνει μακροχρόνια ενδοφλέβια χρήση ηρωίνης ή άλλου οπιοειδούς
- Η χρήση να έχει προκαλέσει σωματική και ψυχική εξάρτηση
- Για άτομα που δεν έχουν συμπληρώσει το 35ο έτος ηλικίας να υπάρχει αποτυχία σοβαρής προσπάθειας απεξάρτησης σε άλλο εγκεκριμένο από το

Υπουργείο Υγείας και Κοινωνικής Αλληλεγγύης πρόγραμμα που αποδεικνύεται με βεβαίωση που χορηγείται αρμοδίως από αυτό

- Ο χρήστης να αποδεχθεί εγγράφως τους όρους του θεραπευτικού συμβολαίου, η παραβίαση των οποίων επιφέρει κυρώσεις κατά την κρίση της θεραπευτικής ομάδας του προγράμματος υποκατάστασης,
- Ο εξαρτημένος να μην παρουσιάζει βαριά ψυχοπαθολογία η οποία καθιστά ασύμβατη την παρακολούθηση του προγράμματος.
- Σε άτομα ηλικίας κάτω των 35 ετών, να υπάρχει αποτυχία σοβαρής προσπάθειας απεξάρτησης σε άλλο εγκεκριμένο πρόγραμμα του Υπουργείου Υγείας,
- Η χρήση να έχει προκαλέσει σοβαρή σωματική και ψυχική εξάρτηση.

## 5.2. Εργαλεία μελέτης

Για τη διενέργεια της έρευνας ελήφθησαν τα εξής:

- **Δημογραφικά δεδομένα:** Φύλο, ηλικία, εκπαιδευτικό επίπεδο, εθνικότητα, ασφαλιστικός φορέας, κοινωνική κατάσταση, τόπος κατοικίας, περιοχή, χρονικό διάστημα στα προγράμματα του OKANA, ηλικία έναρξης ουσιών, χρονική διάρκεια χρήσης ουσιών (πριν την εισαγωγή).
- **Μέτρηση δεικτών οξειδωτικού stress:** Ελήφθησαν δείγματα αίματος για τον προσδιορισμό των εξής παραγόντων:
  - GSH
  - CAT
  - TAC
  - TBARS και
  - Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Προκειμένου για την αιμοληψία, χρησιμοποιήθηκαν ειδικές πεταλούδες ασφαλείας με το σύστημα κενού Vacutainer με διάμετρο βελόνας 24-26G, φιαλίδια συλλογής αίματος χωρίς αντιπηκτικό και κυτία ασφαλείας για την απόρριψη αιχμηρών αντικειμένων. Επιπλέον για την απόρριψη υγειονομικού υλικού (επιθέματα απολύμανσης και αιματηρά επιθέματα) χρησιμοποιήθηκαν χάρτινα κυτία με την ειδική επισήμανση «Μολυσματικό – Βιολογικό Υλικό».

### **5.3. Σχεδιασμός της μελέτης**

Ο πληθυσμός αποτελούνταν από δύο (2) ομάδες – ομάδα ελέγχου (υγιείς) (N=29) και ομάδα μελέτης (N=22). Η ομάδα μελέτης περιελάμβανε θεραπευόμενους υπό υποκατάσταση (μεθαδόνη και βουπρενορφίνη) με την προϋπόθεση να ήταν σταθεροποιημένοι στις δοσολογίες τους. Η ομάδα ελέγχου περιελάμβανε άτομα που δεν είχαν έρθει σε επαφή με εξαρτησιογόνες ουσίες και συγκεκριμένα οπιοειδή.

#### **Χώρος διεξαγωγής της μελέτης**

Η πραγματοποίηση των αιμοληψιών διεξήχθη σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο για τη συλλογή των δειγμάτων αίματος. Ο χώρος περιελάμβανε έναν κυρίως χώρο με τον απαραίτητο εξοπλισμό για τις αιμοληψίες.

#### **Διαδικασία αιμοληψίας**

Σε κάθε ασθενή γινόταν λήψη 8ml αίματος από σημείο που ήταν προσβάσιμο, χωρίς θρομβώσεις, ουλές, σκληρίες, τραύματα, οιδήματα. Το επιλεγμένο σημείο απολυμαινόταν προηγουμένως με αιθυλική αλκοόλη. Τα δείγματα εισάγονταν σε φιαλίδια με αντιπηκτικό και εν συνεχεία εκτελούνταν φυγοκέντριση για την απομόνωση του πλάσματος από τα υπόλοιπα συστατικά του αίματος. Το

ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και της καταλάσης και το πλάσμα για τον προσδιορισμό των TBARS, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

#### Περιγραφή Μεθόδου

1. Το αίμα συλλέχθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες με EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ). Το αντιπηκτικό EDTA δεσμεύει τα άλατα του ασβεστίου στο αίμα με χηλίωση (αποσιδήρωση), έτσι ώστε να διατηρηθούν τα κύτταρα.

2. Τοποθετούμε τα σωληνάρια συλλογής αίματος στη φυγόκεντρο και φυγοκεντρούμε στα 1.370 g, για 10 λεπτά, στους 4 °C.

3. Συλλέγουμε το υπερκείμενο (πλάσμα) και το χωρίζουμε σε φιαλίδια erpendorf, ανάλογα με τις μετρήσεις που θα γίνουν.

3. Προσθέτουμε απιονισμένο νερό (1:1 v/v) στα ερυθροκύτταρα, τα οποία μετά τη φυγοκέντρηση βρίσκονται στο κάτω μέρος του falcon.

4. Ανακινούμε βίαια και φυγοκεντρούμε στα 4.020 g, για 15 λεπτά, στους 4 °C.

5. Συλλέγουμε το υπερκείμενο, που είναι το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα, που θα χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της δραστηριότητας της καταλάσης. Οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων μένουν ως ίζημα πολύ μικρού όγκου (10-20 μL).

6. Ένα μέρος του αιμολύματος (500μl) επεξεργάστηκε με 5% τριχλωροξικό οξύ (TCA 1:1 v/v) σε erpendorf και ανακινούμε στο vortex.

7. Φυγοκεντρούμε στα 20.000 g για 5 min στους 5 °C.

8. Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε erpendorf και προσθέτουμε 5% TCA με την εξής αναλογία: 300 μL αιμολύματος / 90 μL 5% TCA και ανακινούμε στο vortex.

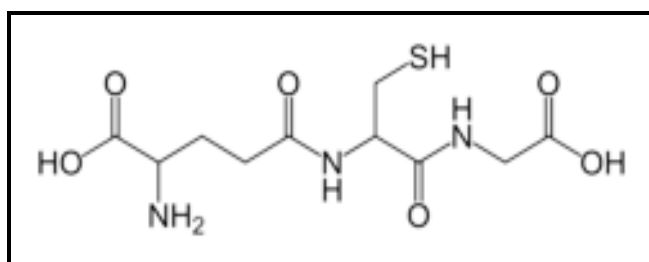
9. Φυγοκεντρούμε στα 20.000 g για 5 min στους 5 °C.

10. Μεταφέρουμε το καθαρό υπερκείμενο σε eppendorfs, τα οποία αποθηκεύονται στον καταψύκτη και θα χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση της γλουταθειόνης.

## 5.4. Μετρήσεις δεικτών οξειδωτικού stress

### 5.4.1. Προσδιορισμός Ανηγμένης Γλουταθειόνης (GSH)

Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλοκυστείνογλυκίνη) είναι η πιο άφθονη θειόλη (SH) στους ιστούς των ζώων και του ανθρώπου, με ενδοκυτταρική συγκέντρωση 1-15 mM (Battin et al. 2009). Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη. Οι αναγωγικές (αντιοξειδωτικές) της ιδιότητες παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια, όπως και στο αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων. Η γλουταθειόνη απαντάται κυρίως στην ανηγμένη (GSH) και λιγότερο στην οξειδωμένη της μορφή (δισουλφίδιο της γλουταθειόνης, GSSG), με την τελευταία (GSSG) να αποτελεί το 10% της GSH. Η GSH χρησιμοποιείται ως δείκτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Pastore et al. 2003).



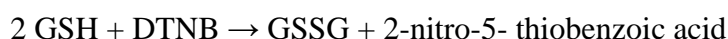
Εικόνα 2: Συντακτικός τύπος της Γλουταθειόνης

Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση (Battin et al. 2009). Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των

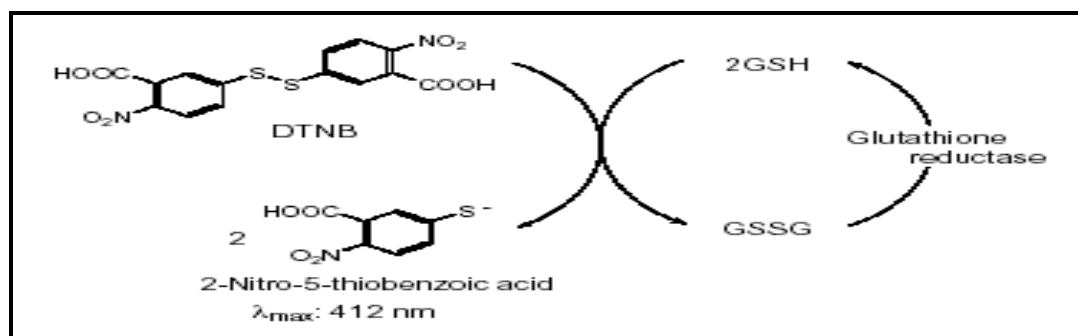
αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών. Είναι, επίσης, ζωτική η συμμετοχή της στην απομάκρυνση των ξενοβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό, στην απομάκρυνση των υπεροξειδίων και των ελεύθερων ριζών αλλά και στη μεταφορά των αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών (Sengupta et al. 2004).

### Αρχή της μεθόδου

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειόδυο νιτρο-βενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετρείται σε ομογενοποιημένο ιστό. Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που απορροφάει στα 412 nm (Reddy et.al., 2004).



Η GSH παράγεται από τη GSSG μέσω της δράσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης.



**Εικόνα 3:** Ανακύκλωση Και Αρχή Προσδιορισμού της Γλουταθειόνης.

### Αντιδραστήρια

• **Phosphate buffer** 67 mM (pH 7.95). MB (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): 136 MB (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>): 178. Για να δημιουργήσουμε 500 mL από το phosphate buffer φτιάχνουμε 25 mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (67 mM) και 500 mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (67 mM). Για το KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ζυγίζουμε 0.227 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ζυγίζουμε 5.94 g και τα

διαλύουμε σε 475 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα. Διορθώνουμε με NaOH or HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.95.

• **DTNB** (1mM) σε 1% κιτρικό νάτριο (sodium citrate) σε νερό. (39.6 mg DTNB σε 100 ml του 1% διαλύματος του κιτρικού νατρίου, για να δώσει μία συγκέντρωση του 1 mM). DTNB [5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)], MB:396.35

• **Κιτρικό Νάτριο**. ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ , διένυδρο τρινάτριο, tri-sodium dihydrate), MB: 294.10. Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH.

Πειραματικό πρωτόκολλο.

100μl ερυθροκυτταρικού αιμολύματος προστέθηκαν σε 100μl TCA 5% και φυγοκεντρήθηκαν στα 21.000g για 5 min στους 5 °C. Το υπερκείμενο συλλέχτηκε και διατηρήθηκε σε φιαλίδιο erpendorf. 20 μl αραιωμένου ½ αναμίχθηκαν με 660 μl ρυθμιστικού δ/τος 67mM (pH 8.0) και 330μl DTNB. Για το αίμα 500μl αιμολύματος προστέθηκαν σε 500μl TCA 5% και φυγοκεντρήθηκαν στα 21.000g για 5 min στους 5 °C. Στη συνέχεια 300μl του υπερκειμένου προστέθηκαν σε 90μl TCA 5% και φυγοκεντρήθηκαν στα 21.000g για 5 min στους 5 °C. Το υπερκείμενο συλλέχτηκε και διατηρήθηκε σε ένα φιαλίδιο erpendorf. 20 μl αναμίχθηκαν με 660 μl ρυθμιστικού δ/τος 67mM (pH 8.0) και 330μl DTNB.

Προσθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε φιαλίδια erpendorf:

	<b>Blank</b>	<b>Sample</b>
<b>Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95</b>	<b>660 μL</b>	<b>660 μL</b>
<b>DTNB 1 mM</b>	<b>330 μL</b>	<b>330 μL</b>
<b>Απεσταγμένο νερό</b>	<b>20 μL</b>	-
<b>Ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα</b>	-	<b>20 μL</b>

**Πίνακας 1:** Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για τη μέτρηση της GSH

Αναδεύουμε τα erpendorfs και τα επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Η διατήρησή τους στο σκοτάδι έχει ως στόχο την

πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταξύ του DTNB και της GSH. Μεταφέρουμε το περιεχόμενό τους σε μια πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 412 nm. (Beers and Sizer, 1952)

Δραστικότητα της GSH (mmol/L) = (Absδείγματος – ΔAbsτυφλού / 13.6) x 262.6, όπου το 262.6 είναι ο συντελεστής αραίωσης, ο οποίος προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του αιμολύματος (20 μL) (1010 / 20 = 50.5), πολλαπλασιάζοντας με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραίωση που έγινε για τη λύση των ερυθροκυττάρων και με 2 x 1.3 για να συνυπολογίσουμε την πρώτη (500 μL αιμολ. / 500 μL 5% TCA) και τη δεύτερη αραίωση (390 μL / 300 μL) που έγιναν από το TCA 5%. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSH εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση της GSH που υπολογίστηκε προηγουμένως (mmol/L). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10 x 2, τη μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραίωση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων. Έτσι λαμβάνουμε τη συγκέντρωση της GSH ανά γραμμάριο αιμοσφαιρίνης. GSH (mmol/ g Hb).

