

## **Doktori (PhD) értekezés tézisei**

# **Alifás alkoholok és metabolitjaik hatása monociták és polimorfonukleáris leukociták funkcionális állapotára és a tömény szeszesitalfogyasztás miatti egészségkockázat populációs alapú becslése**

Marozsánné Bujdosó Orsolya

Témavezető: Dr. Szűcs Sándor



**DEBRECENI EGYETEM**

Egészségtudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2021

**Alifás alkoholok és metabolitjaik hatása monociták és polimorfonukleáris leukociták  
funkcionális állapotára és a tömény szeszesitalfogyasztás miatti egészségkockázat  
populációs alapú becslése**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az Egészségtudományok tudományágban

Írta: Marozsánné Bujdosó Orsolya okleveles népegészségügyi szakember

Készült a Debreceni Egyetem Egészségtudományok Doktori Iskolája  
(Megelőző Orvostan és Népegészségtan programja) keretében

Témavezető: Dr. Szűcs Sándor

**Az értekezés bírálói:**

Lajszné Dr. Tóth Beáta, PhD

Dr. Papp András, PhD

**A bírálóbizottság:**

elnök: Prof. Dr. Paragh György, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Cseh Károly, az MTA doktora

Prof. Dr. Paulik Edit, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2021. június 7. 11:00 (online formátum)

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni, úgy jelezze az egdi@unideb.hu e-mail címre küldött üzenetben 2021. június 4. 14:00 óráig. A határidő lejáratát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

## Bevezetés

Számos kulturális, vallási és társadalmi hagyomány része az alkoholfogyasztás, mely kellemes érzetet vált ki a fogyasztóknál. A szeszesitalokat rendszeresen fogyasztók közül sokan tudnak az etanol egészségkárosító, pszichoaktív és függőséget előidéző hatásairól. Ennek ellenére, az alkoholfogyasztás – különösen annak túlzott mértékű formája – világszerte az egyik legjelentősebb népegészségügyi, társadalmi és gazdasági probléma. Az Egészségügyi Világszervezet [World Health Organization (WHO)] legutóbbi adatai alapján, a világon a 15 évnél idősebb korú lakosság körében az éves abszolút etanolra átszámított alkoholfogyasztás 2016-ban átlagosan 6,4 liter/fő volt, ami napi 13,9 gramm etanolnak felelt meg. Ugyanebben az évben a Föld 15 évesnél idősebb korú lakosságának 43,0%-a, mintegy 2,35 milliárd fő volt rendszeres alkoholfogyasztó, vagyis azok a 15 éves és annál idősebb egyének, akik a megkérdezésük előtti 12 hónap során ittak valamilyen szeszesitalt. Körükben lényegesen több, 15,1 liter/év (32,8 gramm/nap) az egy főre jutó alkoholfogyasztás. A világon számottevő, 18,2% az alkalmi nagyivók, vagyis azoknak a férfiaknak és nőknek az aránya, akik havonta legalább egy alkalommal egyszerre 60 gramm, illetve 40 gramm abszolút alkoholnak megfelelő szeszesitalt fogyasztottak. Ugyancsak jelentős eltérések mutatkoztak az elfogyasztott alkohol mennyiségében a WHO különböző régióiban. A világon Európában a legnagyobb, 10,0-12,4 liter/év az egy főre eső alkoholfogyasztás. Az európainál valamivel kisebb, 7,5-9,9 liter/fő volt az alkoholfogyasztás a WHO amerikai és a Nyugat Csendes-óceáni Régióiban, és az Afrikai Régió néhány országában. A legalacsonyabb volt az alkoholfogyasztás, kevesebb, mint 2,5 liter/fő/év a WHO Kelet-mediterrán Régiójában, valamint az Afrikai és a Dél-kelet Ázsiai Régiókban.

A legális kereskedelemből, azaz regisztrált forrásokból beszerzett mellett, a hatóságok által nem regisztrált forrásokból is kerülhetnek szeszesitalok a fogyasztók asztalára. A WHO definíciója szerint regisztrált italféleségek mindazok az alkoholok, amelyek zárjeggyel ellátottak, többnyire a boltok polcairól származnak, valamint készítésük szigorú szabályok betartása mellett valósul meg. Ezzel szemben a nem regisztrált forrásból származó szeszesitalok mind alapanyagukat és előállításukat, mind pedig minőségüket tekintve ellenőrizetlenek.

