الكشف عن الطفرات لجين *OPRM1* في فئة من المدخنين داخل مدينة مصراتة

أ. إحسان محمد إدريس*، أ. أسماء علي أبودبوس
د. مصطفى محمد مفتاح دراه، أ. خديجة عمر الصداعي
كلية العلوم – جامعة مصراتة
*e.idris@sci.misuratau.edu.ly

تاريخ الاستلام 2024.03.16 تاريخ النشر 2024.05.09

الملخص:

التدخين من العادات السيئة التي لها آثار ضارة على الصحة، وأحد أهم مكوناته المسؤولة عن الإدمان هو النيكوتين، الذي له خطورة على مستوى الصحة بعامة وعلى مستوى المادة الوراثية بخاصة، فهو يسبب تغييرات جينية ويؤدي إلى أمراض يمكن توارثها عبر الأجيال، ومن هذه التغيرات حدوث طفرة جينية للجين (*OPRM1*)، فهذا الجين يعطي التعليمات لصنع بروتين يسمى مستقبلات الأفيون، "الذي يعد النظام الجسم الداخلي الذي يسبب الإدمان". لذلك يهدف هذا البحث إلى دراسة علاقة وجود طفرات في جين (*OPRM1*) في فئة من المدخنين. **المواد وطرائق العمل:** تم تجميع (22) عينة، وجميع الحالات كانت من الذكور، ممن أعمارهم تتراوح بين (15) إلى (40) سنة، معظمهم مارس عادة التدخين في سن مبكرة. استخلصت المادة الوراثية (DNA) من العينات باستخدام (QIGEN Kit)، وقياس تركيز المادة الوراثية المستخلصة وترحيلها على جل الأقاروز، ثم إجراء تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) بعد تصميم البادئ المناسب لتضاعف المنطقة المستهدفة للدراسة، وأرسلت العينات خارج الدولة لإجراء عملية تحليل التسلسل. **النتيجة:** تبيّن من تحليل التسلسل وجود الطفرة (118A>G) في (3) عينات ضمن العينات المدروسة، كما كشف الاختبار عن وجود عدة طفرات أخرى مسجلة عالمية في مختلف العينات. **المناقشة:** توافقت نتائج هذه الدراسة مع عدّة دراسات أخرى بنسب

متفاوتة؛ نظرًا للاختلافات العرقية، والبيئية، والفئات العمرية.

الكلمات المفتاحية: إدمان، التدخين، الطفرة، *OPRM1*، PCR.

Detection of mutations in the *OPRM1* gene among smokers in the city of Misurata

Ehsan M. Idris, Asma A. Abudabous, Mustafa M. Drah, Khadega O. alsdaei
Faculty of Science, Misurata University, Libya
e.idris@sci.misuratau.edu.ly

Received: 16.03.2024 Publishing: 09.05.2024

Abstract:

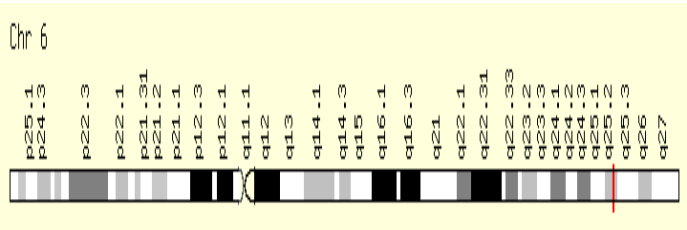
Smoking is a bad habit that has harmful effects on health, and one of its most important components responsible for addiction is nicotine, which is dangerous to health in general and to genetic material in particular, as it causes genetic changes and leads to diseases that can be inherited across generations. Among these changes is the occurrence of a genetic mutation in the *OPRM1* gene. This gene gives instructions for making a protein called opioid receptors, “which is considered the internal body system that causes addiction”. **Materials and methods:** 22 samples were collected, and all the cases were male, ages ranging from 15 to 40 years. Most of them had smoked early age. The DNA genetic material was extracted from the samples using the QIGEN Kit, and the concentration of the extracted genetic material was measured and transferred onto a gel, then a polymerase chain reaction (PCR) was performed after designing the appropriate primer to replicate the target region for the study. The samples were sent outside the country for sequence analysis. **Result:** The sequence analysis revealed the presence of the 118A>G mutation in 3 samples among the samples studied. The test also revealed the presence of several other mutations in various samples.