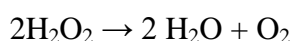
#### 5.4.2. Προσδιορισμός Καταλάσης

##### Αρχή της μεθόδου

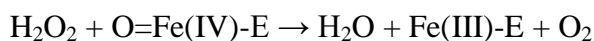
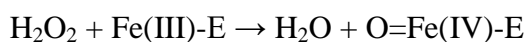
Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο, το οποίο απαντάται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Το υπεροξειδίο του



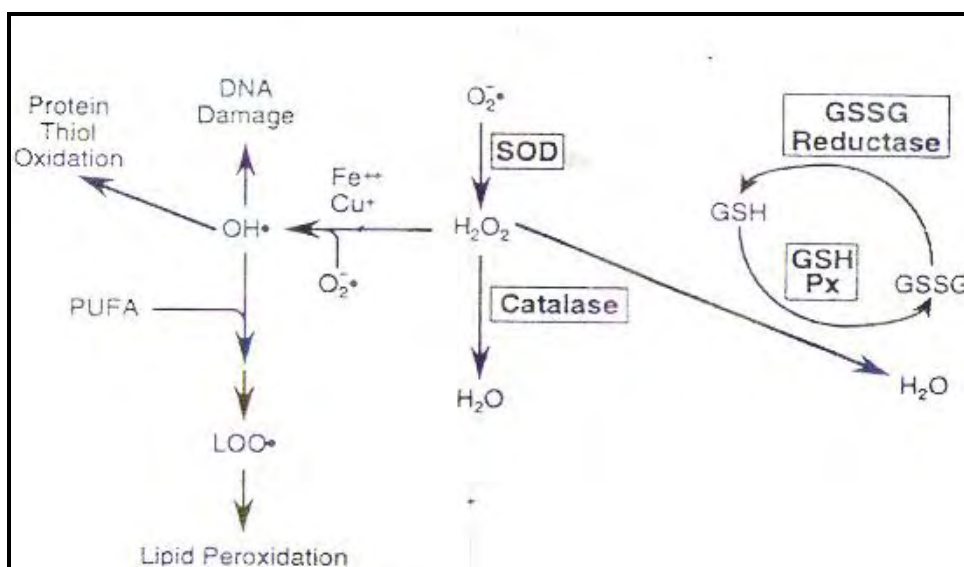
υδρογόνου διαμορφώνεται ως προϊόν μεταβολισμού σε πολλούς οργανισμούς. Είναι τοξικό και πρέπει να μετατραπεί γρήγορα σε άλλο, λιγότερο επικίνδυνη χημική ουσία. Για να διαχειριστεί αυτό το πρόβλημα, η ενζυμική καταλάση χρησιμοποιείται συχνά για να καταλύσει γρήγορα την αποσύνθεση του υπεροξειδίου υδρογόνου σε αβλαβή οξυγόνο και νερό (Chelikani et al. 2004). Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια  $H_2O_2$  το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται στα υπεροξεισώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τεραμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων (Boon et. al., 2007). Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το  $H_2O_2$ . Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του  $H_2O_2$  από την καταλάση είναι η ακόλουθη:



Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:

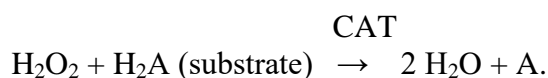


(Όπου το σύμπλοκο Fe-E αντιπροσωπεύει το κέντρο με το σίδηρο της ομάδας της αίμης που είναι προσδεσμένη στο ένζυμο).



Εικόνα 4: Μονοπάτι Αναγωγής Του  $H_2O_2$  Σε  $H_2O$

Επίσης, η καταλάση μπορεί να χρησιμοποιήσει το  $H_2O_2$  για την απομάκρυνση τοξικών ουσιών ( $H_2A$ ) με τη χρησιμοποίηση υποστρώματος (αιθανόλη), σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της καταλάσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Aebi et al (1984).

#### Αντιδραστήρια

- **Phosphate buffer 67mM (pH 7.4)** MB ( $KH_2PO_4$ ): 136 και MB ( $Na_2HPO_4$ ): 178. Για να παρασκευάσουμε 500 mL του phosphate buffer ξεκινάμε πρώτα με 100 mL  $KH_2PO_4$  (67 mM) και 400 mL  $Na_2HPO_4$  (67 mM). Για το  $KH_2PO_4$  ζυγίζουμε 0.91 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερού. Για το  $Na_2HPO_4$  ζυγίζουμε 4.77 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Αν χρειαστεί προσθέτουμε NaOH ή HCl 1 N, ώστε το pH του παραγόμενου διαλύματος να είναι 7.4.
- **30% υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ )**. Το διάλυμα  $H_2O_2$  είναι έτοιμο προς χρήση.

#### Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

	<b>Δείγμα</b>
<b>Phosphate buffer 67 mM, pH 7.4</b>	<b>2.991 <math>\mu</math>L</b>
<b>Αιμόλυμα</b>	<b>4 <math>\mu</math>L</b>

**Πίνακας 2:** Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της καταλάσης.

Αναδεύουμε στο vortex και επωάζουμε στον κλίβανο στους 37 °C για 10 λεπτά.

Είναι πιο πρακτικό να επωάζουμε 2 δείγματα κάθε φορά ώστε να είμαστε σίγουροι

ότι τα δείγματα φωτομετρούνται αμέσως μετά την επώαση. Κατόπιν, μεταφέρουμε το περιεχόμενο του πλαστικού κυλίνδρου σε μία κυψελίδα για μέτρηση στο υπεριώδες (UV). Τέλος, προσθέτουμε 5  $\mu\text{L}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  στην κυψελίδα, την ανακινούμε τρεις φορές χρησιμοποιώντας παραφίλμ στην κορυφή της και μετράμε την απορρόφηση στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα.

### Υπολογισμοί

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mg Hb) =  $(\Delta\text{Abs}_{\text{sample}} \text{ per min} / 40) \times (750 \times 1.000 \times 10 \times 2) / \text{Conc. Hb (mg/mL)}$ .

Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του  $\text{H}_2\text{O}_2$  πολλαπλασιαζόμενος με 1.000 για τη μετατροπή του σε  $\mu\text{mol/mL}$ . Το 750 είναι ο παράγοντας αραιώσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3.000  $\mu\text{L}$ ) με τον όγκο του αιμολύματος (4  $\mu\text{L}$ ) ( $3.000 / 4 = 750$ ), το 10 προκύπτει από την 1:10 αραιώση του δείγματος και το 2 από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων.

Ο υπολογισμός της δραστικότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L. Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με  $10 \times 2$ , την μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραιώση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων.

$\Delta \text{ Abs (min)}$  = η μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  στην κυψελίδα είναι περίπου 16 mM.

$U = \mu\text{mol/min}$ .  $\Delta\text{Abs}_{\text{blank}}$  είναι πάντοτε μηδέν και έτσι δεν απαιτείται μέτρηση του τυφλού.

### 5.4.3. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (total antioxidant capacity – TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του πλάσματος του αίματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό του πλάσματος έχει αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού.

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης της ποσοτικοποίησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος. Ο πρώτος είναι το άθροισμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε συστατικού του πλάσματος ξεχωριστά. Αυτός είναι ο πιο επίπονος τρόπος επειδή υπάρχουν πολλά μόρια που συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. Ο δεύτερος τρόπος είναι η μέτρηση της TAC ως σύνολο.

#### Αρχή της μεθόδου

Η TAC του πλάσματος στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία ενός δότη υδρογόνων που υπάρχει στον ορό, η παραπάνω ρίζα (DPPH<sup>•</sup>) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Ο προσδιορισμός της TAC βασίστηκε στη μέθοδο των Janaszweska και Bartosz (2002). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm.

#### Αντιδραστήρια

- **Phosphate buffer 10 mM (pH 7.4).** MB (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): 136 και MB (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>): 178. Για να φτιάξουμε 500 mL του phosphate buffer φτιάχνουμε 100 mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10 mM) και 400 mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10 mM). Για το KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ζυγίζουμε 0.136 g

και τα διαλύουμε σε 100 mL νερό. Για το  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ζυγίζουμε 0.712 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερό. Σε ένα ποτήρι ζέσεως χύνουμε τα διαλύματα και προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.4.

- **DPPH 0.1 mM.** MB: 394.32. Διαλύουμε 0.02 g DPPH σε 5 mL μεθανόλης και τα αναμιγνύουμε με μαγνητάκι (10 mM). Μετά αραιώνουμε 100 φορές με μεθανόλη και τα αναμιγνύουμε ξανά με μαγνητάκι. Για παράδειγμα, αραιώνουμε 200  $\mu\text{L}$  του 10 mM διαλύματος του DPPH σε 19.8 mL μεθανόλης (ποσό αρκετό για 10 δείγματα, συν το τυφλό και τον θετικό έλεγχο). Εξαιτίας της αραιώσης, ο αρχικός όγκος των 5 mL είναι πάντα αρκετός για πολλούς προσδιορισμούς. Καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο το ποτήρι ζέσεως, στο οποίο φτιάχνουμε το DPPH για να αποφύγουμε τη φωτόλυση. Το συγκεκριμένο διάλυμα φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος.

- **Ασκορβικό οξύ 10 mM.** Είναι έτοιμο προς χρήση.

Φυσιολογικά, η τιμή της απορρόφησης για το δείγμα που περιέχει το ασκορβικό οξύ (Positive Control) θα πρέπει να είναι χαμηλότερη και από την τιμή των δειγμάτων αλλά και του τυφλού. Ο λόγος είναι η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος (ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο) που έχουμε επιλέξει. Η τιμή της απορρόφησης των δειγμάτων, θα πρέπει να βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές του τυφλού (η μεγαλύτερη τιμή) και του θετικού ελέγχου (η μικρότερη τιμή).

Πειραματικό πρωτόκολλο.

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

	<b>Blank</b>	<b>Θετικός control</b>	<b>Δείγμα</b>
<b>Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4</b>	<b>500 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>495 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>480 <math>\mu\text{L}</math></b>
<b>DPPH 0.1 mM</b>	<b>500 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>500 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>500 <math>\mu\text{L}</math></b>
<b>Ασκορβικό Οξύ 10 mM</b>	-	<b>5 <math>\mu\text{L}</math></b>	-
<b>Πλάσμα</b>	-	-	<b>20<math>\mu\text{L}</math></b>

**Πίνακας 3:** Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για τη μέτρηση της TAC.

Ανακινούμε τα Eppendorfs μερικές φορές και τα επωάζουμε στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης οι αντιοξειδωτικές ουσίες του ιστού εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH μετατρέποντάς τη στην πιο σταθερή ένωση υδραζίνη. Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στα 20.000 g στους 25 °C (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση). Μεταφέρουμε 900 mL από το υπερκείμενο με πιπέτα σε πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 520 nm. Επειδή είναι πιθανό η απορρόφηση του τυφλού να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, είναι σκόπιμη η επανάληψη της μέτρησης του τυφλού κάθε 5 περίπου δείγματα.

#### Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

i) % μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό, πχ,

$$\% \text{ Abs μείωση} = (\text{Abs τυφλού} - \text{Abs δείγματος}) / \text{Abs τυφλού} \times 100$$

ii)  $\mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{mL πλάσματος} = [(\% \text{ Abs μείωση} / 100) \times 50 \times 50] / 1000.$

α) Διαιρούμε με το 100 με σκοπό να μετατρέψουμε την ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης σε απλή μείωση της απορρόφησης.

β) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50  $\mu\text{mol/L}$  της κυψελίδας.

γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η αραιώση του πλάσματος στην κυψελίδα είναι 50-πλάσια (1.000  $\mu\text{L}$  στην κυψελίδα / 20  $\mu\text{L}$  πλάσματος του δείγματος στην κυψελίδα = 50).

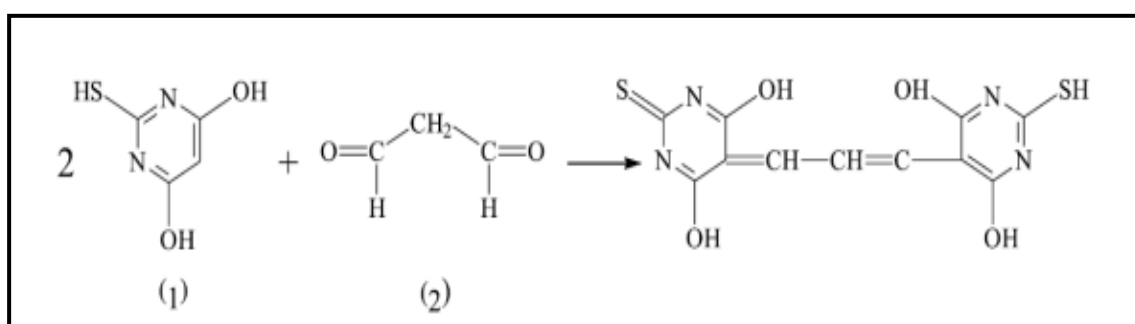
δ) Διαιρούμε με το 1.000 για να μετατρέψουμε τα L σε mL.

