

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**Az illegális forrásokból származó tömény szeszitalokban  
előforduló alifás alkoholok hatása granulociták és  
monociták funkcionális állapotára**

**Pál László**

**Témavezető: Dr. Szűcs Sándor, PhD**



**DEBRECENI EGYETEM  
EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2014.**

## **A doktori értekezés betétlapja**

### **Az illegális forrásokból származó tömény szeszesitalokban előforduló alifás alkoholok hatása granulociták és monociták funkcionális állapotára**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
Az „**Egészségtudományok**” tudományágban

Írta: **Pál László**, okleveles népegészségügyi felügyelő

Készült a Debreceni Egyetem Egészségtudományok doktori iskolája  
(Megelőző Orvostan és Népegészségtan Programja) keretében

Témavezető: Dr. Szűcs Sándor, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Nagy Endre, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Rajnavölgyi Éva, az MTA doktora  
Dr. Paulik Edit, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2014. október 14. 11 óra  
DE ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület könyvtára

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Kiss István, PhD

Dr. Csípő István, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Nagy Endre, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Rajnavölgyi Éva, az MTA doktora  
Prof. Dr. Kiss István, PhD

Dr. Csípő István, PhD

Dr. Paulik Edit, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2014. október 14. 13 óra  
DE ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

# 1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Bár az etanolt tartalmazó italok készítése és fogyasztása szinte egyidős az emberiség történetével, az alkoholfogyasztás mértéke a XIX. század elejétől kezdve jelentősen növekedett, miután egyre nagyobb mennyiségben állítottak elő tömény szeszesitalokat. A szeszipar és a szeszkereskedelem fejlődésével párhuzamosan a XX. század során tovább terjedt az alkoholfogyasztás, mellyel összefüggő akut és krónikus egészségkárosodások napjainkra a dohányzás mellett az egyik legnagyobb népegészségügyi problémává váltak. Az Egészségügyi Világszervezet [World Health Organization (WHO)] legutóbbi, 2011-es jelentése alapján a világon átlagosan az egy főre jutó abszolút alkoholra átszámított alkoholfogyasztás 6,13 liter/év. Legnagyobb az alkoholfogyasztás Európában, ahol az évente megivott alkohol mennyisége közel 15,0 liter/fő. Európa országait összehasonlítva, Magyarország az évi 16,27 liter/fős értékkel a rangsorban a második, míg a világ összes országát figyelembe véve a harmadik helyet foglalja el.

Az alkoholos termékeket terhelő jövedéki adó megfizetésének elkerülése miatt a legális kereskedelem mellett világszerte jelentős az illegális forrásokból származó szeszesitalok értékesítése is. A WHO állásfoglalása szerint nem legális eredetűnek tekintendő minden olyan alkoholos ital, melyet a feketepiacon hatósági zárjegy nélkül

árúsítanak, csempészet útján hoznak forgalomba, házilag állítanak elő, valamint közéjük sorolandók az eredetileg nem emberi fogyasztásra gyártott etanolt tartalmazó készítmények, mint például arcszeszek, parfümök és gyógyászati célra szánt alkoholok. Ellentétben a törvényes kereskedelemben árusított alkoholos italokkal, ezek fogyasztására csak következtethetünk, mivel az ismeretlen körülmények között készített és eladott szeszesitalok mennyiségéről nem állnak rendelkezésre pontos statisztikai adatok. A WHO szakértőinek legutóbbi becslése alapján azonban a világon az egy főre jutó tiszta szeszre átszámított alkoholfogyasztás 28,6 %-a (1,76 liter/fő) illegális forrásokból származik. A hatóságok által nem regisztrált szeszesitalok fogyasztási aránya országonként jelentősen eltérő, a legmagasabb, 47,9% (1,42 liter/fő) azokban az államokban, ahol alacsony az egy főre jutó nemzeti jövedelem, de hányada, 11,2 % (1,18 liter/fő) még a leggazdagabb országokban sem elhanyagolható. Európa egészét figyelembe véve az illegálisan előállított és forgalmazott szeszesitalok átlagosan az összes alkoholfogyasztás 22%-át (2,67 liter/fő) teszik ki, ettől azonban számottevő különbségek mutatkoznak bizonyos közép- és kelet-európai országokban, úgymint Magyarországon, Romániában, Moldovában, Ukrajnában, illetve Oroszországban.

Népegészségügyi szempontból az ellenőrizetlen körülmények között előállított tömény szeszesitalok és házi főzésű pálinkák

megkülönböztetett figyelmet érdemelnek, mivel ezek több olyan komponenst is tartalmazhatnak, amelyek károsíthatják az emberi szervezetet. Előfordulhatnak bennük nehézfémek, így az ólom, az arzén, az antimon, a kadmium, a cink és a réz, melyek a desztilláció során az élelmiszergyártásban nem alkalmazható fémeszközökből kerülhetnek a házilag készített italokba. Az ilyen módon a főzetekbe kerülő nehézfémek közül az arzén és a kadmium a Nemzetközi Rákkutató Intézet [International Agency for Research on Cancer (IARC)] besorolása szerint emberben bizonyítottan (1. kategória), míg az ólom lehetséges karcinogén (2B kategória) hatású. Emellett megtalálható a házi körülmények között készített tömény szeszesitalokban az acetaldehid, mely az alkoholos fermentáció során keletkezik, és nem megfelelő desztilláció esetén feldúsulhat a végtermékben. Az acetaldehid az etanollal együttesen hatva az IARC állásfoglalása alapján emberben szintén bizonyítottan rákkeltő hatású. További szennyezők lehetnek az emberben valószínűleg karcinogén hatású (2A kategória) nitrát-ionok, melyek a lepárlást követően az alkoholfok beállításához használt vízből juthatnak az illegálisan előállított tömény szeszesitalokba. Ugyancsak előfordulhat bennük a rákkeltő vegyületek 2A kategóriájába tartozó etil-karbamát, ami a csonthéjas gyümölcsök magjában lévő amigdalinnal felszabaduló hidrogén-cianid és az etanol kémiai reakciója folyamán képződik. Továbbá gázkromatográfiai vizsgálatok egyértelműen bizonyították, hogy a legális