***Keywords*:** Addiction, Smoking, Mutation, *OPRM1*, PCR.

1. المقدمة:

تعد آفة التدخين بجميع أنواعه من العادات السيئة المنتشرة في العالم التي لها آثار سلبية على صحة الإنسان والمجتمع، حيث تختلف أساليب التدخين من استخدام السجائر العادية أو الإلكترونية أو الشيشة، فكل هذه الأساليب مكوناتها مواد سامة تؤدي إلى حدوث خلل في الوظائف الطبيعية لأعضاء الجسم، قد تصل إلى مرحلة الإدمان، ومع التطور العلمي وزيادة الأبحاث في مجال الوراثة الجزيئية أثبتت عديد الدراسات خطورة التدخين، واكتشاف العوامل المساعدة على إدمان المواد الأفيونية، وعلاقتها بالمادة الوراثية وإحداث تغيرات جينية "طفرات"، قد تؤدي إلى تطور الأمراض، ويمكن توارثها عبر الأجيال.

ومن هذه الجينات التي تمت دراستها وتبين تأثرها بإدمان التدخين جين (opoid receptor mu1)، يقع هذا الجين على الذراع الطويل للكروموسوم 6 "q25.2"، حيث يوفر هذا الجين تعليمات لصنع عدة بروتينات تسمى مستقبلات الأفيون (MOR)، أحد أنواعها (mu)، والمستقبلات الأفيونية هي جزء من نظام المواد الأفيونية الذاتي، "هو نظام الجسم الداخلي لتنظيم الألم والمكافآت والسلوكيات التي تسبب الإدمان"، ويوجد هذا الجين عند الموقع: (NC_000006.12 154246867--154010496)، ويحتوي على (17) منطقة تشفيرية (exons)، ويعرف برمز رقمي (Gene ID:4988). (NCBI) الشكل (1). سجلت في عدة دراسات حدوث طفرة على هذا الجين لها علاقة بإدمان التدخين عند الموقع (118) على (NM-000914 variant) تغير النيكلوتيدا (A→G)، وهو ما نتج عنه تغير في الحمض الأميني (Asparagine "Asn"→Aspartatic acid) (Medline Plus).



الشكل (1): يوضح موقع الجين (*OPRM1*): على الكروموسوم 6 (Genocard)

أظهرت نتائج دراسة في أوروبا أن (rs1799971) في (*OPRM1*) قد تسهم في آليات مسؤولية الإدمان التي يتم مشاركتها عبر مواد أفيونية مختلفة بما يتوافق مع الارتباط الجيني، الذي يعد أحد الأمثلة القليلة كعامل وراثي، وقد تم ملاحظة النتائج الوظيفية والبيولوجية العصبية لأليل (G ل rs1799971)، بأنه يزيد من خطر الإدمان بسبب ارتباطه بزيادة التعزيز التي يسببها الكحول، في حين أشارت دراسة أجريت في تركيا أن تعدد الأشكال (118A>G)، لا يزيد من خطر الإدمان بسبب الاضطرابات النفسية، وأن نسبة خطر الإدمان أكثر بضعفين في الأشخاص الحاملين للأليل مختلف الزيجوت (AG) من الأشخاص الحاملين للأليل الطبيعي (AA) (Türkan et al., 2019).

كما أظهرت دراسات أجريت في مناطق مختلفة من العالم، ومنها أمريكا، أن الأشخاص المدخنين متماثلين الزيجوت للأليل A للجين *OPRM1*، لديهم مستويات عالية من (Mu–Opoid Receptor Binding Potential "MOR BP")، (هو نسبة مواقع المستقبلات المتاحة إلى معامل توزيع التوازن) في المناطق الدماغية كاللوزة الثنائية، المهاد الأيسر والجبهة اليسرى للقشرة الحزامية مقارنة بتلك ذات الأليل G (هو نسخة أو شكل بديل للجين)، كما توضح نتائج التصوير المقطعي الاختلافات الجينية في بروتين MOR انخفاضًا في مستوى هذا البروتين عند المدخنين، وتشير الأدلة السريرية إلى أن الحاملين لـ(*OPRM1* 118A>G polymorphism) لديهم حساسية متزايدة للألم (Ray et al., 2011).

في حين بيّنت دراسة أجريت في البرازيل (Daher et al, (2013 أن الأشخاص الذين يحملون نسخة أو اثنين من أليل (118G) قد سجلوا تعرض أعلى للتدخين من الأشخاص الذين يحملون متماثل الزيجوت للأليل (118A)، وأنه لم يلاحظ اختلافات كبيرة في انتشاره.