Η διόρθωση με βάση την ολική πρωτεΐνη έγινε σύμφωνα με τον ακόλουθο τρόπο: mmol DPPH/L.

#### 5.4.4. Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

##### Αρχή της μεθόδου.

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άκρων ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μαλονδιαλδεΐδη. Η μαλονδιαλδεΐδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Έτσι, τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μαλονδιαλδεΐδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία μαλονδιαλδεΐδης προς θειοβαρβιτουρικό οξύ 1/2. Η μέτρηση της μαλονδιαλδεΐδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξείδωσης των λιπιδίων.



Εικόνα 5: Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), Που Οδηγεί Στην Παραγωγή Του Μορίου TBA-MDA.

Για τον προσδιορισμό των TBARS χρησιμοποιήθηκε μια ελαφρά τροποποιημένη μέθοδος του Keles et al. (2001). Πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία ρυθμίζουμε το υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 95 °C.

##### Αντιδραστήρια

• **Tris-HCl 200 mM (pH 7.4).** MB (Tris): 121.14. MB (HCl): 36.46 (stock 37%) [10.1 N]. Για να παρασκευάσουμε ≈100 mL του Tris-HCl buffer φτιάχνουμε 25 mL Tris (200 mM) και 42 mL HCl (0.1 N). Για το Tris ζυγίζουμε 0.61 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το HCl διαλύουμε 0.42 mL του stock 37% HCl (10.1

N) σε 42 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως ρίχνουμε τα 25 mL από το Tris και προσθέτουμε αργά τα 42 mL του HCl και μετά προσθέτουμε νερό ως τα 100 mL. Ελέγχουμε το pH αν είναι στο 7.4.

Το Tris είναι συντομογραφία του τρισυδροξυμεθυλαμινομεθάνιου (trishydroxy-methylaminomethane). Το Tris είναι κατάλληλο για τη δημιουργία ρυθμιστικών διαλυμάτων με pH από 6,5 μέχρι 9,7.

- **Διάλυμα Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 M) – TBA (55 mM).** MB (TBA): 144.1 και MB (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>): 142.04. Για την παρασκευή 10 mL διαλύματος, ζυγίζουμε 2.84 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και 0.08 g θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Τα μεταφέρουμε σε ένα ποτήρι ζέσεως και προσθέτουμε 10 mL νερού. Θερμαίνουμε και ανακατεύουμε με το μαγνητάκι μέχρι να διαλυθούν τα συστατικά πλήρως. Το συγκεκριμένο διάλυμα πρέπει να φτιάχνεται πάντοτε την ημέρα του πειράματος.

- **TCA 35%:** Ζυγίζουμε 35 g TCA και τα διαλύουμε σε αποσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 100 mL νερού (σε θερμοκρασία δωματίου).

- **TCA 70%:** Ζυγίζουμε 70 g TCA και τα διαλύουμε σε αποσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 100 mL νερού (σε θερμοκρασία δωματίου).

Πειραματικό Πρωτόκολλο.

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μL πλάσματος ή απεσταγμένο νερό (για το τυφλό). Προσθέτουμε 500 μL TCA 35% και 500 μL Tris-HCl και αναδεύουμε. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 1 mL Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – TBA και επωάζουμε στους 95 °C για 45 min στο υδατόλουτρο. Κατόπιν, μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min. Προσθέτουμε 1 mL TCA 70% και αναδεύουμε. Μεταφέρουμε 1 mL σε eppendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11.200 g (10.000 rpm) στους 25 °C για 3 min. Τέλος, μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.



### Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS (nmol/mg total protein) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0.156 x 31 x 2 ή 3 x 3, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραιώσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3.100 µL) με τον όγκο του πλάσματος (100 µL) (3.100 / 100 = 31). Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης\* της MDA που είναι 156 (mol/L) διαιρούμενου με 10<sup>-6</sup> με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L σε µmol/L. Πολλαπλασιάζουμε με 3 επειδή το δείγμα αραιώνεται 3 φορές κατά τη μέτρηση.

\* Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

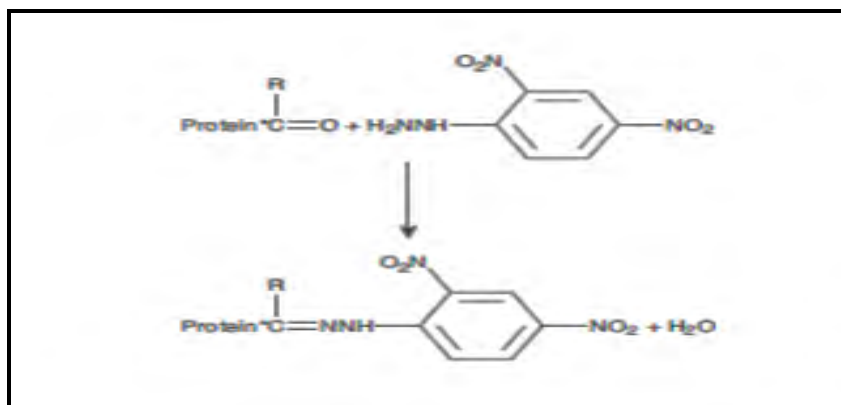
### **5.4.5. Πρωτεϊνικά καρβονύλια**

#### Αρχή της μεθόδου

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε βλάβες προκαλούμενες από τις ελεύθερες ρίζες. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας δείκτης της οξειδωσης των πρωτεϊνών και χρησιμοποιείται ευρέως. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεΐδες και κετόνες) που αποτελούνται από ένα άτομο άνθρακα σε διπλό δεσμό με ένα άτομο οξυγόνου -C = O, ως συνήθως αποτελούν μέρος σε άλλες μεγαλύτερες λειτουργικές ομάδες. Παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης (Pro), της αργινίνης (Arg), της λυσίνης (Lys) και της θρεονίνης (Thr). Είναι ένας αξιόπιστος δείκτης οξειδωσης των πρωτεϊνών καθώς τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια.

Οι πρωτεΐνες που καρβονυλιώνονται υφίστανται μη αναστρέψιμες βλάβες καθώς εκτρέπονται από τη φυσιολογική τους λειτουργία. Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες σε μέτριο βαθμό, διασπώνται από το πρωτεόσωμα αλλά αν υποστούν πολύ

δριμείες βλάβες τότε δεν μπορούν να διασπαστούν και συγκεντρώνονται σε συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους.



Εικόνα 6: Σύνδεση πρωτεΐνης με την DNP (δίνιτροφαινυλδραζίνη) και σχηματισμός του δίνιτροφαινυλδραζονίου.

Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών όχι μόνο επηρεάζει τη δική τους λειτουργία αλλά και τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν και άλλα βιομόρια. Για παράδειγμα, αν υποστούν καρβονυλίωση ένζυμα όπως εκείνα που επισκευάζουν το DNA ή οι DNA πολυμεράσες, το DNA δε θα επιδιορθώνεται ούτε θα αντιγράφεται με την απαραίτητη πιστότητα. Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNP (2,4-δίνιτροφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του 2,4-δίνιτροφαινυλδραζονίου. Ο προσδιορισμός των καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο Patsoukis et al (2004).

#### Αντιδραστήρια

- **Διάλυμα HCl 2.5 N.** HCl: MB 36.46; stock 37% (10.1 N)

Για να παρασκευάσουμε 100 mL διαλύματος 2.5 N HCl, προσθέτουμε αργά 24.6 mL του 37% HCl (ίσο με 10.1 N HCl) σε  $\approx 70$  mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με αποσταγμένο νερό. Κατά την παρασκευή του διαλύματος του 2,5 N HCl χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή επειδή το διάλυμα του 37 % είναι πολύ καυστικό. Πάντα η παρασκευή γίνεται κάτω από τον απαγωγό και φορώντας γάντια.

- **DNPH 14 mM.** (MB: 198.1)

Για να φτιάξουμε 100 mL 14 mM DNPH διαλύουμε 0.2833 g DNPH σε 100 mL 2.5 N HCl. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται πάντα τη μέρα του πειράματος. Όταν το ετοιμάσουμε το καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο. Απαιτούνται 0.5 mL για κάθε δείγμα. Φτιάχνουμε και ένα τυφλό για κάθε δείγμα.

- **Ουρία 5 M (pH 2.3).** (MB: 60.06)

Για να φτιάξουμε 100 mL 5 M ουρίας (pH 2.3, το οποίο ρυθμίζεται με 2N HCl), διαλύουμε 30 g ουρίας in  $\approx$ 70 mL αποσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με αποσταγμένο νερό.

### Πειραματικό πρωτόκολλο

Σε 50  $\mu$ L πλάσματος προσθέτουμε 50  $\mu$ L 20% TCA σε eppendorfs και αναδεύουμε στο vortex (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του)\*. Το 20% TCA προστίθεται με σκοπό να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες του ιστού. Το TCA (τριγλωροξικό οξύ) χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοχημεία για την κατακρήμνιση μακρομορίων όπως πρωτεΐνες, DNA και RNA.

Επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C και απομακρύνουμε το υπερκείμενο. Κατόπιν, προσθέτουμε στο ίζημα (πελέτα) 0.5 mL του 14 mM DNPH (διαλυμένο σε 2.5 N HCL) για τα δείγματα ή 0.5 mL 2.5 N HCL για τα τυφλά (κάθε δείγμα έχει το δικό του τυφλό), διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα, αναδεύουμε και επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά. Μετά την πάροδο της μίας ώρας, φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.

Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1 mL από το 10% TCA, αναδεύουμε (διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα αν χρειάζεται) και φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.

Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 0.5 mL αιθανόλης και 0.5 mL οξικού αιθυλεστέρα (αναλογία μίγματος, 1:1 v/v), κάνουμε vortex και φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα πλένεται με 10% TCA και με μίγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα για να απομακρυνθεί το DNPH που δεν έχει αντιδράσει. Αυτήν την διαδικασία την επαναλαμβάνουμε άλλες δύο (2) φορές και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.

Προσθέτουμε 1 mL 5 M ουρία (pH 2.3), αναδεύουμε και επωάζουμε στους 37 °C για 15 λεπτά. Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών (διασπώντας τους ομοιοπολικούς δεσμούς) αυξάνοντας έτσι τη διαλυτότητά τους. Φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 3 λεπτά στους 4 °C. Τέλος, μεταφέρουμε με την πιπέτα 900 mL σε μία κυψελίδα και μετράμε την απορόφηση στα 375 nm.

\*(Κάθε δείγμα έχει το τυφλό του. Το τυφλό περιέχει τα πάντα εκτός από τα 0.5 mL DNPH, τα οποία αντικαθίστανται 0.5 mL HCL 2.5 N).

### Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg total prot.) =  $A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0.022 \times 1.000/50 \times 2 \text{ ή } 3 \times 2 / \text{Συγκ. Πρωτεΐνης (mg/ml)}$ . Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι  $22 \text{ mM} \times \text{cm}^{-1}$ . Το 1.000/50 είναι ο συντελεστής αραιώσεως (1.000  $\mu\text{L}$  στην κυψελίδα /50  $\mu\text{L}$  δείγματος). . Πολ/ζουμε με 2 επειδή το δείγμα αραιώνεται 2 φορές κατά τη μέτρηση, διότι προσθέτουμε TCA 20% αρχικά.

## 5.5. Στατιστική Ανάλυση

Οι μέσες τιμές (mean) και οι τυπικές αποκλίσεις (Standard Deviation=SD) χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των ποσοτικών μεταβλητών. Οι απόλυτες (N) και οι σχετικές (%) συχνότητες χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των ποιοτικών μεταβλητών. Για τη σύγκριση ποσοτικών μεταβλητών μεταξύ δυο ομάδων χρησιμοποιήθηκε το Student's t-test. Για τη σύγκριση ποσοτικών μεταβλητών μεταξύ περισσότερων από δυο ομάδων χρησιμοποιήθηκε ο παραμετρικός έλεγχος ανάλυσης διασποράς (ANOVA).

Το επίπεδο σημαντικότητας τέθηκε στο  $p < 0,05$ . Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 18.0.

## Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα

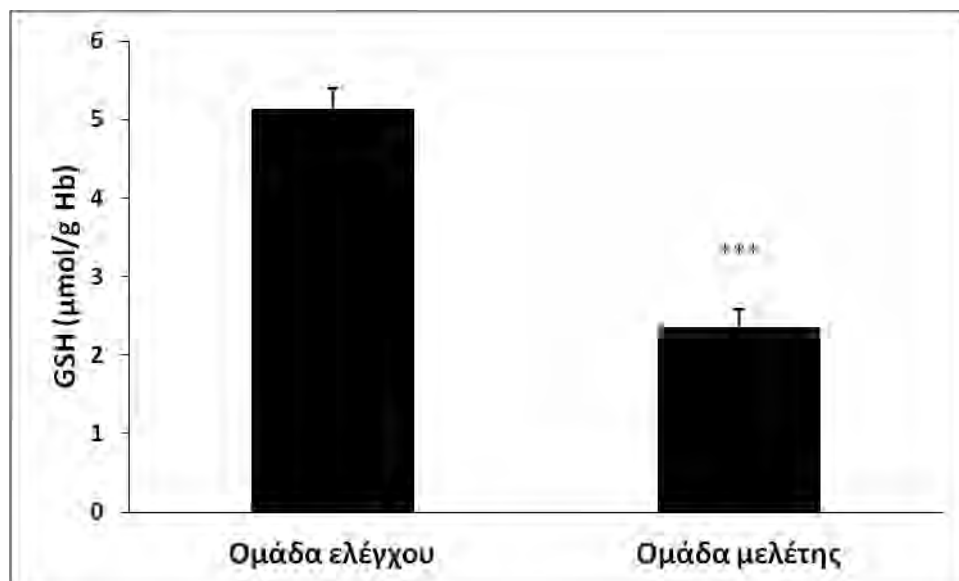
Προσεγγίστηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια 22 θεραπευόμενοι, εκ των οποίων 10 (45,45%) λάμβαναν μεθαδόνη και 12 (54,54%) βουπρενορφίνη ως υποκατάστατο. Έτσι, σχηματίστηκαν τρεις (3) ομάδες – ομάδα ελέγχου, ομάδα μεθαδόνης και ομάδα βουπρενορφίνης.

### Δημογραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος

Η πλειοψηφία των συμμετεχόντων στην ομάδα μελέτης ήταν άντρες (72,73%). 36,36% των συμμετεχόντων ήταν μεταξύ 31 και 40 ετών και ίδιο ποσοστό των συμμετεχόντων ήταν μεταξύ 41 και 50 ετών. Οι περισσότεροι από τους συμμετέχοντες ήταν απόφοιτοι γυμνασίου/λυκείου (72,72%). Οι συμμετέχοντες στην πλειοψηφία τους (54,54%) ήταν άγαμοι ανεξάρτητα με το υποκατάστατο που έπαιρναν. Η μέση διάρκεια χρήσης οπιοειδών ήταν 19,77 έτη και η μέση ηλικία έναρξης ήταν 19 ετών.

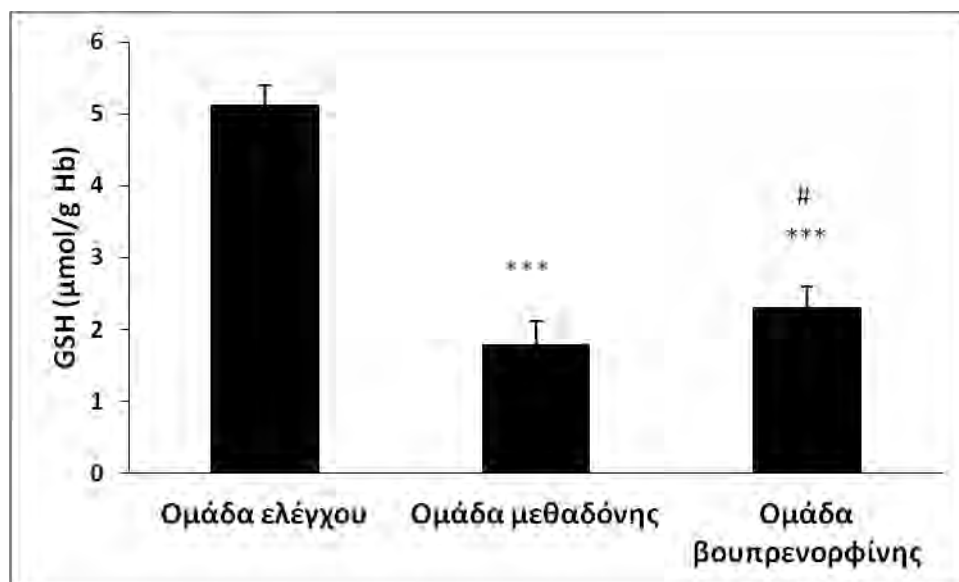
Η ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από 29 άτομα, αναλόγου μέσης ηλικίας με την ομάδα μελέτης.

## GSH



Γράφημα 3: Μέτρηση GSH \*\*\*  $p < 0,001$

Στη σύγκριση της ομάδας ελέγχου με την ομάδα μελέτης σε σχέση με την GSH, φαίνεται στατιστικά σημαντική μείωση της γλουταθειόνης κατά 54,2% στην ομάδα μελέτης.

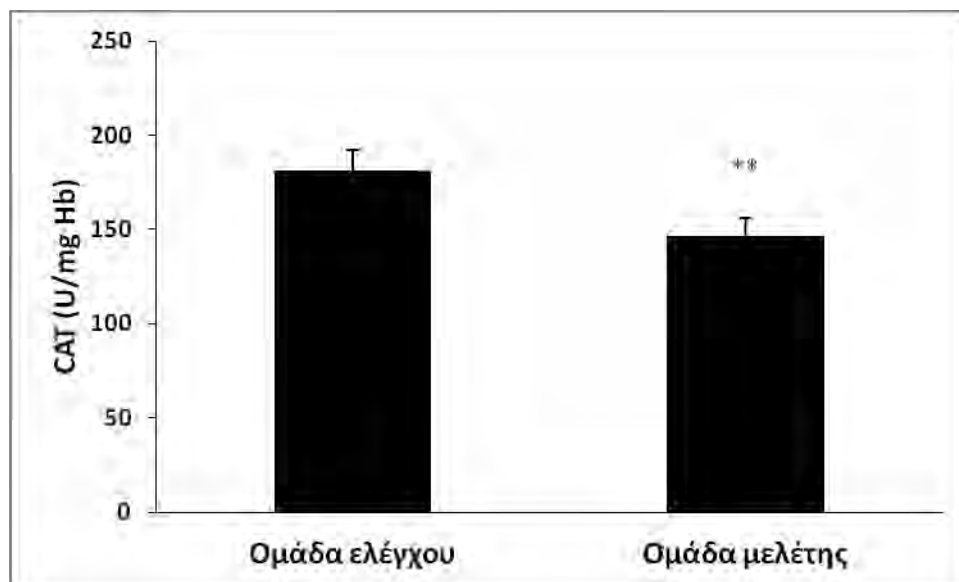


Γράφημα 4: Σύγκριση και των τριών ομάδων σε σχέση με την GSH  
\*\*\*  $p < 0,001$  \*\*\*# (Σύγκριση μεθαδόνης με βουπρενορφίνη)  $p < 0,001$

Στη σύγκριση και των τριών (3) ομάδων, φαίνεται στατιστικά σημαντική μείωση της GSH τόσο στην ομάδα της μεθαδόνης (64,91%) όσο και στην ομάδα της βουπρενορφίνης (54,93%) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, μεταξύ των δύο

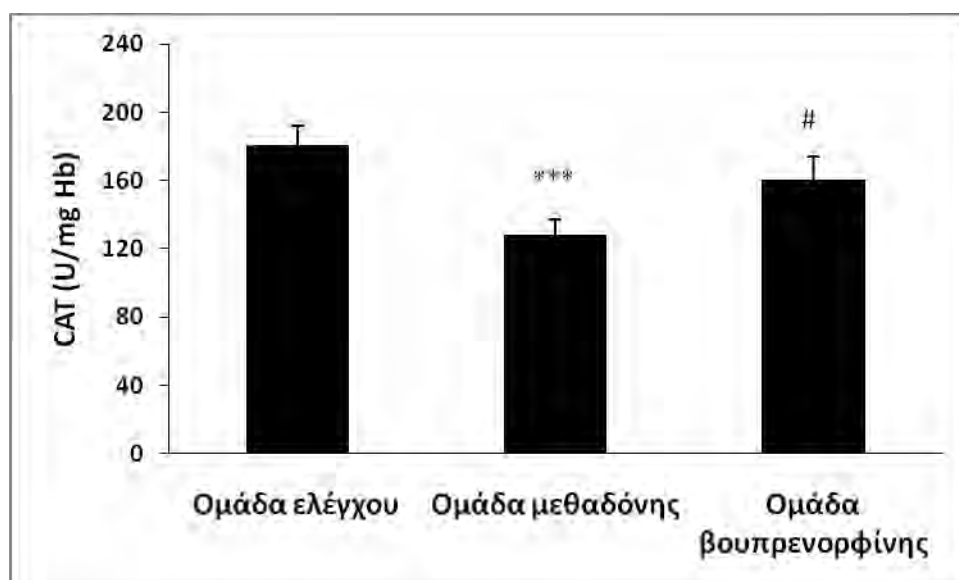
ομάδων (μεθαδόνη – βουπρενορφίνη), φαίνεται η ομάδα της μεθαδόνης να εμφανίζει στατιστικά σημαντική μείωση της GSH σε σχέση με την ομάδα της βουπρενορφίνης.

## CAT



Γράφημα 5: Μέτρηση CAT \*\*  $p < 0,01$

Στην ομάδα μελέτης φαίνεται στατιστικά σημαντική μείωση της καταλάσης κατά 19,1% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

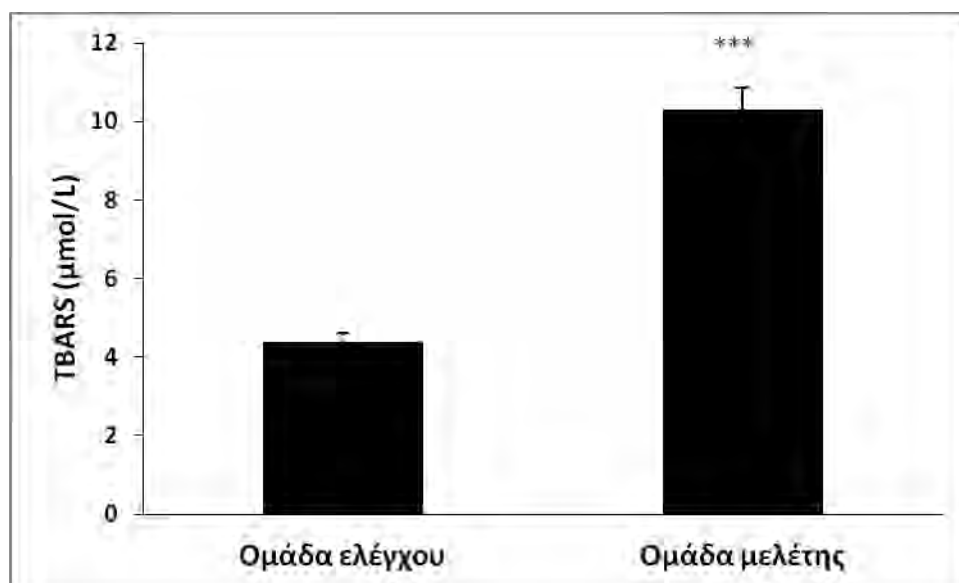


Γράφημα 6: Σύγκριση και των τριών ομάδων σε σχέση με την CAT \*\*\*  $p < 0,001$   
# (Σύγκριση μεθαδόνης με βουπρενορφίνη)



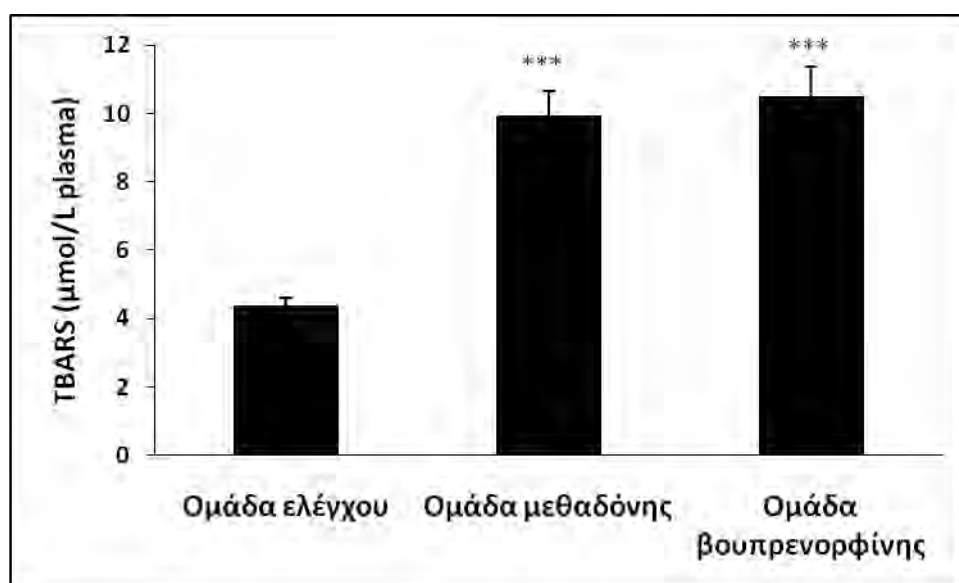
Στη σύγκριση και των τριών (3) ομάδων, φαίνεται στατιστικά σημαντική διαφορά με μείωση του ενζύμου κατά 29,23% στην ομάδα της μεθαδόνης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, μεταξύ των δύο ομάδων (μεθαδόνη – βουπρενορφίνη), δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά.