kereskedelemben kaphatóknál az ellenőrizetlen körülmények között gyártott tömény szeszesitalok és házi főzésű pálinkák az etanol mellett változó mennyiségben és szignifikánsan nagyobb koncentrációban metanolt és nagyobb szénatom számú alifás alkoholokat, így 1- és 2-propanolt, 1- és 2-butanolt, izo-butanolt, valamint izoamil alkoholt is tartalmaznak. Toxikológiai vizsgálatok szerint a nagyobb szénatom számú alkoholok májkárosító hatása többszöröse az etanolénak.

A túlzott alkoholfogyasztás és az alkoholizmus a baleseti és az általános sebészeti, a bel-, az ideg- és az elmeegógyászati kórházi betegfelvételek és ellátások 7-30%-ért tehető felelőssé, ezáltal súlyos gazdasági terhet jelent az egészségügyi ellátórendszer számára. Számos epidemiológiai és klinikai vizsgálat több, mint 60 különböző kórkép létrejöttében igazolta a túlzott alkoholfogyasztás etiológiai szerepét. Közép- és Kelet-Európában a nyugat-európai országokhoz képest különösen magas a 25-64 éves korú lakosság krónikus májbetegségek és májzsugor miatti halálozása. Ugyanakkor az egy főre jutó alkoholfogyasztásban nem állnak fenn ekkora különbségek a nyugat-európai államokhoz képest, ezért a felsorolt közép- és kelet-európai országok lakosságának az Európai Unió átlagnál magasabb krónikus májbetegségek és májzsugor miatti halálozása az illegális kereskedelmi forgalomban értékesített tömény szeszesitalok és házi főzésű pálinkák fogyasztásával, illetve az azokban lévő alifás

alkoholoknak az etanolénál nagyobb hepatotoxikus hatásával is összefüggésbe hozható. Az etanol hepatotoxikus hatásán kívül epidemiológiai tanulmányok, állatkísérletek és in vitro toxikológiai vizsgálatok igazolták, hogy az akut és a krónikus alkoholmérgezésben egyaránt csökken a szervezet celluláris és humorális immunválasza, ezért a túlzott alkoholfogyasztás immunszuppresszióhoz vezet. Ennek következtében az átlagos populációhoz képest a krónikus alkoholisták fokozottan érzékenyek a bakteriális, valamint a vírusos infekciókra. Általánosan elfogadott, hogy az alkoholfüggőségben szenvedőknél a fertőző betegségekre való fogékonyság kialakulásában fontos szerepet játszik az adaptív immunválasz károsodása, így az etanolexpozíció hatására biológiailag releváns plazmakoncentrációknál csökkenhet a T-limfociták antigénspecifikus aktiválódása, majd proliferációja és a mikroorganizmusok destrukciójához szükséges citokinek szintézise, valamint növekedhet a B-limfociták antitest termelése (immunglobulin A és E). Ezen kívül az alkoholistáknál megfigyelt infekciók iránti szuszceptibilitás manifesztációjához a természetes immunválaszban résztvevő granulociták, vagy más néven a polimorfonukleáris leukociták (PMNL-k) funkcionális károsodása is hozzájárulhat. A PMNL-k, mint az emberi vérkeringésben legnagyobb arányban jelenlévő természetes immunkompetens sejtek, meghatározó szerepet játszanak a szervezet baktériumok és vírusok elleni védekezésében. A baktériumok sejtfalában megtalálható kemotaktikus peptidek,

továbbá gyulladásoos citokinek hatására gyorsan és nagyszámban jelennek meg a fertőzés helyén, majd fagocitózist követően elpusztítják a kórokozókat. A baktériumok és vírusok ellen irányuló citotoxikus reakciókban az egyik leghatékonyabb effektor molekula a neutrofil granulociták által termelt szuperoxid-anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), melynek képződését molekuláris oxigénből a redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-oxidáz enzim katalizálja. A  $O_2^{\cdot-}$  -ből további reaktív oxigén intermedierek keletkeznek, mint például hidroxil gyök, perklorát gyök, hidrogén-peroxid és hipohalogenidek. Alkoholistáknál a fertőzésekre adott természetes immunválasz károsodását okozhatják a patogén mikroorganizmusok destrukciójában szintén részt vevő monociták funkcionális állapotában bekövetkezett defektusok is.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Feltételezések szerint a krónikus alkoholistáknál megfigyelt fertőző betegségek iránti fokozott érzékenység biokémiai és immunopathológiai hátterében a mono- és polimorfonukleáris fagocita sejtek effektor funkcióinak szuppressziója áll. Korábbi in vitro vizsgálatok ugyanis kimutatták, hogy az etanol gátolja a PMNL-k  $O_2^{\cdot-}$  termelését, valamint a granulociták és a monociták fagocitózist. Az emberi szervezetbe kerülve a fagocita sejtek funkcionális állapotát azonban önmagukban és az etanollal együttesen hatva szintén befolyásolhatják a feketepiacon vásárolt tömény szeszitalokban és házi főzésű pálinkákban előforduló alifás alkoholok. Ezek közül csak az 1-butanol és az izoamil alkohol granulociták  $O_2^{\cdot-}$  produkciójának gátló hatását írták le. Ezeken az eredményeken kívül nincsenek immuntoxikológiai adatok arról, hogy a többi alifás alkohol milyen hatást fejt ki a PMNL-k szuperoxid-anion termelésére, illetve a granulociták és a monociták fagocitózisára. Ezért kutatásunk keretében célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy befolyásolják-e az alifás alkoholok a mono- és a polimorfonukleáris fagocita sejtek ezen alapvető funkcióit.