كما أن أوضحت دراسة أجريت في أمريكا – مستخدمة تحليل بيانات الصورة الجزيئية – أن هناك تأثيرا من النوع الجيني (*OPRM1* 118A>G) على (MOR BP) على نطاق واسع من أنسجة الدماغ (Peciña et al., 2015).

ودراسة أجريت باستخدام عينات من أمريكا وآسيا (kong et al., 2017) وفرت من 118G mRNA في التجانس الدماغي (Cerebral) (Homogenate)، ويمكن أن يؤدي 118G إلى تقليل 10 أضعاف في مستويات البروتين *OPRM1*، ذلك يشير إلى أن *OPRM1* 118A>G

كان متغير أليلي وظيفيا، له تأثير ضار على كليهما mRNA وإنتاج البروتين، ولوحظ خلال السنوات الأخيرة من خلال بيانات ضخمة جدًا أثبت أن هناك ارتباطًا وثيقًا بين تعدد أشكال (*OPRM1* 118A>G) وإدمان المواد الأفيونية.

وأظهرت دراسة مرجعية مستخدمةً "meta analysis" أن الاعتماد على الكحول له قابلية التوريث في أكثر من 50% من الحالات، وهو ما يشير إلى أن العوامل الوراثية تلعب أدوارًا محورية في الاعتماد على الكحول، ووجد أن ارتباط تعدد الأشكال *OPRM1* 118A>G (A>G)، مرتبطة بعدة عوامل بيئية وجينية، كما بينت هذه الدراسة ارتباطات كبيرة بين مخاطر الاعتماد على الكحول وتعدد الأشكال (118A>G polymorphism)، وجدت فقط في النموذج السائد (Kong et al., 2017)، وأوضحت دراسة أجريت سنة (Ahmed et al., 2018) أثبتت أن النمط الجيني متماثل الأليل A\A كان أعلى تكرارا في كل من الأشخاص المدمنين وغير المدمنين، في حين النمط الجيني مختلف الأليل A\G أعلى تكرارًا في الأشخاص غير المدمنين، ولكن النمط الجيني متماثل الأليل G\G كان أعلى في الأشخاص المدمنين، وأن هناك ارتباطًا كبيرًا للطفرة SNP of rs1799971 118A>G مع الإدمان للمواد الأفيونية، وتوقعوا أن تعدد الأشكال لـ 118A>G لا يغير البنية البروتينية المشفرة، فبدلاً من ذلك قد يكبح نسخ *OPRM1*، وعدد المستقبلات المتاحة؛ ليرتبط مع الأدوية عن طريق تكثيف الكروماتين والنسخ الخاص بالأليل عامل الربط allele specific transcription factor (binding).

لذلك تهدف هذه الدراسة إلى الكشف عن الطفرة الجينية لجين (*OPRM1* 118A>G gene) لمدخنين من مدينة وعلاقتها بإدمان التدخين.

2. المواد وطرق العمل:

1.2 تجميع العينات:

تم تجميع (22) عينة دم عشوائيًّا من أشخاص مدخنين من الذكور من مدينة مصراتة، حيث تم سحب العينات داخل مختبر مصراتة المركزي في المدة ما بين شهر يناير إلى شهر فبراير 2020م، وتم وضعها في أنابيب مانعة للتخثر من نوع (EDTA)، كانت الفئة العمرية للمشاركين في البحث من 15 إلى 40 سنة.

2.2 استخلاص الحمض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين (DNA):

استخلص الحمض النووي الـ(DNA) من عينات الدم التي تم تجميعها، وذلك باستخدام عدة الاستخلاص (Kit) من شركة (QIAGEN)، تم قياس كمية (تركيز) المادة الوراثية بواسطة مقياس الطيف الضوئي (thermo scientific NanoDro machine)، حيث تمت قراءة العينة عند كثافتين بصريتين (260nm) و(280nm)، تم التأكد من سلامة وجودة DNA المستخلص من الدم، وذلك من خلال استخدام جهاز الترحيل الكهربائي وجل الآقاروز Agarose gel.

3.2 تفاعل البلمرة المتسلسل polymerase chain reaction الجين *OPRM1*.

بعد استخلاص DNA والتأكد من جودته باستخدام الترحيل الكهربائي تضخيم الجزء المستهدف من جين *OPRM1* عن طريق تفاعل البلمرة المتسلسل PCR باستخدام بادئ تم اختياره بناء على دراسات بحثية سابقة (Van et al.,2017)، تم التأكد من دقة وخصوصية هذا البادئ (Primer)، باستخدام البرامج والمعلومات الحيوية المتوافرة على شبكة الإنترنت مثل (NCBI)، (Primer Blast)، بعد ذلك تم إجراء الحسابات والشروط اللازمة لعملية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR.