## TBARS



Γράφημα 7: Μέτρηση των TBARS \*\*\* $p < 0.001$

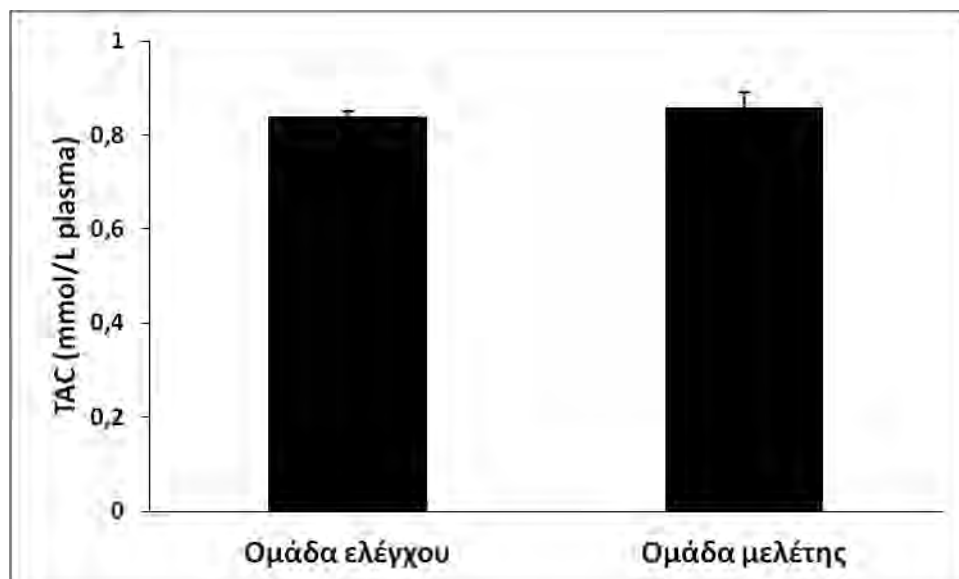
Στην ομάδα μελέτης φαίνεται στατιστικά σημαντική με διπλάσια αύξηση (134,5%) των TBARS σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.



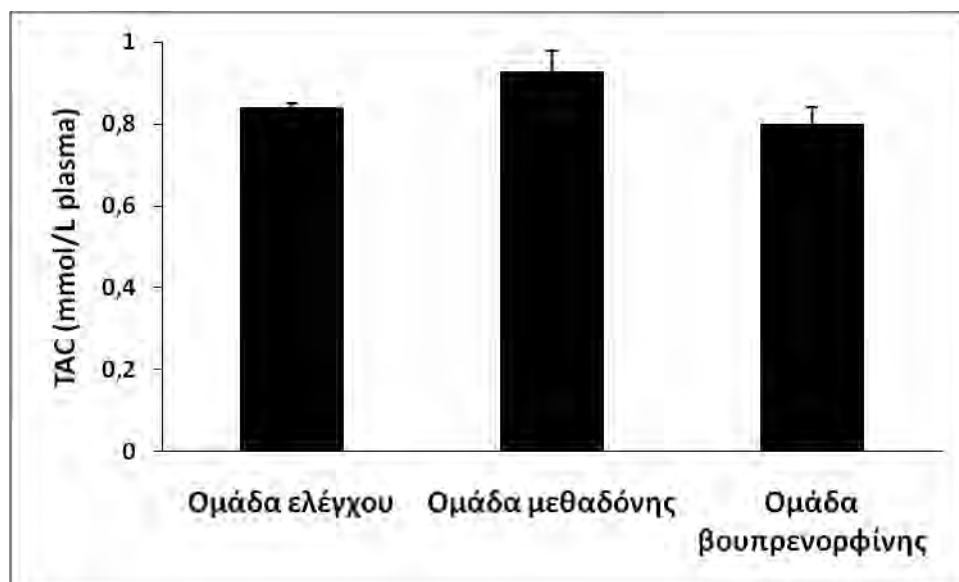
Γράφημα 8: Σύγκριση και των τριών ομάδων σε σχέση με τα TBARS \*\*\* $p < 0.001$

Στη σύγκριση και των τριών ομάδων, φαίνεται στατιστικά σημαντική αύξηση των TBARS, τόσο στην ομάδα της μεθαδόνης (125,68%) όσο και στην ομάδα της βουπρενορφίνης (139%) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

## TAC

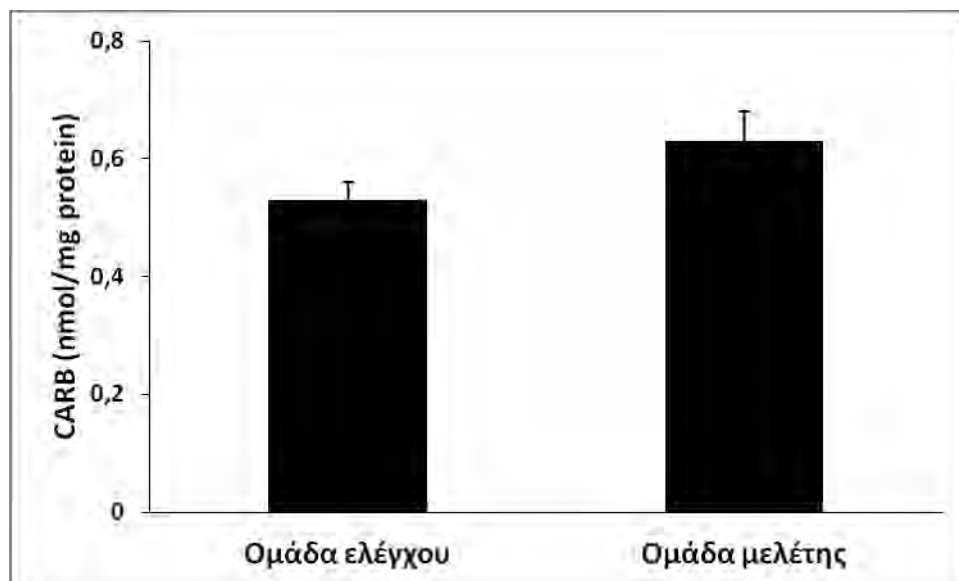


Γράφημα 9: Μέτρηση της TAC

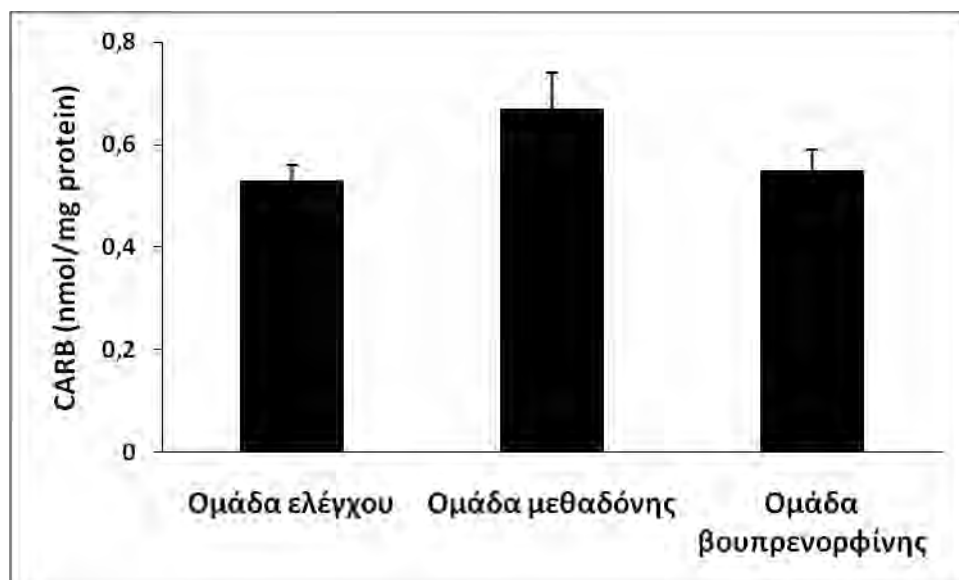


Γράφημα 10: Σύγκριση και των τριών ομάδων σε σχέση με την TAC

## CARB



Γράφημα 11: Μέτρηση των CARB



Γράφημα 12: Σύγκριση και των τριών ομάδων σε σχέση με τα CARB

Στη σύγκριση της ομάδας ελέγχου με την ομάδα μελέτης τόσο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) όσο στη μέτρηση των καρβονυλίων δεν φαίνεται στατιστικά σημαντική διαφορά. Ανάλογα αποτελέσματα έδειξαν οι συγκρίσεις και στους δύο δείκτες ανά ομάδα τόσο σε σχέση με την ομάδα ελέγχου όσο και στη μεταξύ τους συσχέτιση.

## Κεφάλαιο 7: Συζήτηση-Συμπεράσματα

Η χρήση οπιοειδών και η μετέπειτα εξάρτηση επιρεάζει όλα τα οργανικά συστήματα. Αποτελεί μία λανθάνουσα, προοδευτική και θανατηφόρα νόσο, που καταλήγει στο θάνατο. Η χρόνια χρήση οπιοειδών και ιδιαίτερα της ηρωΐνης έχει σαν αποτέλεσμα σοβαρά προβλήματα υγείας, επιδρώντας αρχικά στην εγκεφαλική λειτουργία προξενώντας βλάβη στους νευροδιαβιβαστές και εν συνεχεία επεκτείνεται σε όλα τα ζωτικά όργανα. Συμβάματα, που εμφανίζουν οι χρήστες οπιοειδών, όπως γήρανση, αρθρίτιδες, ρευματολογικές νόσοι, σιαταρχές του ανοσοποιητικού, σχετίζονται με εκφυλιστικές αλλοιώσεις. Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που προκαλεί ανάλογες τέτοιες αλλοιώσεις αποτελούν οι ROS (Xu et al 2006).

Αν και δεν φαίνεται να υπάρχει άμεση σύνδεση της παραγωγής των ROS με τη χρήση ηρωΐνης, ωστόσο υφίσταται έμμεση σχέση με την αύξηση της ντοπαμίνης στη συναπτική σχισμή (Hastings et al 1996, Oliveira al 2003), η οποία μπορεί να υποστεί οξείδωση από την μονοαμινική οξυδάση-B (MAO-B) παράγοντας διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (DOPAC) και  $H_2O_2$  (Olanow & Tatton 1999). Το  $H_2O_2$  εν συνεχεία μπορεί να αντιδράσει με ιόντα μετάλλων ( $Fe^{++}$  και  $Cu^+$ ) και να παραχθούν οι πολύ δραστικές ρίζες  $OH\cdot$  με βάση την αντίδραση Fenton. Μέσω αυτού του μονοπατιού μπορούν να προκληθούν οξειδωτικές βλάβες στα νευρικά κύτταρα οδηγώντας σε νευροεκφυλιστικές αλλοιώσεις (Oliveira et al 2002, Schulz et al 2000). Μελέτες σε χρήστες οπιοειδών έχουν δείξει στατιστικά σημαντική μείωση του ενδογενούς συστήματος αντιοξειδωτικής άμυνας (SOD, CAT, GPx) καθώς και της GSH (Goudas et al 1999, Zhou et al 2000, 2001, Gutowicz et al 2011, Zahmatkesh et al 2017).

Η θεραπεία υποκατάστασης με μεθαδόνη και βουπρενορφίνη σκοπό έχει τη μείωση της βλάβης με τελικό στόχο την απεξάρτηση και την κοινωνική επανένταξη. Η μεθαδόνη αποτελεί πλήρη αγωνιστή των μ-υποδοχέων των οπιοειδών ενώ η βουπρενορφίνη μερικό αγωνιστή.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, φάνηκε στην ομάδα μελέτης (θεραπευόμενοι) τόσο στην μέτρηση της καταλάσης (CAT) όσο στην γλουταθειόνη (GSH) στατιστικά σημαντική μείωση και των δύο δεικτών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (υγιείς). Ανάλογο αποτέλεσμα έδειξε και η μελέτη των Di Bello et al (2013) σε αρουραίους υπό μεθαδόνη, με πτώση της GSH και CAT. Επίσης στη μελέτη των Aranas et al (2006) σε 10 ασθενείς σε πρόγραμμα υποκατάστασης παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της GSH σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (υγιείς). Σύμφωνα με τη θεωρία της οξειδωσης της ντοπαμίνης στο νευρικό ιστό σε χρήστες οπιοειδών και την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Olanow & Tatton 1999), το ενδογενές αμυντικό σύστημα προσπαθεί να εξουδετερώσει τα οξειδωτικά προϊόντα, οπότε η συγκέντρωσή τους μειώνεται.