Munkánk során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Hogyan hatnak az illegális eredetű tömény szeszitalokban és házi főzésű pálinkákban lévő alifás alkoholok a granulociták  $O_2^{\cdot-}$  termelésére, valamint a PMNL-k és a monociták fagocitózisára önmagukban és etanollal kombinált expozíció esetén?
2. Képesek-e az említett alkoholok biológiailag releváns koncentrációban hatást gyakorolni a granulociták  $O_2^{\cdot-}$  termelésére, a monociták és a granulociták fagocitózisára önmagukban és etanollal együttesen hatva?
3. Alkoholistáknál és nagyivóknál a szervezetbe jutott alifás alkoholok hozzájárulhatnak-e az etanol által indukált immunszuppresszióhoz, ezáltal növelhetik-e körükben a fertőző betegségek iránti érzékenységet?

### **3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

#### **3.1. Granulociták szeparálása a szuperoxid-anion termelés vizsgálatához**

A granulociták szeparálását teljes vérből centrifugálással előállított, a fehérvérsejtek jelentős részét tartalmazó humán „buffy coat” vérkészítményből végeztük. A granulocitákat a preparátumból ülepítéssel nyert fehérvérsejt-dús plazmából szeparáltuk elutriációs centrifuga segítségével. A sejt-dús plazmát állandó áramlási sebesség és fordulatszám mellett juttattuk be az elutriációs kamrába, majd fokozatosan növelve az elutriációs puffer áramlási sebességét különböző méretű fehérvérsejt frakciókat gyűjtöttünk össze. A centrifugálás leállítását követően az elutriációs kamrában maradt granulocitákat kimostuk, ezt követően kicentrifugáltuk, majd Hanks’ oldatban újraszuszpendáltuk. A szeparált granulociták életképességét tripánkék festéssel ellenőriztük, ez alapján az életképes sejtek aránya minden esetben meghaladta a 95%-ot. A PMNL szuszpenzió tisztasága morfológiai vizsgálatok alapján 95% és 98% között változott.

#### **3.2. Granulociták kezelése az alifás alkoholokkal**

A szeparálást követően a granulocitákat 60 percig 37,0 °C-on inkubáltuk Hanks’ oldatban a következő alifás alkoholokkal: etanol,

1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, izo-butanol, izoamil alkohol 12,5; 25; 50; 100; 200 és 400 mM-os végkoncentrációkban. A PMNL-k etanollal és alifás alkoholok keverékével történt egyidejű kezelése során minden alkohol végkoncentrációja 10, illetve 20 mM volt. Az inkubálást követően kicentrifugáltuk a sejteket, majd a felülúszót eltávolítva újra szuszpendáltuk a granulocitákat. A PMNL-k életképességét az alkoholos kezelést követően tripánkéék festéssel ellenőriztük, az életképes sejtek aránya minden esetben 90% fölöttinek bizonyult.

### **3.3. Granulociták szuperoxid-anion termelésének stimulálása és mérése**

A  $O_2^{\cdot-}$  termelést ferricitokrómc szuperoxid-dizmutázzal (SOD) gátolható redukciója alapján spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg. A granulocitákat Hanks' oldatban inkubáltuk forbol-12,13-dibutiráttal (PDBu), illetve N-formil-metionil-leucil-fenilalaninnal (FMLP). Ezek a stimuláló szerek különböző jelátviteli útvonalakon keresztül aktiválják a PMNL-k  $O_2^{\cdot-}$  termelését. A ferricitokrómc  $O_2^{\cdot-}$  általi redukciója miatt bekövetkező abszorbancia változást 550 nm-en mértük. A termelt  $O_2^{\cdot-}$  mennyiségét a redukált ferricitokrómc moláris extinkciós koefficiense alapján számítottuk ki. Az alifás alkoholok  $O_2^{\cdot-}$  termelésre kifejtett gátló hatásának százalékos arányát a következő

képlet alapján számítottuk:  $100 - [(kezelt\ sejtek\ O_2\ \dot{\div}\ termelése/kezeletlen\ sejtek\ O_2\ \dot{\div}\ termelése) \times 100]$ .