Nem regisztrálnak minősülnek azok a házi készítésű szeszesitalok, amelyeket adott országban engedélyezett mennyiségen felül előállítottak elő, ezek után rendszerint nem fizetnek jövedéki adót. Az is nem regisztrált fogyasztásnak számít, ha egy országban regisztrált alkoholos terméket egy másik országban isznak meg. Ilyenek a csempészett és újrácímkezett italok. A nem emberi fogyasztásra szánt etanolt tartalmazó készítmények, például kölnik, parfümök,

gyógyászati alkoholok, valamint a házilag, vagy iparilag illegálisan készített szeszesitalok fogyasztása szintén a nem regisztrált kategóriába tartozik. A Földön 2016-ban az egy főre jutó abszolút etanolra átszámított alkoholfogyasztás 25,5 %-a (1,8 liter/fő) nem regisztrált forrásokból származott. A 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. Nyugat-Európaéhoz képest bizonyos közép- és kelet-európai (KKE) országokban a különösen nagy a nem regisztrált szeszesitalok, ezen belül a gyümölcsből készült házi főzésű pálinkák fogyasztási aránya. A 26 európai ország közül Moldovában itták a legtöbb (5,6 liter/fő, 36,8 %), míg Magyarországon a legkevesebb (1,5 liter/fő, 13,1 %) nem regisztrált szeszesitalt.

Bár az elfogyasztott szeszesitalokkal a legnagyobb mennyiségben etanol jut be a szervezetbe, az alkoholos italok több olyan anyagot is tartalmazhatnak, amelyek toxikus és karcinogén hatásai miatt közvetlenül, vagy metabolitjaik formájában veszélyt jelentenek az emberi egészségre. Ezeknek a mennyisége a különböző típusú szeszesitalokban változó, koncentrációjuk nagymértékben függ a gyártás során felhasznált alapanyagoktól, az alkoholos fermentáció körülményeitől, a tömény szeszesitalok esetében a lepárlás technológiájától, illetve a desztilláció során alkalmazott fémeszközök minőségétől. Ennek következtében a kész szeszesitalok tartalmazhatnak etil-karbamátot, nitrát-ionokat, melyek a Nemzetközi Rákkutató Intézet [International Agency for Research on Cancer (IARC)] állásfoglalása szerint emberben valószínűleg rákkeltő (2A kategória) hatásúak. Az alkoholos erjedés során keletkezhet még acetaldehid, mely önmagában valószínűleg, míg az etanollal együttesen hatva emberben bizonyítottan rákkeltő hatású (1. kategória). Az alkoholos fermentáció során az etanol mellett egyéb alifás alkoholok (EAA-k), úgymint metanol és kettőnél több szénatom számú alkoholok, 1- és 2-propanol, 1- és 2-butanol, izobutanol, valamint izoamil alkohol is keletkezik. Ezért analitikai vizsgálatok szerint valamennyi szeszesitaltípusban az etanol mellett különböző mennyiségben az EAA-k is kimutathatók. A legkisebb a koncentrációjuk a sörben (85 mg/l), nagyobb a borban (319 mg/l), míg a legmagasabb a gyümölcsből készült tömény szeszesitalokban (1836 mg/l). Bár a különböző alapanyagok és a gyártási körülmények miatt a regisztrált, és az illegálisan házilag, vagy iparilag előállított nem regisztrált szeszesitalok eltérő mennyiségben tartalmazhatnak EAA-kat, a bennük lévő EAA-k koncentrációjának összehasonlítását csak néhány kutatócsoport végezte el. Másrészt a szakirodalomban jelenleg található tanulmányokban ellentmondásos eredményeket közöltek arra vonatkozóan, hogy

különböző-e a regisztrált és nem regisztrált szeszesitalok EAA tartalma. Egy viszonylag kisszámú mintán végzett vizsgálat szerint a regisztrált tömény szeszesitalokhoz képest az EAA-k koncentrációja szignifikánsan magasabb volt a nem regisztrált tömény szeszes italokban. Egy másik kutatás során olyan italsoportokat hasonlítottak össze, melyekben több európai országból származó regisztrált és nem regisztrált sör, bor és tömény szeszesitalminta is volt. A tanulmányban közölt eredmények azt mutatták, hogy az EAA-k koncentrációja a regisztrált szeszesitalokban volt szignifikánsan nagyobb. Annak ellenére, hogy ebben a vizsgálatban nagyszámú mintát elemeztek, a kapott eredmények statisztikai összevetésénél torzításhoz vezethetett az, hogy a különböző szeszesitaltípusok EAA tartalma jelentősen eltér egymástól.