Στη σύγκριση των δύο υποκαταστάτων μεταξύ τους, στη μέτρηση της GSH, παρουσιάστηκε στην ομάδα της βουπρενορφίνης στατιστικά σημαντική λιγότερη μείωση της GSH από ότι στην ομάδα της μεθαδόνης. Στη μελέτη των Hemshekhar et al (2017) σε αρουραίους με αρθρίτιδα και στην ομάδα που χορηγούνταν βουπρενορφίνη, έδειξε ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική μείωση των δεικτών οξειδωτικού stress (CAT, GSH) σε σχέση με την ομάδα με αρθρίτιδα που δεν χορηγούνταν βουπρενορφίνη. Η μεθαδόνη ως πλήρης αγωνιστής, εμφανίζει παρόμοια αποτελέσματα με την ηρωΐνη οδηγώντας σε οξειδωση της ντοπαμίνης (Olanow & Tatton 1999). Παρόμοια αποτελέσματα εμφανίστηκαν και στη μέτρηση της CAT, όπου η ομάδα της βουπρενορφίνης εμφάνισε μικρή μη στατιστικά σημαντική μείωση του ενζύμου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, σε αντίθεση με την ομάδα της

μεθαδόνης, όπου παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική μείωση της CAT. Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι ο πλήρης αγωνιστής (μεθαδόνη), προκαλεί ανάλογη απόκριση με την ηρωΐνη. Παρόλα αυτά, συγκριτικές μελέτες χρηστών υπό ηρωΐνη και θεραπευομένων υπό μεθαδόνη έχουν δείξει τη βελτίωση των δεικτών οξειδωτικού stress στους χορηγούμενους υπό μεθαδόνη (Díaz-Flores Estévez et al 2004, Rodriguez-Delgado 2002).

Αναφορικά με τα TBARS, αυτά συνδέονται με την λιπιδική υπεροξείδωση και την παραγόμενη μαλονδιαλδεΰδη, η οποία μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Έτσι, τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μαλονδιαλδεΰδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η ομάδα μελέτης εμφάνισε στατιστικά σημαντική αύξηση των TBARS σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Στη σύγκριση και των τριών ομάδων (ελέγχου, μεθαδόνη, βουπρενορφίνη) ανά δύο, τόσο η μεθαδόνη όσο και η βουπρενορφίνη παρουσίασαν επίσης στατιστικά σημαντική αύξηση των δεικτών αυτών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Στη συσχέτιση των δύο υποκαταστάτων δεν εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την επίδραση τους στην οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Μελέτες σε χρήστες ηρωΐνης έχουν δείξει αύξηση των TBARS, ως αποτέλεσμα της δράσης της εξαρτησιογόνου ουσίας (Xu et al 2006). Ανάλογα αποτελέσματα έχουν δείξει και μελέτες σε ζώα (ποντίκια) με αύξηση των TBARS μετά από χορήγηση ηρωΐνης (Pan et al 2005, Samarghandian et al 2015).

Σε σχέση με την TAC και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (CARB), τα αποτελέσματα δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά στη σύγκριση της ομάδας μελέτης με την ομάδα ελέγχου. Αν και μελέτες σε ζώα έχουν δείξει τόσο τη μείωση της TAC όσο και την αύξηση των CARB μετά από χορήγηση ηρωΐνης (Xu et al 2006, Pan et al 2005), ωστόσο φαίνεται ότι και τα δύο υποκατάστατα επιδρούν θετικά και

αυξάνουν την TAC ενώ μειώνουν την παραγωγή των CARB. Επίσης, στη σύγκριση και των δύο υποκαταστάτων δεν φάνηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Τα δεδομένα αυτά συνάδουν με αποτελέσματα άλλων πρόσφατων μελετών τόσο μετά από χορήγηση βουπρενορφίνης (Lei et al 2017) όσο και σε χορηγούμενους υπό μεθαδόνη (Akbari et al 2014) με αύξηση της TAC και πτώση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

Τα δύο υποκατάστατα φαίνεται ότι βελτιώνουν την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού έναντι των υπολοίπων οπιοειδών και κυρίως της ηρωΐνης, ωστόσο δεν μπορούν να ομαλοποιήσουν πλήρως την κατάσταση. Συγκριτικά με τα δύο υποκατάστατα, η βουπρενορφίνη δείχνει να εμφανίζει μεγαλύτερη δράση σε όλους τους μετρήσιμους δείκτες του οξειδωτικού stress.

### Περιορισμοί

Η παρούσα μελέτη εμφανίζει αρκετούς περιορισμούς:

- Μικρό σχετικά δείγμα, που δεν επιτρέπει σε γενίκευση των αποτελεσμάτων και τα δεδομένα μπορούν να χαρακτηριστούν ως πιλοτικά.
- Δεν λήφθηκε υπόψη η δοσολογία των υποκαταστάτων. Εντούτοις οι χορηγούμενες δόσεις ήταν σύμφωνες με τα διεθνή πρότυπα.
- Δεν λήφθηκε υπόψη το ψυχιατρικό υπόβαθρο. Υπάρχουν μελέτες που έχουν δείξει διαφορά στη απόκριση του οργανισμού στα υποκατάστατα ανάλογα με τη ψυχική νόσο (Gera et al 2006).

## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Η έρευνα αυτή αποτελεί την πρώτη μελέτη στον ελλαδικό χώρο σε θεραπευόμενους υπό χορήγηση υποκατάστατων μεθαδόνης – βουπρενορφίνης για την μέτρηση δεικτών οξειδωτικού stress.

Αναδεικνύεται η εμφάνιση οξειδωτικού stress σε αυτούς τους ασθενείς καθώς και η σημαντική συμβολή των υποκαταστάτων στη βελτίωση των δεικτών.

Απαιτούνται όμως επιπλέον μελέτες για να καταστεί δυνατή η εξήγηση της ακριβούς επίδρασης τους.

Συμπερασματικά, διανοίγεται προοπτική για μια νέα θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών αυτών με στόχο τη μείωση της βλάβης, την πρόληψη των υποτροπών και τέλος την κοινωνική τους επανένταξη.



## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Abbadie C., Pan Y.X., Pasternak G.W. (2004). Immunohistochemical study of the expression of exon11-containing mu opioid receptor variants in mouse brain. *Neuroscience*. 127(2):419-30.
- Akbari M., Agshari R., Sharifi M. et al (2014). Evaluation of the effect of Diacetyl Morphine on salivary factors and their changes after methadone therapy. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. 15(6): 730-734.
- 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.
- Ames BN, Catchcart R, Schwiers E, et al.(1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78: 6858-62.
- Antunes F, Derick H, Cadenas E. (2002). Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med*, 33 (9): 1260-7.
- Aoyama K, Nakaki T. (2013). Impaired glutathione synthesis in neurodegeneration. *Int J Mol Sci*. 14(10):21021–21044.
- Arana C, Cutando A, Ferrera MJ et al. (2006). Parameters of oxidative stress in saliva from diabetic and parenteral drug addict patients. *J Oral Pathol Med*, 35: 554–9.
- Ανισόγλου-Αναστασιάδου Γ. (1994). Υποδοχείς οπιοειδών. Θέματα αναισθησιολογίας και εντατικής ιατρικής. 25-38.
- Baraka A. (2000). Historical aspects of opium. *Middle East J Anesthesiol*. 15:423-436.
- Barry U., Zuo Z. (2005). Opioids: old drugs for potential new applications. *Curr Pharm Des*. 11(10):1343-50.
- Bart G. (2012). Maintenance medication for opiate addiction: The foundation of recovery. *J. Addict. Dis*. 31(3):207-225.
- Beadles-Bohling A.S., Wiren K.M. (2005). Alteration of kappa-opioid receptor system expression in distinct brain regions of a genetic model of enhanced ethanol withdrawal severity. *Brain Res*. 1046(1–2):77-89.
- Berrocoso E., et al. (2009). Opiates as antidepressants. *Curr Pharm Des*. 15:1612-1622.

- Besters JL, Criswell DS, Shanely RA, Van Gammeren D, Falk D, Deruisseau KC, et al. (2004). Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *Am.J.Respir.Crit Care Med*, 170:1179-1184.
- Bohn L.M., Raehal K.M. (2006). Opioid receptor signaling: relevance for gastrointestinal therapy. *Curr Opin Pharmacol*. 6(6):559-63.
- Booth M. (1998). *Opium - a History*, New York, St Martin's Griffin.
- Borsodi A., Toth G. (1995). Characterization of opioid receptor types and subtypes with new ligands. *Ann NY Acad Sci*. 757:339-52.
- Brandley RE, Smerdon SJ, Wilkinson AJ, et al. (1993). The mechanism of autoxidation of myoglobin. *J Biol Chem*, 268 (10): 6995-7010.
- Brewer D., Fleming C.B., Haggerty P., Catalano F. (1998). Drug use predictors of partner violence in opiate-dependent women. *Violence and Victims*: 13: 107-115
- Brown L.S., Kritz S.A., Goldsmith R.J., Bini E.J., Rotrosen J., Baker S., Robinson J., McAuliffe P. (2006). Characteristics of substance abuse treatment programs providing services HIV/AIDS, hepatitis C virus infection, and sexually transmitted infections: The National Drug Abuse Treatment Clinical Trials Network. *Journal of Substance Abuse Treatment*: 30: 315-321.
- Brownstein J. M. (1993). A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 90:5391-5393.
- Butelman E.R., Ko M.C., Sobczyk-Kojiro K., et al. (1998). Kappa-Opioid Receptor Binding Populations in Rhesus Monkey Brain: relationship to an Assay of Thermal Antinociception. *J Pharmacol Exp Ther*. 285(2):595-601.
- Cadet J.L., Jayanthi S., Deng X. (2003). Speed kills: cellular and molecular bases of methamphetamine-induced nerve terminal degeneration and neuronal apoptosis. *FASEB J*. 17(13):1775-1788.
- Cami J. & Farre M. (2003). Drug addiction. *N Engl J Med*. 349:975–986.
- Chance B, Sies H, Boveris A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 59: 527-605.
- Chelikani P, Fita I, Loewen PC. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci.*, 61(2):192-208.
- Chiang C.N. & Hawks R.L. (2003). Pharmacokinetics of the combination tablet of buprenorphine and naloxone. *Drug Alcohol Depend*. 70(2 Suppl): S39-S47.

- Chiurchiù V, MacCarrone M. (2011). Chronic inflammatory disorders and their redox control: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling*. 15(9): 2605–2641.
- Cohen M.M. (1969). The history of opium and opiates. *Tex Med*. 65:76-85.
- Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T, et al. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, 30 (2): 280-5.
- Corbett C.E. (1966). Hipnoanalésicos, em: Charles E Corbett, Elementos de Farmacodinâmica, 2ª Ed, São Paulo, Livraria Editora Artes Médicas.
- Cottrell GT, Ferguson AV. (2004). Sensory circumventricular organs: central roles in integrated autonomic regulation. *Regul Pept*, 117: 11-23.
- Cowan A. (2003). Buprenorphine: New pharmacological aspects. *Int J Clin Pract. Suppl* (133): 3-8.
- Davis A.M., Inturrisi C.E. (1999). d-Methadone blocks morphine tolerance and N-methyl-D-aspartate-induced hyperalgesia. *J Pharmacol Exp Ther*. 289:1048-1053.
- Debovic K., Duchesne A., Andrews J., Engert V., Pruessner J. (2009). The brain and the stress axis: The neural correlates of cortisol regulation in response to stress. *NeuroImage*: 47: 864-871
- Di Bello MG, Masini E, Ioannides C, Ndisang JF, Raspanti S, Bani Sacchi T, Mannaioni PF. (2013). Histamine release from rat mast cells induced by the metabolic activation of drugs of abuse into free radicals. *Inflamm Res.*, 62(2):247.
- Di Meo S, Venditti P. (2001). Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept*, 10: 125-40.
- Díaz-Flores Estévez J, Díaz-Flores Estévez F, Hernández Calzadilla C, Rodríguez Rodríguez E, Díaz Romero C, Serra-Majem L. (2004). Application of linear discriminant analysis to the biochemical and haematological differentiation of opiate addicts from healthy subjects: a case-control study. *Eur J Clin Nutr.*, 58:449–455.
- Dossey B., Keegan L., Guzetta C. (2005). *Holistic nursing: a handbook for practice*. 4<sup>th</sup> edition. Sudbury, Massachusetts: Jones and Bartlett Publicers.
- Dossey L. (2002). The dark side of consciousness and the therapeutic relationship. *Alternative therapies in health and medicine*: 8(6):12-16.

- Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. (2000). Glutathione metabolism in brain: metabolic interactions between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem.* 267:4912–4916.
- Dringen R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol.* 62:649–671.
- 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.
- Eap C.B., Buclin T., Baumann P. (2002). Interindividual variability of the clinical pharmacokinetics of methadone: implications for the treatment of opioid dependence. *Clin Pharmacokinet.* 41:1153-1193.
- EMCCDA. (2015). Ευρωπαϊκή έκθεση για τα ναρκωτικά 2015: Τάσεις και εξελίξεις. Υπηρεσία Εκδόσεων της Ε.Ε., Λουξεμβούργο.
- Fan Y., Tang Y., Lu Q., Feng S., Yu Q., Sui D., Zhao Q., Ma Y., Li S. (2008). Dynamic changed in salivary cortisol and secretory immunoglobulin A response to acute stress. *Stress and Health:* 25: 189-194
- 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.
- Ferrari A., Coccia C.P., Bertolini A., Sternieri E. (2004). Methadone - metabolism, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol Res.* 50:551–559.
- Feuerecker M., Mayer W., Kaufmann I., Gruber M., Muckenthaler F., Yi B. et al. (2012). A corticoid-sensitive cytokine release assay for monitoring stress-mediated immune modulation. *Clin Exp Immunol.* 172(2):290-9.
- Finaud J, Lac G, Filaire E. (2006). Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med.*
- Finck A.D. (1979). Opioid receptor and endorphins: significance for Anesthesiology, *Refresher Courses in Anesthesiology.* 7:103-114.
- Fleckenstein A.E., Volz T.J., Riddle E.L., et al. (2007). New insights into the mechanism of action of amphetamines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47:681-98.
- Flohe L. (2013). The fairytale of the GSSG/GSH redox potential. *Biochim Biophys Acta,* 1830(5): 3139-3142

- Fudala P.J., Bridge T.P., Herbert S., et al. (2003). Office-based treatment of opiate addiction with a sublingual-tablet formulation of buprenorphine and naloxone. *N Engl J Med.* 349:949-958.
- Geitona M., Carayanni V., Petratos P. (2012). Economic evaluation of opioid substitution treatment in Greece. *Heroin Addict Relat Clin Probl.* 14(3):77-88.
- Gerra G., Leonardi C., D'Amore A., Strepparola G., Fagetti R., Assi C., Zaimovic A., Lucchini A. (2006). Buprenorphine treatment outcome in dually diagnosed heroin dependent patients: A retrospective study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 30(2):265-72.
- Giles IG, Tasker KM, Collins C, Giles MN, O'rourke E, and Jacob C. (2002). Reactive sulphur species: an in vitro investigation of the oxidation properties of disulphide S-oxides. *Biochem J.*, 364(Pt 2): 579–585.
- Goudas LC, Langlade A, Serrie A, et al. Acute decreases in cerebrospinal fluid glutathione levels after intracerebroventricular morphine for cancer pain. *Anesth Analg.* 1999;89:1209–1215.
- Gozzani J.L. (1994). Opióides e antagonistas. *Rev Bras Anesthesiol.* 44:65-73.
- Grau L.E., Green T.C., Torban M., Blinnikova K., Krupitsky E., Ilyuk R., Kozlov A.P., Heimer R. (2009). Psychosocial and contextual correlates of opioid overdose risk among drug users in St. Petersburg, Russia. *Harm Reduct J.*: 24:6-17.
- Green HJ, Fraser IG. (1988). Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med Sci Sports Exerc.* 20(2): 55-59.
- Gutowicz M., Kaźmierczak B. & Barańczyk-Kuźma A. (2011). The influence of heroin abuse on glutathione-dependent enzymes in human brain. *Drug and Alcohol Dependence*, 113(1):8-12.
- Gutstein H.B., Akil H. (2001). Opioid Analgesics, em: Hardman JG, Limbird LL - Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th Ed, New York, McGraw-Hill.
- Guzman J, Yu JG, Suntres Z, et al. ADOA3R as a therapeutic target in experimental colitis: proof by validated high-density oligonucleotide microarray analysis. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12:766–789.
- Hachey D.L., Kreek M.J., Mattson D.H. (1977). Quantitative analysis of methadone in biological fluids using deuterium-labeled methadone and GLC-chemical-ionization mass spectrometry. *J Pharm Sci.* 66:1579–1582.

- Hahn W, Kuzmicic J, Burrill J. et al. (2014). Proinflammatory cytokines differentially regulate adipocyte mitochondrial metabolism, oxidative stress, and dynamics. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 306: E1033-E1045.
- Halliwell B and Gutteridge JMC. (2015). *Free radicals in biology and chemistry*. New York: Oxford Science Publications, Sixth Edition.
- Halliwell B. & Gutteridge JMC. (1998). *Free radicals in biology and chemistry*. New York: Oxford Science Publications.
- 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.
- Hansen JM, Go YM, Jones DP. (2006). Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 46:215–234.
- Harrison DG, Vinh A, Lob H, Madhur MS. (2010). Role of the adaptive immune system in hypertension. *Curr Opin Pharmacol*, 10: 203-207.
- Harvey R. & Champe P. (1995). *Φαρμακολογία. Επιστημονικές εκδόσεις Μ. Παρισιάνου*. Αθήνα, Ελλάδα.
- Hastings TG, Lewis DA, Zigmond MJ. (1996). Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:1956–1961.
- Helm S., Trescot A. M., Colson J., Sehgal N., Silverman S. (2008). Opioid antagonists, partial agonists and agonists/antagonists: The role of office-based detoxification. *Pain Physician*. 11: 225-235.
- Hemshekhar M, Anaparti V, Hitchon C, and Mookherjee N. (2017). Buprenorphine Alters Inflammatory and Oxidative Stress Molecular Markers in Arthritis. *Mediators Inflamm.*, 2017: 2515408.
- Herrero M.T., Barcia C., Navarro J.M. (2002). Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Childs Nerv Syst*. 18(8): 386-404.
- Hirrlinger J, Schulz JB, Dringen R. (2002). Effects of dopamine on the glutathione metabolism of cultured astroglial cells: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem*. 82:458–467.
- Ho F.M., Liu S.H., Liao C.S., Huang P.J., Lin-Shiau S.Y. (2000). High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH(2)-terminal kinase and caspase-3. *Circulation*. 101:2618-2624.

- Howard-Jones N. (1947). A critical study and the origins and early development of hypodermic medication. *J Hist Med Allied Sci.* 2:201-249.
- Huddleston C., Marlowe D. (2011). *Painting the current picture: A national report card on drug courts and other problem-solving court programs in the U.S.* Alexandria, V.A.: National Drug Court Institute.
- Hughes J. (1975). Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res.* 88:395-308.
- Iadecola C, Park L, Capone C. (2009). Threats to the mind: aging, amyloid, and hypertension. *Stroke* 2009, 40: S40-S44.
- Inturrisi C.E. (2002). Clinical pharmacology of opioids for pain. *Clin J Pain.* 18(4 suppl): S3-13.
- Janaszewska A, Bartosz G. (2002). Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest.*, 62: 231-236.
- Janssen P.A. (1982). Potent new analgesics tailor-made for different purposes. *Acta Anaesthesiol Scand.* 26:262-268.
- Jenkins RR. (1988). Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med,* 5:156-70.
- Johnson R.E., Chutuape M.A., Strain E.C., Walsh S.L., Stitzer M.L., Bigelow G.E. (2000). A comparison of levomethadyl acetate, buprenorphine, and methadone for opioid dependence. *N Engl J Med.* 343:1290-1297.
- 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.
- Kajantie E., Phillips D. (2006). The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology:* 31 (2): 151-178
- Kaspers F., Scholz B. O. (2004) Stress-induced increase in morning cortisol variance. *Stress and Health:* 20: 127-139
- Kauer J.A. (2004). Learning mechanisms in addiction: synaptic plasticity in the ventral tegmental area as a result of exposure to drugs of abuse. *Annu Rev Physiol.* 66:447–475.

- Kavaliers M. (1987). Stimulatory influences of calcium channel antagonists on stress-induced opioid analgesia and locomotor activity. *Brain Res.* 408: 403-407.
- Keles MS, Taysi S, Sen N, Aksoy H, Akcay F. (2001). Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can. J. Neurol. Sci.* 28: 141-143.
- Kendler K.S., Jacobson K.C., Prescott C.A., Neale M.C. (2003). Specificity of genetic and environmental risk factors for use and abuse/dependence of cannabis, cocaine, hallucinogens, sedatives, stimulants, and opiates in male twins. *Am J Psychiatry.* 2003 Apr;160(4):687-95.
- Kintz P. (2001). Deaths involving buprenorphine: a compendium of French cases. *Forensic Sci Int.* 121:65-69.
- Kitahata IM., Kosaka Y, Taub A et al. (1974). Lamina specific suppression of dorsal horn activity by morphine sulphate. *Anesthesiology* 41 : 39-48 1 974.
- Kling M.A., Carson R.E., Borg L., Zametkin A., Matochik J.A., Schluger J., Herscovitch P., Rice K.C., Ho A., Eckelman W.C., Kreek M.J. (2000). Opioid receptor imaging with PET and [<sup>18</sup>F]cyclofoxy in long-term methadone-treated former heroin addicts. *J Pharmacol Exp Ther.* 295:1070-1076.
- Kosten T.R., George T.P. (2002). The neurobiology of opioid dependence: Implications for treatment. *Science and Practice Perspectives:* 13: 13-20
- Kovatsi L, Njau S, Nikolaou K, Topouridou K, Papamitsou T, Koliakos G. (2010). Evaluation of prooxidant-antioxidant balance in chronic heroin users in a single assay: an identification criterion for antioxidant supplementation. *Am J Drug Alcohol Abuse,* 36(4):228-32.
- Kreek M.J., Borg L., Ducat E., Ray B. (2010). Pharmacotherapy in the Treatment of Addiction: Methadone. *J Addict Dis.* 29(2):200-216.
- Kreek M.J., Hachey D.L., Klein P.D. (1979). Stereoselective disposition of methadone in man. *Life Sci.* 24:925-932.
- Kreek M.J., Oratz M., Rothschild M.A. (1978). Hepatic extraction of long- and short-acting narcotics in the isolated perfused rabbit liver. *Gastroenterology.* 75:88-94.
- Kritikos P.G. (1968). The history of opium in antiquity. *J Am Pharm Assoc.* 8:446-447.
- 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.



- Kurina L., Schneider B., Waite L.J. (2004). Stress, symptoms of depression and anxiety, and cortisol levels in working parents. *Stress and Health*: 20: 53-63
- Larance B., Degenhardt L., Lintzeris N., et al. (2011). Post-marketing surveillance of buprenorphine-naloxone in Australia: diversion, injection and adherence with supervised dosing. *Drug Alcohol Depend.* 118(2-3): 265-273.
- Lassegue B, Griendling KK. (2010). NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,30: 653-661.
- Law P.Y., Loh H.H. (1999). Regulation of Opioid Receptor Activities. *J Pharmacol Exp Ther.* 289(2): 607-24.
- Law P.Y., Loh H.H. (1999). Regulation of Opioid Receptor Activities. *J Pharmacol Exp Ther.* 289(2): 607-24.
- Lei Xu et al. (2017). Effect of buprenorphine transdermal patch combined with patientcontrolled intravenous analgesia on the serum pain-related biochemical indexes in elderly patients with intertrochanteric fracture. *Journal of Hainan Medical University*, 23(17): 67-70.
- Ling W., Casadonte P., Bigelow G., et al. (2010). Buprenorphine implants for treatment of opioid dependence: a randomized controlled trial. *JAMA.* 304:1576-83.
- Ling W., Wesson D.R., Charuvastra C., Klett C.J. (1996). A controlled trial comparing buprenorphine and methadone maintenance in opioid dependence. *Arch Gen Psychiatry.* 53:401-407.
- Linnane AW, Zhang C, Yarovaya N, Kopsidas G, Kovalenko S, Papakostopoulos P, Eastwood H, Graves S, Richardson M. (2002). Human aging and global function of coenzyme Q10. *Ann N Y Acad Sci.*
- Lugo R.A., Satterfield K.L., Kern S.E. (2005). Pharmacokinetics of methadone. *J Pain Palliat Care Pharmacother.* 19:13-24.
- Macht D.I. (1915). The history of opium and some of its preparation and alkaloids. *JAMA.* 64:477-461.
- Mansour A., Fox C.A., Akil H., Watson S.J. (1995). Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci.* 18(1):22-9.

- Maremmani I., Pacini M. Pani P. (2011). Basics on addiction: A training package for medical practitioners or psychiatrists who treat opioid dependence. *Heroin Addict Relat Clin Probl.* 13(2): 5-40.
- Martin W.R. (1983). Pharmacology of opioids. *Pharmacol Ver.* 35:283-303.
- McCance-Katz E.F., Sullivan L.E., Nallani S. (2010). Drug interactions of clinical importance among the opioids, methadone and buprenorphine, and other frequently prescribed medications: a review. *Am J Addict.* 19:4-16.
- Meyer AJ. (2008). The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *J. Plant Physiol.*, 165(13): 1390-1403.
- Miskevich DA, Petushok NE, Lelevich VV, Lelevich SV, Borodinskii AN. Effect of chronic morphine treatment on free radical state. *Biomed Khim.* 2007;53:190–195.
- Mollereau C., Parmentier M., Mailleux P., et al. (1994). ORL1, a novel member of the opioid receptor family: cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett.* 341(1):33-38.
- Moszczynska A, Turenne S, Kish SJ. (1998). Rat striatal levels of the antioxidant glutathione are decreased following binge administration of methamphetamine. *Neurosci Lett.* 255:49–52.
- Murphree H.B. (1969). *Analgésicos Narcóticos: Analgésicos Sintéticos*, em: DiPalma JR, Drill-Farmacologia Médica, México, La Prensa Médica Mexicana.
- Mylonas C, and Kouretas D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*, 13: 295-309.
- Nestler EJ. (2004). Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*, 47 Suppl 1:24-32.
- Neto L.L., Oliveira E., Correia F., Ferreira A.G. (2008). The human nucleus accumbens: where is it? Astereotactic, anatomical and magnetic resonance imaging study. *Neuromodulation.* 11(1): 13-22.
- Newman M. (1986). *Health as expanding consciousness.* St Louis: Mosby.
- Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Fatouros IG, Koutedakis Y, Kouretas D. (2008). The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. *Sports Med.*, 38(7):579-606.