### **3.4. Mononukleáris fehérvérsejtek és granulociták szepearálása a fagocitózis vizsgálatához**

A Debreceni Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével és a véradók megfelelő szóbeli és írásbeli tájékoztatását követően egészséges önkéntes egyénektől (n=11) perifériás vért vettünk. A donorok életkora 23-54 év között változott, átlagosan  $31,1 \pm 4,3$  év volt. Az életmódi tényezők lehetséges befolyásoló szerepének csökkentése érdekében csak olyan véradók kerültek kiválasztásra, akik nem dohányoztak, nem fogyasztottak rendszeresen alkoholt, kiegyensúlyozott táplálkozást folytattak, illetve nem álltak gyógyszeres kezelés alatt. A vérmintákat kétlépcsős Ficoll sűrűség gradiensre (1,077 g/ml és 1,119 g/ml) rétegeztük és centrifugáltuk. A centrifugálást követően a mononukleáris sejtek a plazma és az 1,077 g/ml sűrűségű, míg a granulociták a két különböző sűrűségű Ficoll réteg határán halmozódtak fel. Az így kinyert sejteket összegyűjtöttük, majd mostuk Hanks' oldattal. A mononukleáris sejtek és a PMNL-k életképességét tripánkéék festéssel ellenőriztük, az életképes sejtek aránya minden esetben legalább 96-98% volt.

### **3.5. Zimozán részecskék jelzése és opszonizálása a fagocitózis vizsgálatához**

A zimozán részecskéket fluorescein-izotiocianátot (FITC) tartalmazó karbonát pufferben inkubáltuk 37 °C-on 60 percig, majd háromszor mostuk őket Hanks' oldattal. A fluoreszcensen jelölt részecskék opszonizációja 50% humán AB szérumot tartalmazó Hanks' oldatban történt 37 °C-on 30 percig. A jelzett és opszonizált zimozán részecskéket (FITC-OZ) ezt követően mostuk Hanks' oldattal, majd későbbi felhasználásig lefagyasztottuk és -20 °C-on tároltuk.

### **3.6. Fagocitózis vizsgálata**

A szeparálást követően a sejteket 5% inaktivált humán AB szérumot tartalmazó Hanks' oldatban 20 °C-on 30 percig mikroszkóp tárgylemez aljú sejtenyésző kamrákban inkubáltuk a monociták, illetve a PMNL-k kitapasztása céljából. Ezután a tárgylemezhez nem kötődött sejteket intenzív mosással eltávolítottuk. A kitapadt sejtekhez FITC-OZ részecskéket, és különböző koncentrációban etanolt, önmagukban az illegális szeszesitalokban megtalálható alifás alkoholokat, azok keverékét mértük, valamint az etanolt és az alifás alkoholok elegyét adtuk. A vizsgálatok során a kezeletlen sejteket tekintettük kontrollnak. A részecske/sejtszám arányt minden esetben 10:1 volt. Az összemérést követően a sejteket 37 °C-on 60 percig

inkubáltuk. Ezután a sejteket Hanks' oldattal mostuk, majd a nem fagocitált zimoszán részecskék fluoreszcenciáját tripánkék festéssel kioltottuk. A sejteket paraformaldehid oldattal fixáltuk, sejtmagjukat 4',6'-diamidino-2-fenillindollal (DAPI) festettük. A monociták azonosítására indirekt immunfluoreszcens módszert alkalmaztunk. Először CD14 ellenes, majd DyLight 594 fluoureszcens festékkel konjugált IgG monoklonális antitestekkel specifikusan jelöltük a monocitákat. A minták kiértékelését fluoreszcens mikroszkóp segítségével végeztük, randomszerűen kiválasztott látótereken megszámoltuk a sejtek által bekebelezett részecskéket. A fagocitózis mértékét a fagocitózis indexszel (FI) fejeztük ki (100 sejt által bekebelezett részecskék száma/100).

### **3.7. Az eredmények statisztikai elemzése**

A vizsgálatok eredményei hat független kísérletből származtak. A kezeletlen illetve az alifás alkoholokkal kezelt granulociták  $O_2 \cdot^-$  produkciójának, valamint a PMNL-k és a monociták fagocitózisának mértékét ismételt mérések (repeated measures) variancia-analízissel (ANOVA) hasonlítottuk össze Newman-Keuls post-hoc tesztet alkalmazva. A  $p < 0,05$  értéke esetén tekintettük az eredmények közötti különbséget statisztikailag szignifikánsnak.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. Alifás alkoholok hatása granulociták szuperoxid anion termelésére

Eredményeink szerint a PMNL-at etanollal inkubálva 200 mM-os és 400 mM-os koncentrációknál szignifikánsan csökkent a sejtek FMLP indukálta  $O_2^{\cdot-}$  produkciója. A granulocitákat 200 mM 1-propanollal, 400 mM 2-propanollal, 50 mM és 100 mM 1-butanollal, valamint 25 mM, 50 mM, és 100 mM 2-butanollal kezelve, a sejtek FMLP stimuláció esetén szignifikánsan kevesebb  $O_2^{\cdot-}$  termeltek. A PMNL-k kezelése izo-butanollal (100 mM, 200 mM) és izoamil alkohollal koncentrációtól függő módon gátolta a sejtek FMLP indukálta  $O_2^{\cdot-}$  produkcióját. Az inkubáció során keverékben alkalmazva az alifás alkoholokat, azok szintén szignifikánsan gátolták a granulociták  $O_2^{\cdot-}$  termelését ha az egyes alkoholok végkoncentrációja 10 mM, illetve 20 mM volt. Egyetlenegy esetben sem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a kezeletlen és az alifás alkoholokkal kezelt sejtek PDBu-val stimulált  $O_2^{\cdot-}$  produkciója között.