الجدول (1): يوضح البوادئ المستخدمة في تفاعل (DNA)(Van et al., 2017)

الجين	التسلسل	حجم القطعة
OPRM1	3- GAAAATCTCGGTGCTCCTG-5	bp295
	3- GGAGTAGAGGGCCATGATCG -5	

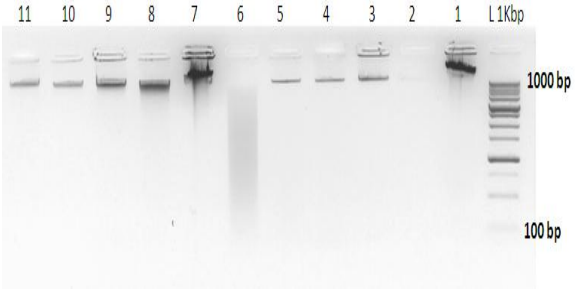
4.2 تحليل التسلسل "Sequencing analysis":

أرسلت العينات إلى معمل قرطاج الدولي للبحوث الجينية بجمهورية تونس، نظراً لعدم توافر هذا التحليل في مختبرات البلاد؛ لإجراء تحليل التسلسل لهذه المنطقة المدروسة من الجين عن (0) فسرت باستخدام برامج قواعد البيانات Finsh TV, CLC softwere and Genome "browser"؛ للتأكد من وجود الطفرة من عدمها على الجين (*OPRM1*).

3. النتائج:

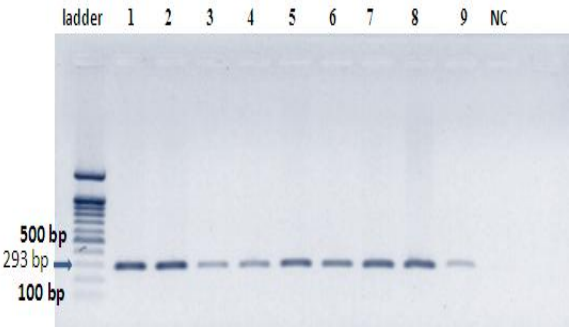
1.3 نتائج استخلاص الحمض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين:

كانت النتيجة بعد الترحيل الكهربائي لمستخلص DNA من العينات المدروسة؛ للتأكد من سلامة وجودة الـDNA على جل الأقاروز بتركيز 1% عند 50 فولت لمدة ساعة ومشاهدتها تحت جهاز الأشعة فوق البنفسجية (UV)، لاحظنا ظهور حزم "Bands" خلال الجل بتراكيز مختلفة وفقاً لاختلاف كمية DNA في كل عينة، مع الأخذ في الحسبان تفاوت دقة الشغل اليدوي من شخص لآخر، كما موضح في الشكل (2)، وقد تراوحت تركيزات الحمض النووي للعينات 22 المدروسة الناتجة من حاصل قسمة قراءة الطيف الضوئي للعينات عند الكثافتين البصريتين 260nm، و280nm بالتوالي، بين (747ng/ul – 13 ng/ul).



الشكل (2): يوضح عينات (DNA) المرحلة على جل الأقاروز

تم استخدام تفاعل PCR لغرض الإكثار أو التضخيم للجزء المخصص للدراسة من جين *OPRM1*، وذلك لغرض إجراء (Sequencing) عليه لكشف وجود هذه الطفرة من عدمها لدى الأشخاص المدخنين قيد الدراسة كانت النتائج، كما موضح في الشكل (3) بعد إجراء الترحيل الكهربائي للـ PCR باستخدام 1% جل الأقاروز، حيث يمثل العمود الأول الدليل الحجمي Ladder بحجم (100–1000) زوج قاعدي، في حين تظهر الحزم بحجم 293 زوجًا قاعديًّا، وتمثل عينات الدراسة. أما عينة NC فهي تمثل الشاهد، حيث لم تظهر العمود NC، أي: حزم لنواتج PCR؛ وذلك لكونها شاهدا لعدم احتوائها على DNA.