- Nilsson M.I., Anggård E., Holmstrand J., Gunne L.M. (1982). Pharmacokinetics of methadone during maintenance treatment: adaptive changes during the induction phase. *Eur J Clin Pharmacol.* 22:343-349.
- Nishina H., Wada T., Katada T. (2004). Physiological Roles of SAPK/JNK Signaling Pathway. *J. Biochem.* 136: 123-126.
- Nolte J. & Angevine J.B. Jr. (eds). (2007). *The Human Brain in Photographs and Diagrams*, 3rd Edition, Mosby (Elsevier), Philadelphia.
- Nutt J. D. (2015). Considerations on the role of buprenorphine in recovery from heroin addiction from a UK perspective. *Journal of Psychopharmacology.* 29(1) 43-49.
- Olanow CW & Tatton WG. (1999). Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 123–144.
- Oliveira MT, Rego AC, Macedo TRA, Oliveira CR. (2003). Drugs of abuse induce apoptotic features in PC12 cells. *Ann NY Acad Sci.* 1010:667–670.
- Oliveira MT, Rego AC, Morgadinho MT, Macedo TRA & Oliveira CR. (2002). Toxic effects of opioid and stimulant drugs on undifferentiated PC12 cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 965: 487–496.
- Pan J, Zhang Q, Zhang Y, Ouyang Z, Zheng Q, Zheng R. (2005). Oxidative stress in heroin administered mice and natural antioxidants protection. *Life Sci.*, 77(2):183-93.
- Parse R. (1999). *Hope: an international human becoming perspective*. Sudbury: Jones and Bartlett.
- Pasternak G.W. (2004). Multiple opiate receptors: djv̄ vu all over again. *Neuropharmacology.* 47(Suppl 1):312-23.
- Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta.*, 333(1):19-39.
- Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA. (2004). Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci. Lett.* 357: 83-86
- Payabvash S, Beheshtian A, Salmasi A, et al. Chronic morphine treatment induces oxidant and apoptotic damage in the mice liver. *Life Sci.* 2007;79:972–980.

- Ponizovsky A., Grinshpoon A., Margolis A., Cohen R., Rosca P. (2006). Well-being, psychosocial factors and side-effects among heroin-dependent inpatients after detoxification using buprenorphine versus clonidine. *Addictive Behaviors*: 31: 2002-2013.
- Popov D. (2014). Protein S-glutathionylation: from current basics to targeted modifications. *Arch Physiol Biochem*, 120(4): 123-130.
- Quiron R, B owen WD, Itzhak Y, Junien JL, Musacchio J M , Rothwan R B , S u T-P, Tao W, Tuylo D P . A proposal for the classification of sigōól binding sites. *Trens in Pharmacological Sciences* 1992: 13: 85-86.
- Rabinovic AD, Hastings T. (1998). Role of endogenous glutathione in the oxidation of dopamine. *J Neurochem*. 71:2071–2078.
- Reid MB. (2001). Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol*; 90: 724-31.
- Rimbach G, Höhler D, Fischer A, Roy S, Virgili F, Pallauf J, Packer L. *Arch Tierernahr*. (1999). Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems.
- Rodriguez-Delgado MA, Diaz-Flores Estevez JF, Diaz-Flores Estevez F, Hernandez Calzadilla C, Diaz Romero C. (2002). Fast determination of retinol and alpha-tocopherol in plasma by LC. *J Pharm Biomed Anal*. 28:991–997.
- Rogers M. (1980). Nursing: a science of unitary man. In: Reihl JP., Roy C. (eds). *Conceptual models for nursing practice*. 2<sup>nd</sup> edition. New York: NLN Press.
- Saddichha S., Neeraj Prasad Sinha B., Khess C. R. J. (2007). The Role of Gateway Drugs and Psychosocial Factors in Substance Dependence in Eastern India. *The International Journal of Psychiatry in Medicine*: 37 (3): 257-266
- Saidak, Z., Blake-Palmer, K., Hay, D. L., Northup, J. K., & Glass, M. (2006). Differential activation of G-proteins by mu-opioid receptor agonists. *British Journal of Pharmacology*, 147, 671-680.
- Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Afshari R, Farkhondeh T, Karimnezhad F. (2015). Effects of buprenorphine on balance of oxidant/antioxidant system in the different ages of male rat liver. *J Biochem Mol Toxicol.*, 29(6):249-53.

- Saxon A.J., Ling W., Hillhouse M., et al. (2013a). Buprenorphine/naloxone and methadone effects on laboratory indices of liver health: a randomized trial. *Drug Alcohol Depend.* 128:71-6.
- Saxon J.A., Yih-Ing Hser Y-I, Woody G., Ling W. (2013b). Medication-assisted treatment for opioid addiction: Methadone and buprenorphine. *Journal of food and drug analysis* 21: s69-s72.
- Sayre LM, Perry G, Smith MA. (2008). Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol.* 21:172–188.
- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem.* 267:4904–4911.
- Sen' VD, Golubev VA, Volkova LM, Konovalova NP. (1996). Synthesis and antitumor activity of platinum(II) complexes with trans-3,4-diamino-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl. *J Inorg Biochem.*
- 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.
- Stokes AH, Lewis DY, Lash LH, et al. (2000). Dopamine toxicity in neuroblastoma cells: role of glutathione depletion by L-BSO and apoptosis. *Brain Res.* 858:1–8.
- Strain, E. C. (2006). Pharmacology of buprenorphine. In E. C. Strain & M. L. Stitzer (Eds.). *The treatment of opioid dependence* (pp. 213-229). Baltimore: Johns Hopkins Press.
- Thomas MJ. (2000). The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition*, 16 (7-8): 716- 8.
- Traynor J. (1989). Trends. Subtypes of k-opioid receptor: fact or fiction? *Trends Pharmacol Sci.* 10(2):52-3.
- Traynor J., Elliot J. (1993).  $\delta$ -opioid receptor subtypes and cross talk with  $\mu$ -receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 14(3):84-5.
- UNGASS. (1998). Declaration on the Guiding Principles of Drug Demand Reduction. A/RES/s-20/3.
- Vogt B.A., Wiley R.G., Jensen E.L. (1995).. Localization of mu and delta opioid receptors to anterior cingulate afferents and projection neurons and input/output model of mu regulation. *Exp Neurol.* 135(2):83-92.

- von Bernhardt R, Eugenín J. (2012). Alzheimer's disease: redox dysregulation as a common denominator for diverse pathogenic mechanisms. *Antioxidants and Redox Signaling*. 16(9): 974–1031.
- Walker J.M., BO ven W.D., Wulker F.O., Matsumoto R.R., De Costa B., Rice K.C. (1990). Sigma receptors. Biology and function. *Pharmacological Reviews*. 42: 355-402.
- Walsh S.L. & Eissenberg T. (2003). The clinical pharmacology of buprenorphine: Extrapolating from the laboratory to the clinic. *Drug Alcohol Depend*. 70(2 Suppl): S13-S27.
- WHO. (2010). Atlas of substance use: resources for the prevention and treatment of substance use disorders. Geneva: p. 23.
- Wilhelmsen I. (2005). Biological sensitisation and psychological amplification: Gateways to subjective health complaints and somatoform disorders. *Psychoneuroendocrinology*: 30 (10): 990-995.
- 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.
- Wolff K., Hay A.W., Raistrick D., Calvert R. (1993). Steady-state pharmacokinetics of methadone in opioid addicts. *Eur J Clin Pharmacol*. 44:189–194.
- Womersley J. & Uys J. (2016). S-glutathionylation and redox protein signaling in drug addiction. *Prog. Mol. Bio Transl Sci.*, 137: 87-121.
- Wright D.A. (1968). The history of opium. *Med Biol Illus*. 18:62-70.
- Xia Y., Haddad G.G. (2001). Major difference in the expression of delta- and mu-opioid receptors between turtle and rat brain. *J Comp Neurol*. 436(2):202-10.
- Xu B., Wang Z. , Gang Li G., Li B. et al (2006). Heroin-Administered Mice Involved in Oxidative Stress and Exogenous Antioxidant-Alleviated Withdrawal Syndrome. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 99: 153–161.
- Yaksh T. (1989). Opioid receptors and endorphins. Annual Refresher Course liectures. 134:1-7.
- Zahmatkesh M, Kadkhodae M, Salarian A, Seifi B, Adeli S. (2017). Impact of opioids on oxidative status and related signaling pathways: An integrated view. *J Opioid Manag*. 13(4):241-251.

- Zaki P.A., Bilsky E.J., Vanderah T.W., Lai J., Evans C.J., Porreca F. (1996). Opioid receptor types and subtypes: the delta receptor as a model. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 36:379-401.
- Zhou J, Si P, Ruan Z, et al. Primary studies on heroin abuse and injury induced by oxidation and lipoperoxidation. *Chin Med J (Engl)* 2001;114:297–302.
- Zhou JF, Yan XF, Ruan ZR, et al. Heroin abuse and nitric oxide, oxidation, peroxidation, lipoperoxidation. *Biomed Environ Sci.* 2000;13:131–139.
- Γλυκιώτη Ο. (2011). Φιλοσοφία, δομή και οργάνωση των ψυχοκοινωνικών προγραμμάτων απεξάρτησης. Οι περιπτώσεις του ΚΕΘΕΑ και του 18 Άνω. Πτυχιακή εργασία. Εθνική Σχολή Δημόσιας Διοίκησης. Αθήνα.
- ΕΚΤΕΠΝ (2014). Η Κατάσταση του Προβλήματος των Ναρκωτικών και των Οινόπνευματώδων στην Ελλάδα. Ετήσια Έκθεση 2014. Ερευνητικό Πανεπιστημιακό Ινστιτούτο Ψυχικής Υγιεινής (ΕΠΨΥ). Αθήνα, Ελλάδα.
- ΕΚΤΕΠΝ (2015). Η Κατάσταση του Προβλήματος των Ναρκωτικών και των Οινόπνευματώδων στην Ελλάδα. Ετήσια Έκθεση 2014. Ερευνητικό Πανεπιστημιακό Ινστιτούτο Ψυχικής Υγιεινής (ΕΠΨΥ). Αθήνα, Ελλάδα.
- Ιατρού Χ. (2003). Όσα πρέπει να γνωρίζουμε για τον αλγαισθητικό πόνο Ελληνικό Περιοδικό Περιεγχειρητικής Ιατρικής. 1: 48-57.
- Κοκκόλης Κ. (2001). Η βουπρενορφίνη στη θεραπεία της υποκατάστασης. ΟΚΑΝΑ. Αθήνα, Ελλάδα.
- Λιάππας Γ. (1991). Ναρκωτικά. Εθιστικές ουσίες, προβλήματα, αντιμετώπιση. Εκδόσεις Πατάκη: Αθήνα.
- Μαρσέλλος Μ. (1997). Εξαρτησιογόνες ουσίες. Φαρμακολογία-Τοξικομανία-Ιστορία-Κοινωνιολογία-Νομοθεσία. Τυπωθήτω, Αθήνα.
- Μαυρίδης Ι. (2012). Ο ρόλος του επικλινή πυρήνα στις νευρολογικές διαταραχές. *Νευρολογία.* 21 (6): 6-11.
- Μπουγουλιά Μ. (2006). Οξειδωτικό στρες και σακχαρώδης διαβήτης. *Ελληνικά Διαβητολογικά Χρονικά.* 19(1): 43-54.
- Ν. 1105/1972. (ΦΕΚ 36/Α'/1972). Περί κυρώσεως της Ενιαίας Συμβάσεως του 1961 επί των Ναρκωτικών. Αρ. 38, παρ. 1-2.
- ΟΚΑΝΑ. (2012). Απολογισμός διετίας 2010-2012. Εκδόσεις Οργανισμός Κατά των Ναρκωτικών. Αθήνα, Ελλάδα.

- ΟΚΑΝΑ. (2012). Πλαίσιο Λειτουργίας των Θεραπευτικών Δομών του ΟΚΑΝΑ. Οργανισμός Κατά των Ναρκωτικών. Αθήνα.
- Παπαγεωργίου Γ. (2005). Βιοχημεία ελεύθερων ριζών, αντιοξειδωτικά και λιπιδική υπεροξείδωση. Θεσσαλονίκη: university studio press.
- Σκανδάμη Π., Βετούλη Μ., Κερασιώτη Ε., Καφετζόπουλος Ε., Μαλλιώρα Μ. (2016). Έγκαιρη παρέμβαση σε νεαρούς χρήστες παράνομων ψυχοδραστικών ουσιών με παραβατική συμπεριφορά. Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής. 33(1):115-123.
- Υπουργική Απόφαση 5γ/Γ.Π.οικ. 100847 (2002). Άδεια χορήγησης ουσιών για υποκατάσταση της εξάρτησης από τον Οργανισμό Καταπολέμησης Ναρκωτικών. ΦΕΚ 1343: 19725-17926.