Epidemiológiai tanulmányok igazolták, hogy mind a regisztrált, mind a nem regisztrált szeszesitalok túlzott mértékű fogyasztása jelentősen hozzájárul a globális betegségteherhez. A WHO 2018-as kiadványa szerint 2016-ban világon az összes haláleset 5,3%-a, férfiaknál évente 2,3 millió, nőknél 0,7 millió, összesen 3,0 millió haláleset, valamint az egészségkárosodással korrigált életévek [Disability Adjusted Life Years (DALYs)] 5,1%-a, férfiak esetében 106,5 millió, nők esetében 26,1 millió, összesen 132,6 millió DALYs a túlzott alkoholfogyasztásnak volt tulajdonítható. Emellett epidemiológiai tanulmányok igazolták, hogy az szeszesitalok túlzott mértékű fogyasztása több, mint 200 betegség kialakulásával hozható összefüggésbe, közülük népegészségügyi szempontból a legjelentősebbek a sérülések és balesetek, a emésztőrendszeri betegségek, a szív- és érrendszeri betegségek, a fertőző betegségek, a daganatos megbetegedések és az alkoholfüggőség. Az egészségkárosító hatásokat azonban az egyén által elfogyasztott szeszesital mennyiségén kívül befolyásolhatja a szeszesital típusa (sör, bor, tömény szeszesital) és minősége is. Bár korábbi kutatások szerint a mérsékelt alkoholfogyasztás csökkentheti a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának kockázatát, de a legújabb eredmények szerint az etanolnak ez az egyetlen pozitív hatása nem kompenzálja az alkoholfogyasztás negatívumait.

Az alkoholfogyasztással összefüggésbe hozható halálozás jelentős népegészségügyi probléma egyes KKE országokban. Az ezzel kapcsolatos mortalitás a felnőtt lakosság körében Moldovában (112,52/100 000 fő), Szerbiában és Magyarországon (124,53/100 000 fő), Oroszországban (129,88/100 000 fő), Ukrajnában (191,22/100 000 fő), Lengyelországban (72,29/100 000 fő), Romániában (194,62/100 000 fő) még 2017-ben is magasabb volt a nyugat-európai országok átlagánál (47,97/100 000 fő). Ennek egyik lehetséges oka az, hogy a lakosaik az európai átlagnál nagyobb arányban fogyasztanak a magas etanol tartalmú italokat. Például

Magyarországon, Romániában, Szlovákiában, Litvániában, Belorussziában, Ukrajnában, Oroszországban és Moldovában az összes regisztrált szeszesital mennyiségének 16-52%-a tömény szeszesital. Ezekben az országokban azonban a tömény szeszesitalok fogyasztási aránya valószínűleg nagyobb, mivel a regisztráltak mellett isznak nem regisztrált tömény szeszesitalokat is, legfőképp gyümölcsből készült házi főzésű, nagy etanokoncentrációjú italokat. Másrészt toxikológiai vizsgálatok igazolták, hogy az EAA-k májkárosító hatása többszöröse az etanolénak. Ezért feltételezhetően a tömény szeszesitalok fogyasztásával, illetve a bennük lévő EAA-nak az etanolénál nagyobb hepatotoxikus hatásával is összefüggésben állhat az, hogy amint azt az 5. ábra mutatja, az említett KKE országokban az európai uniós átlagnál 1990 és 2019 között magasabb volt a krónikus májbetegségek és a májzsugor miatti halálozás mértéke. Bár 2010 óta a májcirrózis okozta halálozás Közép-Európában csökkenő tendenciát mutatott, de itt még 2019-ben is 1,6-szorosa (8,47/100 000 fő), míg a kelet-európai országokban 1,9-szerese (10,05/100 000 fő) volt az európai uniós átlagnak (5,28/100 000 fő).