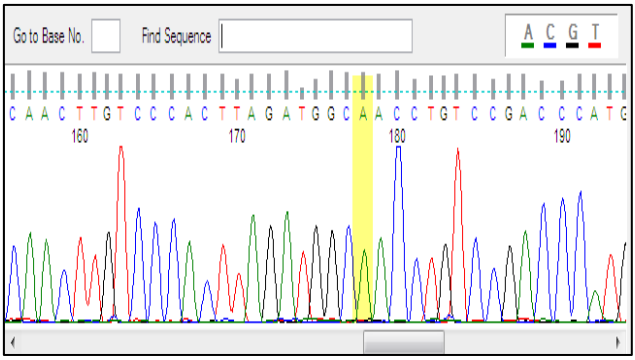
الشكل (3): عينات DNA المرحلة على جل الأقاروز بعد تفاعل البلمرة المتسلسل PCR، حجم ناتج تفاعل البلمرة 293bp، NC→ Negative control

2.3 نتائج تحليل التسلسل:

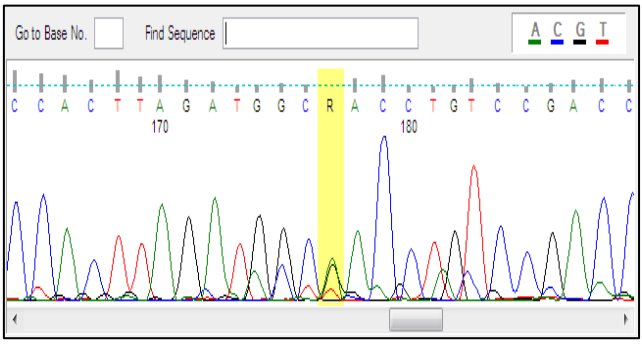
نتائج الـ PCR حللت بواسطة Sanger Sequencing، حيث كشف التحليل عن وجود الطفرة 118A>G في تلات عينات من إجمالي العينات المدروسة (14%)، نوعها " Point mutation Missene"، (تغير في الحمض الأميني إلى حمض أميني آخر ينتج عنه تغير في البروتين الناتج)، كما كشفت نتيجة هذا التحليل طفرات أخرى في المنطقة المستهدفة غير مسجلة على قواعد البيانات، وجدت على التوالي قرب طفرة مسجلة على NCBI، في حين كانت هناك طفرات على الكودون نفسه الذي يحمل طفرة مسجلة على قاعدة البيانات NCBI، ولها تسلسل مرجعي رقمي (rs)، ولكن موقع الطفرة يختلف على نفس الكودون، وكذلك نوع التغير في النيكلوتيدا جدول (2).

الجدول (2): تسلسل الطفرات الموجودة في المنطقة المستهدفة

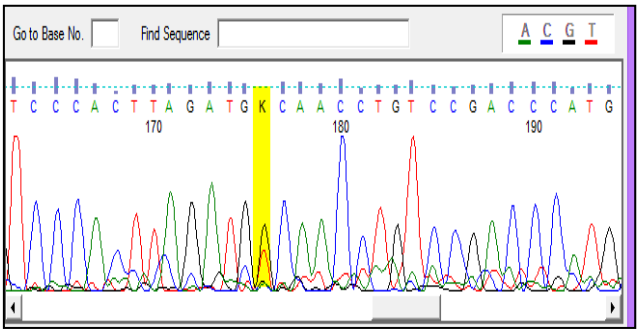
عدد العينات	موقع الطفرة	تسلسل الطفرة	التسلسل الطبيعي	التسلسل المرجعي للطفرة
2	77	GYC	GCC	Rs767553433
1	58	RCC	ACC	غير مسجلة
1	78	GCT	GCC	Rs1002137565
3	118	RAC	AAC	Rs1799971
1	120	WCC	TCC	Rs76546679
1	149	TCM	TCC	غير مسجلة
1	159	ACY	ACC	غير مسجلة
2	174	GAK	GAT	Rs761993670
1	176	GKC	GGC	غير مسجلة
1	187	CAC	GAC	Rs1326577721
1	195	TGY	TGC	Rs199980523



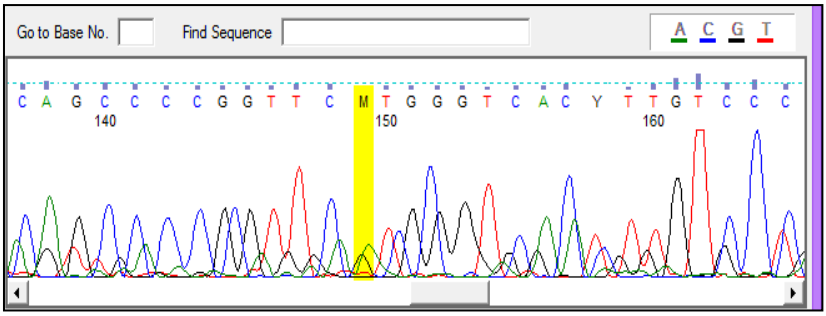
الشكل (4): يوضح تسلسل الجين *OPRM1* الطبيعي على الموقع 118"A" variant NM-000914