## **4.2. Alifás alkoholok hatása granulociták fagocitózisára**

Etanollal történt kezelés esetén 0,5 mM-os, 1 mM-os, 10 mM-os koncentrációknál szignifikánsan csökkent a PMNL-k fagocitózisa a kezeletlen sejtekhez viszonyítva. A granulociták fagocita funkciójának szignifikáns gátlását tapasztaltuk, ha a sejteket 0,05 mM-os, 0,5 mM-os, 1 mM-os, és 10 mM-os koncentrációban kezeltük metanollal, 2-propanollal, 1- és 2-butanollal. Eredményeink szerint 0,5 mM-ban, 1 mM-ban, és 10 mM-ban alkalmazva az 1-propanolt, izo-butanolt, illetve az izoamil alkoholt szignifikánsan csökkent a PMNL-k fagocita aktivitása. Az alifás alkoholokat 0,05 mM-os, 0,5 mM-os, és 5 mM-os végkoncentrációban tartalmazó keverékkel kezelt granulociták fagocitózis indexe szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kezeletlen sejteké. Összehasonlítva a csak 10 mM etanollal inkubált sejtekkel, a 10 mM etanollal és egyidejűleg 0,05 mM-ban, 0,5 mM-ban, és 5 mM-ban alifás alkoholokat tartalmazó eleggyel kezelt granulociták fagocitáló képessége szignifikánsan tovább csökkent.

### **4.3. Alifás alkoholok hatása monociták fagocitózisára**

Monociták metanollal, etanollal, 1-propanollal, 2-propanollal, 1-butanollal, 2-butanollal, izo-butanollal, valamint izoamil alkohollal történt kezelése esetén 0,005 mM-os, 0,05 mM-os, 0,5 mM-os, 5 mM-os koncentrációk alkalmazásánál figyeltünk meg szignifikáns csökkenést a fagocitózisban a kezeletlen sejtekhez viszonyítva. Az alifás alkoholokat 0,005 mM-os, 0,05 mM-os, 0,5 mM-os, illetve 5 mM-os koncentrációban tartalmazó keverékkel kezelt monociták fagocitózis indexe szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kezeletlen sejteké. Összehasonlítva a csak 10 mM etanollal inkubált sejtekkel, a 10 mM etanollal és egyidejűleg 0,05 mM-ban, 0,5 mM-ban, valamint 5 mM-ban alifás alkoholokat tartalmazó eleggyel kezelt monociták fagocitáló képessége szignifikánsan tovább csökkent.

## 5. MEGBESZÉLÉS

Jelenleg még kevésbé ismert, hogy az illegális eredetű tömény szeszitalokban és a házi főzésű pálinkákban kimutatható alifás alkoholok az immunrendszer sejtjeiben milyen funkcionális károsodásokat okozhatnak. Ezért kutatásunk során arra az alapvető kérdésre kerestük a választ, hogy az etanol mellett a metanol, továbbá a házi főzésű pálinkákban lévő egyéb alifás alkoholok hozzájárulhatnak-e nagyivóknál és alkoholistáknál a fertőző betegségek iránti fokozott érzékenység kialakulásához. Ennek tisztázása érdekében a természetes immunrendszer sejtjeinek, a granulocitáknak és a monocitáknak azon funkciót vizsgáltuk, melyek döntő szerepet játszanak a patogén mikroorganizmusok elpusztításában, ezáltal a szervezet antibakteriális és antivirális védekezésében.

Eredményeink szerint az illegális eredetű tömény szeszitalokban található alifás alkoholok koncentrációtól függő módon szignifikánsan csökkentették a granulociták FMLP-indukálta  $O_2^{\cdot-}$  termelését, továbbá az egyes alkoholok gátló hatásában jelentős különbségek mutatkoztak. Emellett az alifás alkoholok és az etanol keveréke nagy valószínűséggel szinergista módon hatott a sejtekre, mivel az egyedi kezelésekhez képest, kombinált expozíció esetén az alifás alkoholok 2,5-40,0-szer kisebb koncentrációkban, 1,9-12,5-

szer nagyobb gátló hatást okoztak a granulociták  $O_2^{\cdot-}$ produkciónak. Ezzel szemben a PMNL-k PDBu stimulálta  $O_2^{\cdot-}$  termelését a házi készítésű pálinkákban található alifás alkoholok nem befolyásolták. Elvégzett vizsgálataink bizonyították, hogy az alifás alkoholokkal történt kezelés hatására szintén szignifikánsan csökkent a granulociták és a monociták fagocita funkciója. Hasonlóan a  $O_2^{\cdot-}$  produkcióban bekövetkezett változásokhoz, az alifás alkoholok már önmagukban is koncentrációtól függő módon, illetve típusonként eltérő mértékben csökkentették mindkét sejttípus fagocita funkcióit. Eredményeink alapján ugyancsak feltételezhető, hogy kombinált expozíció esetén az etanol és az alifás alkoholok szinergista módon hatottak a granulociták és monociták fagocitózisára. Ugyanis a kizárólag etanollal történt kezelésekhez viszonyítva, kísérleti rendszerünkben az alifás alkoholok keverékét és az etanolt együttesen alkalmazva tovább csökkent a sejtek fagocitáló képessége.