Az alkohol krónikus májbetegségek és májzsugor kialakulását előidéző hepatotoxikus hatásán kívül számos állatkísérlet és epidemiológiai tanulmány bizonyította, hogy az etanol csökkenti a szervezet természetes és adaptív immunválaszát, ezért a túlzott alkoholfogyasztás immunszuppressziót okoz. Emiatt a krónikus nagyivók és az alkoholfüggésben szenvedők fokozottan érzékenyek a bakteriális és vírusos fertőző betegségekre. Körükben magasabb a tüdőgyulladás, a tuberkulózis, a *Humán immundeficiencia vírus (HIV-1)*, a *Hepatitis B* és *C* fertőzések prevalenciája, valamint az infekciók okozta halálozás. Ennek hátterében részben a patogén mikroorganizmusok bekebelezésében és elpusztításában fontos szerepet játszó monociták és polimorfonukleáris leukociták (PMNL-k) – másnéven granulociták – funkcionális károsodása állhat. Előző vizsgálatok bizonyították, hogy az etanol csökkenti a PMNL-k szuperoxid-anion termelését, illetve a PMNL-k és a monociták fagocita aktivitását. Korábbi kísérleteink azt mutatták, hogy a szeszesitalokban található EAA-k, az etil-alkoholhoz hasonlóan csökkentik a humán PMNL-k szuperoxid-anion termelését, valamint a PMNL-k és a monociták fagocitózist. A szeszesitalokkal elfogyasztott alifás alkoholok a májban az alkohol-dehidrogenáz (ADH) enzim katalizálta folyamat során metabolizálódnak, az etanol acetaldehiddé, a metanol formaldehiddé az 1-propanol 1-propanallá, a 2-propanol acetonná, az 1-butanol 1-butanallá, a 2-butanol 2-butanallá alakul. Ezek a metabolitok még veszélyesebbek lehetnek az emberi egészségre, mint az eredeti molekulák. Közülük állatkísérletekben csak a

formaldehid, az acetaldehid és az aceton toxikus hatásait vizsgálták, emberben ugyanezeknek a vegyületeknek az egészségkárosító hatásai ismertek.

Korábbi kutatások igazolták, hogy a krónikus nagyivók és az alkoholfüggőségben szenvedők körülbelül 20-30%-a szenved alkoholos májbetegségekben, beleértve a krónikus májgyulladást és májsugort. Az alkohol okozta májkárosodás gyulladással járó folyamatok következménye, és összefüggésben állhat a PMNL-k májba történő fokozott migrációjával. A folyamat elindításáért a gyomor-bélrendszerben található baktériumflórából származó peptidek tehetők felelőssé. Ezek a molekulák kemotaktikus ágensként fokozhatják a PMNL-k szöveti infiltrációját, majd az aktivációját idézhetik elő. In vitro kísérletek szerint az etanol és a bakteriális eredetű peptidek együttesen növelik a PMNL-k migrációs képességét, így krónikus nagyivóknál és alkoholfüggőknél hozzájárulhatnak a sejtek fokozott szöveti infiltrációjához. Ezen kívül előző vizsgálatok igazolták, hogy az etanol beépülhet a sejtmembrán kettős foszfolipid rétegébe, ezáltal károsodhat a membrán fizikai struktúrája, és nemcsak a PMNL-k migrációs képessége, hanem a membrán fluiditása is növekedhet. A membrán fluiditás változása összefüggésben állhat több krónikus gyulladással járó betegség kialakulásával.

Bár az alkoholfogyasztás jelentős egészségkockázattal jár, ennek a populációs alapú becslését eddig csak egy kutatócsoport végezte el. Elemzésük során 16 európai országból származó, nem regisztrált szeszitalminta etanol és EAA koncentrációjának ismeretében az expozíció populációs alapú becsléséhez Monte Carlo valószínűségi szimulációt alkalmaztak. Számításaik során figyelembe vették a teljes európai felnőtt lakosság egy főre jutó abszolút alkoholfogyasztását, átlagos testtömegét és a születéskor várható átlagos élettartamát, valamint az alifás alkoholoknak azt a dózist, amely még nem okoz káros hatást [No Observed Adverse Effect Level (NOAEL)]. Vizsgálatuk során arra a következtetésre jutottak, hogy a nem regisztrált szeszitalok fogyasztása esetén kizárólag az etanolexpozíció jelent fokozott egészségkockázatot. Kockázatbecslésüknél azonban csak a nem regisztrált szeszitalok EAA tartalmával számoltak, és nem vették figyelembe a nemek közötti, valamint a teljes populáción belül mutatózó különbségeket az alkoholfogyasztás mértékében.