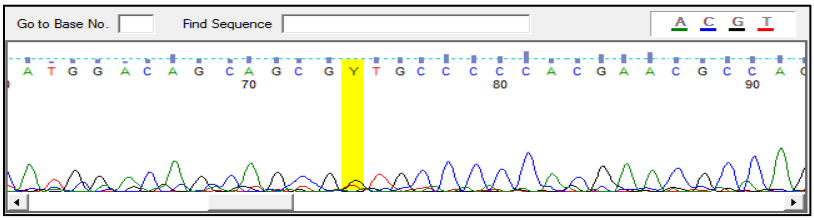
الشكل (5): يوضح الطفرة "R" على الموقع c.118A>G عند التسلسل [AAC] ← Asn→ Asp [RAC]



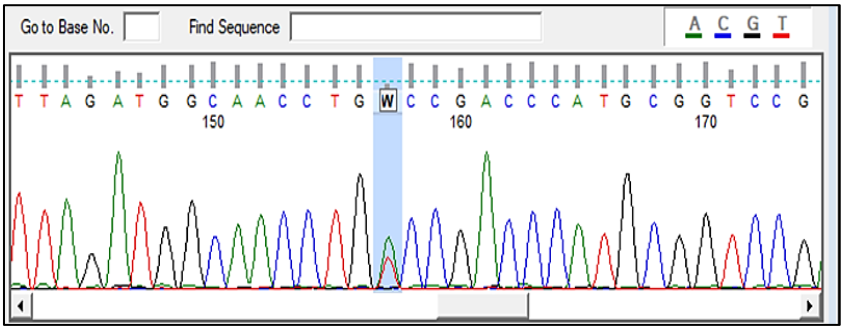
الشكل (6): يوضح "K" عند الموقع c.176G>T عند التسلسل [GGC←[GKC]



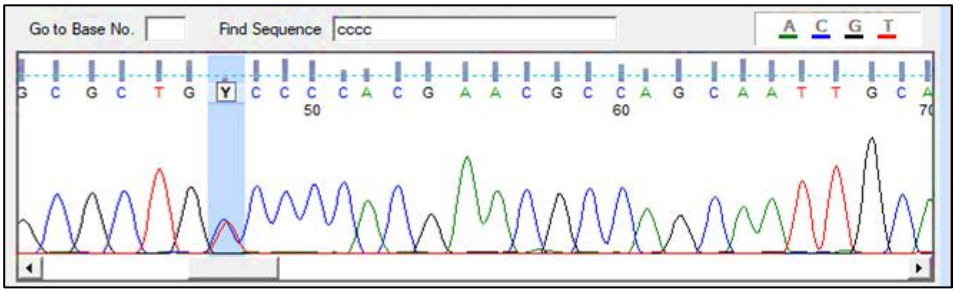
الشكل (7): يوضح الطفرة "M" عند الموقع c.149C>A التسلسل [TCC]←[TCM]



الشكل (8): يوضح الطفرة "Y" عند الموقع c.78 C>T عند التسلسل [GCC]←[GYT]



الشكل (9): الطفرة في موقع c.120 T>A عند التسلسل (TCC) المتغير الـ (WCC)



الشكل (10): الطفرة في موقع c.77C>T عند التسلسل (GCC) المتغير الـ(GYC)

4. المناقشة:

أظهرت الدراسة الحالية وجود الطفرة 118A>G في المنطقة المستهدفة للجين *OPRM1*, "c.118A>G,rs1799971".

في عينة واحدة من العينات المدروسة بنسبة (11%) مسببة استبدال الحمض الأميني بحمض أميني آخر Asn → Asp مما يؤدى إلي زيادة التعبير الجينى "High Expression" للبروتين الناتج الذي يعمل كمستقبل على سطح الخلية للناقل العصبي (الأستيل كولين) والذي بدوره يسبب الإدمان، وتم تصنيفها على أنها غير محددة التأثير سريريًّا بناءً على قاعدة البيانات ClinVar، كما سجلت هذه الطفرة في عدة دراسات سابقة فوفقًا لدراسة أمريكية (Ray et al., 2011).