Ennek alapján megválaszolható az a kérdés, hogy mekkora mennyiségű házi készítésű pálinkát szükséges meginni ahhoz, hogy a bennük lévő alifás alkoholok vérplazma koncentrációja elérje azt a legkisebb értéket, mely vizsgálataink során már gátolta a granulociták és a monociták fagocita funkcióit. Az elfogyasztandó térfogat számításához az igazságügyi toxikológiában alkalmazott Widmark képletet használtuk. Figyelembe véve az alifás alkoholok

granulociták és monociták fagocitózisát gátló legkisebb hatásos koncentrációit (granulociták esetében 0,05 mM, monociták esetében 0,005 mM) és az illegális eredetű tömény szeszitalok átlagos alifás alkoholtartalmát (metanol 68,2 mM, 1-propanol 10,5 mM, 1-butanol 2 mM, 2-butanol 5,0 mM, izo-butanol 6,0 mM, izoamil alkohol 15,0 mM) a fagocitózist gátló legkisebb hatásos plazmakoncentráció eléréséhez elfogyasztható 40 %-os házi készítésű pálinka térfogata alifás alkoholonként különböző, granulociták esetében 35,0-1225,0 ml, míg monocitáknál 3,5-400,0 ml között változik.

Az *in vitro* kísérleteink során meghatározott fagocitózist szignifikánsan csökkentő minimális hatásos koncentrációk közel állnak azokhoz az irodalmi adatokhoz, melyeket önkéntes személyeken végzett toxikokinetikai vizsgálatok során határoztak meg. Ezeknek a kísérleteknek az eredménye szerint az alifás alkoholok koncentrációja a vérben egy átlagos, 10 mM-os plazma etanol koncentráció mellett 0,01 mM és 0,1 mM között változott. Granulocitákkal folytatott kísérleteink során a metanol, a 2-propanol, az 1- és a 2-butanol fagocitózist gátló legkisebb hatásos koncentrációja ebbe a tartományba esett, míg monociták esetében még 0,01 mM-nál is kisebb volt. Igazságügyi toxikológiai vizsgálatok szerint azonban alkoholistáknál a metanol és az 1-propanol koncentrációja a vérben már igen magas, 10 mM-os, illetve 0,22 mM-os értéket is elért.

Ennek alapján döntő jelentőségű annak a kérdésnek a tisztázása, van-e realitása annak, hogy akkora térfogatú házi készítésű pálinka kerül elfogyasztásra, amely a Widmark képlet alapján végzett számításaink szerint tartalmazza a fagocitózis gátlásához szükséges alifás alkohol mennyiséget. A veszélyeztetett populáció meghatározásánál pedig mindenekelőtt figyelembe kell venni azt a tényt, hogy Közép- és Kelet-Európa egyes országaiban, így Moldovában, Ukrajnában, Romániában és Magyarországon jelentős nagyságúra tehető az a népesség, amely házi főzésű pálinkákat, így az etanollal egyidejűleg számottevő mennyiségű alifás alkoholokat is fogyaszt. Az ezekben az italokban lévő alifás alkoholok granulocita és monocita funkciókat gátló hatásai azonban az említett államok lakosságának főként azon tagjait érinthetik, akik rendszeresen és nagy mennyiségben isznak házilag készített tömény szeszesitalokat. Ezért az egyik legveszélyeztetettebb csoportba tartoznak az alkalmi nagyivók, akik a WHO definíciója szerint egy hét alatt legalább egy alkalommal 60 gramm, vagy annál több etanolt fogyasztottak. A másik rizikócsoportot azok a 18-29 éves fiatalok alkotják, akiknek körében az utóbbi évtizedekben kialakult az úgynevezett „rohamivás” szokása. Ennek fő jellemzője, hogy rövid időtartam alatt olyan mennyiségű tömény szeszesitalt fogyasztanak el, amely rendkívül súlyos alkoholos befolyásoltságot eredményez, de akár eszméletvesztést, illetve etanol mérgezést is okozhat. Mivel a házi készítésű tömény szeszesitalok olcsóbbak, mint a legális

kereskedelemben kaphatók, feltételezhető, hogy a közép- és kelet-európai országok nagyivói, alkoholistái, valamint „rohamivó” fiataljai ezeket olyan mennyiségben fogyasztják, hogy a szervezetükben az alifás alkoholok vérplazma koncentrációja elérheti azt az értéket, mely a granulociták és a monociták fagocitózisának csökkenéséhez vezethet. Ezért az említett társadalmi csoportok fokozott rizikóval rendelkeznek, és az illegálisan előállított tömény szeszitalok alifás alkoholjai biológiailag releváns koncentrációban fokozhatják az etanol fagocita funkciót gátló hatását, ezáltal növelhetik a fertőző betegségek iránti érzékenységet. Ennek bizonyításához azonban további in vitro és in vivo vizsgálatok szükségesek.

A fagocitózis gátlásának mechanizmusa még nem teljesen ismert. Feltételezések szerint az etanol kedvezőtlenül befolyásolja a fagoszóma képződést. A granulociták és monociták sejtmembránján számos olyan receptor található, melyek meghatározó szerepet játszanak a fagocitózisban [Toll-like-, Fc gamma receptorok (Fc $\gamma$ R)]. A kísérleteink során alkalmazott humán AB szérummal opszonizált részecskék fagocitózisa az Fc $\gamma$ R-kon keresztül zajlik. Az Fc $\gamma$ R-ok nagyobb sűrűségben helyezkednek el a sejtek kettős lipid rétegében található, úgynevezett „membrán lipidotajokban” (MLT), melyek a környezetüktől eltérő, koleszterinben és szfingolipidekben gazdagabb membránrégiók. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a