## 1. A kutatás célkitűzései

A tömény szeszesitalok túlzott fogyasztásával járó egészségkockázat becsléséhez, az italok etanol tartalmán kívül fontos meghatározni az azokban lévő EAA-k koncentrációját is. A regisztrált, és a nem regisztrált szeszesitalok, különösen a tömény szeszesitalok összetétele eltérhet egymástól, a szakirodalomban azonban a jelenleg található tanulmányok ellentétes információt nyújtanak ezeknek a szeszesitaloknak az EAA tartamáról. Ezért kutatásunk egyik célja volt nagyszámú, regisztrált és nem regisztrált tömény szeszesital EAA tartalmának a szisztematikus vizsgálata és összehasonlítása.

1. Munkánk során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy van-e különbség a regisztrált és a nem regisztrált tömény szeszesitalok EAA koncentrációjában.

A humán immunrendszer sejtjein az EAA-k metabolitjai közül eddig csak az acetaldehid hatását vizsgálták, és megállapították, hogy az csökkenti a PMNL-k és a monociták fagocitózisát. Korábbi kísérleteink azt mutatták, hogy a szeszesitalokban található EAA-k, az etil-alkoholhoz hasonlóan csökkentik a humán PMNL-k szuperoxid-anion termelését, valamint a PMNL-k és a monociták fagocitózisát. A szervezetben a tömény szeszesitalokban lévő EAA-k metabolitjai is befolyásolhatják a fagocitózist, de erre vonatkozóan még nincsenek adatok. Ezért a kutatásunk másik célja volt az EAA-k metabolitjainak a PMNL-k és a monociták fagocita funkciójára gyakorolt hatásának vizsgálata. Munkánk során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

2. Befolyásolják-e a tömény szeszesitalokban kimutatható EAA-k metabolitjai a PMNL-k és a monociták fagocitózisát individuális és acetaldehiddel kombinált expozíció esetén?
3. Képesek-e a tömény szeszesitalokban lévő EAA-k metabolitjai toxikológiailag releváns koncentrációban hatást gyakorolni a PMNL-k és a monociták fagocitózisára individuális és acetaldehiddel kombinált expozíció esetén?
4. Krónikus nagyivóknál és alkohol függőségben szenvedőknél hozzájárulhatnak-e a tömény szeszesitalokban kimutatható EAA-k metabolitjai az etanol által indukált immunszuppresszióhoz, ezáltal növelhetik-e körükben a fertőző betegségek iránti érzékenységet?

In vitro kísérletek kimutatták, hogy az etanol beépül a PMNL-k sejtmembránjába, ezáltal növeli annak a fluiditását. A tömény szeszesitalokban lévő EAA-k hatását a PMNL-k membrán fluiditására és migrációjára azonban még nem tanulmányozták. Ezért kutatásunk további célja volt ennek a vizsgálat. Munkánk során az alábbi kérdésre kerestük a választ:

5. Befolyásolják-e a tömény szeszesitalokban kimutatható EAA-k a PMNL-k membrán fluiditását és migrációját individuális és etanollal kombinált expozíció esetén?

A nem regisztrált tömény szeszesitalokban az EAA-k koncentrációja eltérhet a regisztráltakétól, így a fogyasztásukból adódó egészségkockázat is különbözhet. Jelenleg azonban nem rendelkezünk adatokkal arra vonatkozóan, hogy a van-e különbség a regisztrált és a nem regisztrált tömény szeszesitalok fogyasztásából adódó egészségkockázat között. Ezért kutatásunk során az alábbi kérdésre kerestük a választ:

6. Figyelembe véve a nemek közötti, továbbá az egy főre jutó abszolút etanolra átszámított alkoholfogyasztásban mutatkozó eltéréseket, van-e különbség a regisztrált és a nem regisztrált tömény szeszesitalok fogyasztásából adódó egészségkárosodás kockázata között populációs átlagfogyasztás esetén, valamint krónikus nagyivók és alkoholfüggőségben szenvedők körében?