وجدت هذه الطفرة في 10 حالات من أصل 22 حالة، كما بينت في دراسة مرجعية من بريطانيا (Batol & Hearian, 2013) تضمنت 13 دراسة سابقة من إفريقيا، أمريكا، أوروبا، والهند، ومالي، أن عدد 80 عينة من أصل 642 حالة بنسبة (12%) كانوا حاملين لهذه الطفرة وأغلبهم مدمنين للتدخين، وبذلك اتضح تقارب هذه النسبة مع نسبة نتائج هذه الدراسة.

كما توافقت دراستين أمريكيتين الدراسة الحالية على نفس الطفرة المستهدفة "A>G118" في نفس الجين "*OPRM1*"، أحدهما لأشخاص مدمنين للكحول، 24 عينة من أصل 108 (22%) كانوا حاملين للأليل G، وسجلوا معدلات أعلى في الرغبة للكحول وانتشار تعاطى المخدرات من الأشخاص المتماثلين الأليل A (Wildenberg et al., 2007). بينما الدراسة الأخرى كانت بمشاركة 129 شخص كانوا مدمنين للهروين وجدوا بنسبة 44% منهم لديهم على الأقل نسخة واحدة من الأليل G عند الموقع 118 لاحظنا من خلالها تفاوت في نسبة النتائج قد يكون لاختلاف المادة المؤثرة (Levran et al., 2017).

دراسة تضمنت 86 مشاركًا من القوقاز سجلوا استخدام منتظم للهيروين أكثر بثلاث مرّات من الأسبوع الذي قبله، فتبين أن الحاملين للأليل G118 كانوا أكثر احتمالا في محاولة العلاج من تعاطي الهيروين في مرحلة ما خلال فترة تعاطيهم أكثر من متماثلي الزيجوت (AA118) وهذه في الاعتماد على العلاج من المواد الأفيونية *OPRM1* النتيجة تسلط الضوء على الأهمية والدور المحتمل بالنظر في التركيب الوراثي للجين (Eric et al., 2015).

كما أوضحت نتائج دراسة أقيمت لتحديد نسبة تعدد الأشكال A118G أن متعدد A118G الأشكال متغير بدرجة كبيرة ويتراوح من 2% في الأمريكيين من أصل أفريقي 8–30% في القوقازيين و50% في السكان الآسيويين، كما تم إجراء العديد من الدراسات الجينية لتحديد تأثير

متغير A118G على بداية معالجة المواد الأفيونية والإدمان الأخرى. فكانت النتائج متنوعة للغاية حيث أظهرت بعض الدراسات ارتباطًا مهمًا بين A118G وإدمان المواد الأفيونية بينما فشلت دراسات أخرى في الحصول على مثل هذه الأدلة. كما عززت تطوير إدمان المواد الأفيونية لدى الأفراد الهنود (الذين يعيشون في سنغافورة) ولكن ليس في مجموعات عرقية أخرى مثل مالي والصين (Taqi et al.، 2019).

5. الخلاصة:

تكمن أهمية الدراسة الحالية في الكشف عن الطفرات في جين *OPRM1* بوصفه من الجينات المنظمة لنظام الجسم الداخلي "الألم والسلوكيات التي تسبب الإدمان"، ووجود الطفرات فيه مرتبط مع خطر الإصابة بالإدمان، فقد تطرقنا إلى معرفة أسباب التدخين التي تؤدي إلى إدمانه، وذلك من خلال الكشف على عدة عينات من أشخاص مدخنين عن طريق استخلاص المادة الوراثية DNA من هذه العينات، وقياس تركيزها وجودتها، ومن ثم إجراء عملية البلمرة المتسلسل PCR لتضاعف كمية الجين المدروس "*OPRM1*" باستخدام البادئ المناسب محل الدراسة وإجراء تحليل التسلسل، فكشف عن وجود طفرة 118A>G في عينة واحدة من ضمن (9) عينات بنسبة (11%)، وكانت نتائج هذه الدراسة مطابقة لبعض نتائج الدراسات التي تم مقارنتها، مع تفاوت النسب، مع دراسات أخرى؛ وذلك لأن الفئة الأخرى كانت من متعاطين الكحول والهيروين، وليس التدخين.