MLT-k kiemelt szerepet játszanak a receptor-ligand komplexek létrejöttében és az azt követő sejt aktivációs folyamatokban. Az Fc $\gamma$ R-ok az opszonizált partikulumok kötődését követően foszforilálódnak, majd indukálják az aktin polimerizációt, a citoszkeleton átrendeződését, valamint a fagoszóma képződést. Korábbi vizsgálatok bizonyították, hogy az etanol beépülve a sejtek kettős lipid rétegébe károsítja a MLT-k szerkezetét. Ezek alapján feltételezhető, hogy az etanol fagocitózist gátló hatását a sejtmembránban található MLT-receptor komplexek struktúrájának károsításán keresztül fejti ki. Mivel a vizsgált alifás alkoholok az etanolhoz hasonló kémiai szerkezetűek, az említett mechanizmus szerint csökkenthetik a granulociták és monociták fagocitózist. Ennek igazolására azonban további kísérletek szükségesek.

## 6. AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Az illegálisan előállított tömény szeszitalokban előforduló alifás alkoholok koncentrációtól függő módon gátolják a granulociták FMLP-indukálta szuperoxid-anion termelését, valamint a PMNL-k és monociták fagocitózist, illetve etanollal kombinált expozíció esetén feltételezhetően szinergista módon hatnak.
2. Eredményeink alapján lehetséges, hogy szervezetbe jutó alifás alkoholok önmagukban és az etanollal együttesen biológiailag releváns koncentrációban gátolják a granulociták és monociták fagocitózist.
3. Feltételezhető, hogy az illegálisan előállított tömény szeszitalokban és házi főzésű pálinkákban kimutatható alifás alkoholok nagyivóknál, alkoholistáknál és „rohamivó” személyeknél hozzájárulhatnak az etanol által indukált immunszuppresszióhoz, ezáltal körükben fokozhatják a fertőző betegségek iránti érzékenységet.

## **7. AZ EREDMÉNYEK ALKALMAZÁSÁNAK LEHETŐSÉGE**

A krónikus májbetegségek és a májzsugor, az alkoholfogyasztással kapcsolatos sérülések és balesetek, valamint az immunszuppresszió mellett, az illegális szeszesitalok fogyasztása hozzájárulhat az egészségügyi kiadások növekedéséhez. Mivel az ellenőrizetlen forrásokból származó alkoholok fogyasztásának gazdasági hatásai is vannak, ezt figyelembe kellene venniük az egészségügyi szakembereknek és politikai döntéshozóknak. Ezért számukra kutatásunk alapul szolgálhat hatékony preventív intézkedések kidolgozásához, mely által az említett egészségkárosodások megelőzhetők, így módon az egészségügyi költségek is csökkenthetők lennének Közép- és Kelet-Európa országaiban.

## 8. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék külön köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Szűcs Sándornak fáradhatatlan munkájáért és szakértelméért, mellyel az évek során mindvégig támogatott, illetve teljes körű segítségéért az egyetemi doktori értekezés megírásában. Dr. Árnyas Ervinnek, aki szakmai és baráti tanácsaival elősegítette doktori disszertációm elkészítését. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Ádány Róza egyetemi tanárnak, a Debreceni Egyetem Megelőző Orvostani Intézet igazgatójának és Prof. Dr. Balázs Margit egyetemi tanárnak, a Debreceni Egyetem Népegészségügyi Kar dékánjának, hogy biztosították a tudományos munka elvégzéséhez szükséges feltételeket. Szintén köszönettel tartozom Dr. Martin McKee professzornak az European Centre on Health of Societies in Transition (London School of Hygiene and Tropical Medicine) igazgatójának az angol nyelvű közlemények szakmai és nyelvi lektorálásáért. Külön köszönöm Kovács Györgynének laboratóriumi munkámban nyújtott segítségét. Köszönettel tartozom továbbá a Debreceni Egyetem Megelőző Orvostani Intézet minden munkatársának, akik segítségükkel hozzájárultak értekezésem létrejöttéhez. Végül köszönöm menyasszonyomnak és családomnak, hogy végtelen türelmükkel és támogatásukkal segítették disszertációm elkészítését.

A doktori értekezés elkészítését a Nemzeti Fejlesztési Ügynökség (szerződés szám: TÁMOP 4.2.2./B-10/1-2010-0024, TÁMOP 4.2.1./B-09/1/KONV-2010-0007, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0031) és az Emberi Erőforrások Minisztériuma (szerződés szám: 1EVJ 1NB0 EGPL 320) támogatta. Az értekezés alapjául szolgáló kutatások az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósultak meg.

Iktatószám: DEENKÉTK/46/2014.  
Tételszám:  
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Pál László  
Neptun kód: YMGY6G  
Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola  
Mtm azonosító: 10038172

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Pál, L.**, Árnys, E.M., Tóth, B., Ádám, B., Rácz, G., Ádány, R., McKee, M., Szűcs, S.: Aliphatic alcohol contaminants of illegally produced spirits inhibit phagocytosis by human granulocytes. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 35 (2), 251-256, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/08923973.2012.759962>  
IF:1.356 (2012)
2. Árnys, E.M., **Pál, L.**, Kovács, C., Ádány, R., McKee, M., Szűcs, S.: Aliphatic alcohols of illegally produced spirits can act synergistically on superoxide-anion production by human granulocytes. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 34 (5), 844-851, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/08923973.2012.663387>  
IF:1.356



### További Közlemények

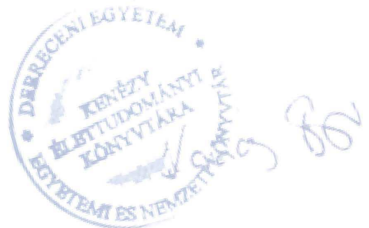
3. **Pál L.,** Árnyas E., Ádány R., Szűcs S.: Illegálisan előállított tömény szeszesitalokban található alkoholok hatása humán monociták fagocitózisára.  
In: Tavaszai Szél. Szerk.: Keresztes Gábor, Doktoranduszok Országos Szövetsége, Budapest, 531-538, 2013.
  