## **2. Anyagok és módszerek**

### **3.1. Felhasznált tömény szeszesitalminták**

Kutatásunk során összesen 206 tömény szeszesitalmintát vizsgáltunk. Ezek a szeszesitalok 17 európai és 4 tengerentúli országból származtak. A 206 mintából 119 regisztrált, 87 pedig nem regisztrált forrásból származott. A regisztrált italokat iparilag állították elő és a mintákat zárjeggyel ellátott üvegekből vettük. Ebbe a csoportba 34 pálinka, 25 whisky, 18 vodka, 18 brandy, 7 rum, 6 ízesített szeszesital, 5 gin, 3 tequila, 1 ouzo, 1 grappa és 1 abszint minta tartozott. A nem regisztrált szeszesitalminták magánszemélyektől, kisüzemi pálinkafőzdekből, illetve szabadtéri piacokról származtak. A regisztrált és nem regisztrált tömény szeszesitalokat aszerint csoportosítottuk, hogy milyen alapanyagokból készültek. Az első csoportba tartoztak a gyümölcsből előállított szeszesitalok, a második csoportot alkották a gabonafélékből gyártott szeszesitalok, a harmadik csoportba tartoztak az egyéb szeszesitalok, melyek ismeretlen alapanyagból, illetve fermentált agavéből és melaszból készültek. A mintákat a későbbi felhasználásig 4 °C-on tároltuk.

### **3.2. A tömény szeszesitalminták gázkromatográfiás analízise**

Az összegyűjtött tömény szeszesitalminták alifás alkohol tartalmának meghatározása gázkromatográfiás/tömegspektrometriás (GC/MS) módszerrel történt. A Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Karának Népegészség- és Járványtani Intézetében rendelkezésünkre álló Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) GC/MS rendszer egy HP 5890 gázkromatográfából, egy HP 5973 tömegszelektív detektorból (MSD) és egy Agilent 7683 automata injektorból áll (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). A mintákból kimutatni kívánt metanol, etanol, 2-butanol, 1-propanol, izobutanol, 1-butanol, izoamil-alkohol és a belső standardként használt acetonitril elválasztása HP-FFAP (free fatty acid phase) (30 x 0,2 mm belső átmérő, 0,33 µm rétegvastagság) kapilláris oszlop segítségével történt (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA). A GC/MS analízisek során héliumot alkalmaztunk vivőgázként 3,0 bar állandó nyomáson. A mintákat „splitless” módban 200 °C hőmérsékleten injektáltuk. A tömény szeszesitalmintákban lévő alifás alkoholok mennyiségi meghatározására a GC/MS rendszer kalibrációját követően került sor.

### **3.3. A mononukleáris sejtek és a polimorfonukleáris leukociták szeparálása**

Kísérleteink során egészséges önkéntes donoroktól, megfelelő tájékoztatást követően 18 ml vénás vért vettünk etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA) tartalmazó csövekbe a Debreceni

Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével (engedélyszám: DE OEC RKEB/IKEB 3649-2012). A női donorok száma 8, a férfiaké 7 volt. Az önkéntesek életkora 22-46 között változott, az átlagéletkoruk pedig  $32,2 \pm 10,45$  év volt. Annak érdekében, hogy exogén tényezők ne befolyásolják a kísérleti eredményeket, csak olyan donoroktól vettünk vért, akik rendszeresen nem fogyasztanak, vagy a vérvétel előtti 24 órában nem fogyasztottak alkoholt, nem dohányoznak, valamint nem állnak gyógyszeres kezelés alatt. A sejteket Ficoll sűrűség gradiens centrifugálással szeparáltuk.

### **3.4. A monociták és a polimorfonukleáris leukociták fagocitózisának vizsgálata**

A monociták és a PMNL-k fagocitózisának meghatározásához a sejteket ( $3 \times 10^5$  sejt/cella) inaktivált humán AB szérumot tartalmazó Hanks' oldatban szuszpendáltuk, majd sejttenyésztő kamrákban kitapasztottuk. A kitapadt sejteket fluoreszcein izotiocianáttal jelzett opszonizált zymosan részecskékkel (FITC-OZ) és különböző koncentrációban alifás alkohol metabolitokkal inkubáltuk 1 órán keresztül  $37^\circ\text{C}$ -on. A monociták és PMNL-k kezelése során alkalmazott metabolit koncentrációk a következők voltak: az acetaldehid esetében a koncentráció 0,005 mM-10 mM közötti, az 1-propanal, a formaldehid, az aceton, az 1-butanol és a 2-butanon esetében 0,0005 mM-0,05 mM közötti tartományban volt. Kezeltük még a sejteket az előbb felsorolt metabolitok 0,0005-0,05 mM-os keverékével önmagában, és 0,1 mM acetaldehid jelenlétében. A vizsgálatok során a kezeltlen sejteket tekintettük kontrollnak. A minták kiértékelését Axioplan fluoreszcens mikroszkóp (Zeiss, Oberkochen, Németország) segítségével végeztük, randomszerűen kiválasztott látótereken megszámoltuk a sejtek által bekebelezett részecskéket. A fagocitózis mértékét a fagocitózis indexel (FI) fejeztük ki ( $100$  sejt által bekebelezett részecskék száma/100).