6. التوصيات:

من خلال النتائج التي أظهرتها الدراسة الحالية والدراسات السابقة فإننا نوصي بالآتي:

- إجراء تحليل التسلسل "Sequencing analysis" للجين بالكامل لمعرفة عدد الطفرات في المجتمع الليبي.
- التعاون مع أخصائيين نفسيين واجتماعيين لدراسة الحالات التي لديها الطفرة لمعرفة أسبابها وراثية أو اجتماعية.
- دراسة هذه الطفرة في الآباء، في حين وجودها في أحد الأبناء.
- إجراء دراسة شاملة لجميع المتعاطين ومقارنتهم بتصنيفات من حيث العمر، والجنس، والمادة المتعاطي.

- نشر الوعي الصحي داخل المجتمع لأضرار التدخين، والتنبيه على خطورة تأثيره في الجينات بإحداث طفرات يمكن توارثها عبر الأجيال من خلال ندوات دورية.
- إجراء دراسات أخرى مماثلة للتغيرات التي تحدث على المستوي الجيني قد يسببها التدخين.
- التشديد على منع التدخين في الأماكن العامة مع وضع مخالفات للمدخنين حفاظًا على صحة وسلامة المجتمع.

المصادر والمراجع

Ahmed, M., ul Haq, I., Faisal, M., Waseem, D., & Taqi, M. M. (2018). Implication of *OPRM1* A118G polymorphism in opioids addicts in Pakistan: in vitro and in silico analysis. *Journal of Molecular Neuroscience*, *65*(4), 472-479.

Batol, S. A., & Hearian, A. M. (2013). rs1799971 polymorphism and opioid dependence: evidence from a meta-analysis. *Journal of Addiction Research & Therapy*, *4*(5), 1-6.

Eric, A., Aarons, G. A., Powell, B. J., Young, J. D., Lewis, C. C., Weiner, B. J., … & Brownson, R. C. (2015). A Refined Compilation of Implementation Strategies: Results from the Expert Recommendations for Implementing Change (ERIC) Project. *Implementation Science*, *10*(1), 21.

Daher, M., Costa, F. M., & Neves, F. A. (2013). Genotyping the Mu-Opioid Receptor A118G Polymorphism Using the Real- time Amplification Refractory Mutation System: Allele Frequency Distribution Among Brazilians. *Pain Practice*, *13*(8), 614-620.

Kong, X., Deng, H., Gong, S., Alston, T., Kong, Y., & Wang, J. (2017). Lack of associations of the opioid receptor mu1 (OPRM1) A118G polymorphism (rs1799971) with alcohol dependence: Review and meta-analysis of retrospective controlled studies. BMC Medical Genetics, 18, 120.

Levran, O., Randesi, M., Celentano, D., Sherva, R., Yuferov, V., Kreek, M. J., & Ott, J. (2017). Overlapping dopaminergic pathway genetic susceptibility to heroin and cocaine addictions in African Americans. *Journal of Human Genetics*, *62*(4), 467-471.

National Library of Medicine. (n.d.). MedlinePlus. Retrieved from https://www.medlineplus.gov

Peciña, M., Love, T., Stohler, C. S., Goldman, D., & Zubieta, J. (2015). Effects of the Mu opioid receptor polymorphism (OPRM1 A118G) on pain regulation, placebo effects and associated personality trait measures. *Neuropsychopharmacology*, *40*(4), 957-965.

Ray, R., Ruparel, K., Newberg, A., Wileyto, E. P., Loughead, J. W., Divgi, C., Blendy, J. A., Logan, J., Zubieta, J., & Lerman, C.

(2011). Human Mu Opioid Receptor (OPRM1 A118G) polymorphism is associated with brain mu-opioid receptor binding potential in smokers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(22), 9268-9273.

Taqi, M. M., Faisal, M., & Zaman, H. (2019). *OPRM1* A118G polymorphisms and its role in opioid addiction: implication on severity and treatment approaches. *Pharmacogenomics and personalized medicine*, *12*, 361-368.

Türkan, H., Karahalil, B., Kadıoğlu, E., Eren, K., Gürol, D. T., & Karakaya, A. E. (2019). The association between the OPRM1 A118G polymorphism and addiction in a Turkish population. *Journal of Addiction Research & Therapy*, *10*(2), 1-8.

Wildenberg, E. V. D., Wiers, R. W., Dessers, J., Janssen, R. G., Lambrichs, E. H., Smeets, H. J., & Breukelen, G. J. (2007). A functional polymorphism of the μ-opioid receptor gene (OPRM1) influences cue-induced craving for alcohol in male heavy drinkers. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *31*(1), 1-10.