4. **Pál, L.,** Árnyas, E.M., Tóth, B., Ádám, B., Rácz, G., Ádány, R., McKee, M., Szűcs, S.: Consumption of home-made spirits is one of the main source of exposure to higher alcohols and there may be a link to immunotoxicity.  
*Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 35 (5), 627-628, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/08923973.2013.822510>
  
5. **Pál L.,** Árnyas E., Tóth B., Ádány R., Szűcs S.: Illegálisan előállított tömény szeszesitalokban található szennyező alkoholok hatása humán granulociták fagocitózisára.  
In: Fiatal kutatók az egészséges ételmiszerért. Szerk.: Bódi Éva, Fekete István, Kovács Béla, Debreceni Egyetem, Debrecen, 264-269, 2013.

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 2.712**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 2.712**

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.03.07



## 9. ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK

### Előadások:

Árnyas E., Szűcs S., **Pál L.**, Kovács Cs., Ádány R.: Alifás alkoholok hatása granulociták szuperoxid–anion termelésére. Népegészségügyi Képző- és Kutatóhelyek Országos Egyesületének IV. Konferenciája, 2010. szeptember 2-4. Szombathely.

**Pál L.**, Árnyas E., Tóth B., Ádám B., Rácz G., McKee M., Ádány R., Szűcs S.: Aliphatic alcohol contaminants of illegally produced spirits inhibit phagocytosis by human granulocytes. European Medical Students' Conference, 19-22. October 2012. Debrecen, Hungary.

**Pál L.**, Árnyas E., Tóth B., Ádány R., Szűcs S.: Illegálisan előállított tömény szeszesitalokban található szennyező alkoholok hatása humán granulociták fagocitózisára. „Fiatal kutatók az egészséges élelmiszerért” tudományos ülés, 2013. február 19. Debrecen.

**Pál L.**, Árnyas E., Tóth B., Ádány R., Szűcs S.: Illegálisan előállított tömény szeszesitalokban található szennyező alkoholok hatása humán monociták fagocitózisára. Doktoranduszok Országos Szövetségének Tavaszi Szél konferenciája, 2013. május 31-június 2. Sopron.

Árnyas E., **Pál L.**, Ádány R., Szűcs S.: Az illegálisan előállított és forgalmazott alkoholok fogyasztásának népegészségügyi jelentősége Népegészségügyi Képző- és Kutatóhelyek Országos Egyesületének VII. Konferenciája, 2013. szeptember 4-6. Kaposvár.

Kövér Á., **Pál L.**, Szűcs S., Árnyas E., Ádány R., Póka R., Lampé R.: Neutrofil granulociták és monociták fagocita funkciójának jellemzése egészséges és preeclampsias terhesekben Fiatal Nőorvosok IX. Kongresszusa, 2013. november 7-9. Velence

**Pál L.**, Árnyas E., Bujdosó O., Baranyi G., Rácz G., Ádány R., Szűcs S.: Alifás alkohol metabolitok hatása humán granulociták és monociták fagocitózisára. Doktoranduszok Országos Szövetségének Tavaszi Szél konferenciája, 2014. március 21-23. Debrecen.

Árnyas E., **Pál L.**, Baranyi G., Bujdosó O., Ádány R., Szűcs S.: Alifás alkohol metabolitok hatása humán granulociták és monociták fagocitózisára. Népegészségügyi Képző- és Kutatóhelyek Országos Egyesületének VIII. Konferenciája, 2014. augusztus 27-29. Nyíregyháza.

**Pál L.**, Árnyas E., Kiss T., Szűcs S., Ádány R., Balázs M.: Humán granulociták és mononukleáris leukociták szerepe melanoma sejtek migrációjában. Népegészségügyi Képző- és Kutatóhelyek Országos Egyesületének VIII. Konferenciája, 2014. augusztus 27-29. Nyíregyháza.

## **Poszterek:**

**Pál L., Árnýas E., Kovács Cs., Ádány R., Szűcs S.:** Combined effects of aliphatic alcohol contaminants of home made spirits on superoxide-anion production by human granulocytes. Népegészségügyi Képző- és Kutatóhelyek Országos Egyesületének V. Konferenciája, 2011. augusztus 31-szeptember 2. Szeged.

**Pál L., Árnýas E., Tóth B., Ádány R., Szűcs S.:** Effect of aliphatic alcohol contaminants of illegal spirits on phagocytosis by human granulocytes. Népegészségügyi Képző- és Kutatóhelyek Országos Egyesületének VI. Konferenciája, 2012. szeptember 5-7. Budapest.

**Pál L., Árnýas E., Ádány R., Szűcs S.:** Effect of aliphatic alcohols of illegally produced spirits on phagocytosis by human monocytes Népegészségügyi Képző- és Kutatóhelyek Országos Egyesületének VII. Konferenciája, 2013. szeptember 4-6. Kaposvár.