### **3.5. A polimorfonukleáris leukociták migrációjának vizsgálata**

A PMNL-kat ( $1 \times 10^5$ ) 4 órán keresztül  $37^\circ\text{C}$ -on migrációs kamrákban alifás alkoholok különböző koncentrációival inkubáltuk  $400 \mu\text{l}$  Hank's oldatban. A kezeléseket során az etanolt, a metanolt, és az EAA-k keverékét 0,0005 mM; 0,005 mM; 0,05; 0,5 mM koncentrációkban alkalmaztuk. Ugyanilyen koncentrációkat használtunk, amikor a sejteket egyidejűleg 10 mM etanollal és az EAA-k keverékével kezeltük. Az EAA-k keveréke metanolt, 1- és 2-propanolt, 1- és 2-butanolt, izo-butanolt, továbbá izoamil-alkoholt tartalmazott egyenlő arányban. A vizsgálatok során az alkohollal nem kezelt sejteket tekintettük kontrollnak. Négy órás inkubációt követően a PMNL-k egy része átjutott a membránon a membrán alsó felszínére, a másik része a membrán felső felszínén maradt. A membrán felső felszínéről a sejteket

vattadarabbal eltávolítottuk. Ezt követően a membrán alsó felszínén lévő sejteket 4%-os paraformaldehid oldattal 20 percig fixáltuk, a membránt mikroszkóp tárgylemezre helyeztük, majd a PMNL-k sejtmagját fluoreszcens festékkel, DAPI-val jelöltük. A minták kiértékelését Axioplan fluoreszcens mikroszkóp (Zeiss, Oberkochen, Németország) segítségével végeztük, hét randomszerűen kiválasztott látótérben megszámoltuk a membránon átjutott sejteket.

### **3.6. A polimofonukleáris leukociták membrán fluiditásának vizsgálata**

A PMNL-kat ( $1 \times 10^5$ ) alifás alkoholok különböző koncentrációival 1 órán keresztül  $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk Eppendorf csövekben. A kezelések során alkalmazott etanolt, metanolt, és az EAA-k keverékét  $0,0005\text{ mM}$ -tól  $0,5\text{ mM}$ -ig terjedő koncentrációban adtuk a sejtekhez. Ugyanezen koncentrációk voltak akkor is, amikor a sejteket egyidejűleg  $10\text{ mM}$  etanollal, és alifás alkoholok keverékével kezeltük. Az EAA-k keveréke metanolt, 1- és 2-propanolt, 1- és 2-butanolt, izo-butanolt, továbbá izoamil-alkoholt tartalmazott. A vizsgálatok során az alkohollal nem kezelt sejteket tekintettük kontrollnak. Kezelést követően a membrán fluiditást fluoreszcencia anizotrópiás módszerrel határoztuk meg spektrofluoriméter segítségével.

### **3.7. A regisztrált és a nem regisztrált tömény szeszesitalok fogyasztásából adódó egészségkockázat populációs alapú becslése**

A regisztrált és a nem regisztrált szeszesitalok fogyasztásából adódó egészségkockázat populációs alapú becslését a Monte Carlo szimuláció segítségével végeztük, figyelembe véve az 1 főre eső alkoholfogyasztást, az etanol és az EAA-k koncentrációját a szeszesitalokban, a teljes populációra vonatkozó átlagos testtömeget, ezen belül külön a férfiak, és külön a nők átlagos testtömeget. A Monte Carlo szimulációkat az @Risk for Excel szoftver 7.5-ös verziójával (Palisade Corporation, Ithaca, NY, USA) végeztük  $10\ 000$  iteráció, Latin Hypercube mintavétel és Mersenne Twister véletlenszám-generátor alkalmazásával. A regisztrált és a nem regisztrált szeszesitalokban lévő etanol és az EAA-k koncentrációinak legjobban illeszkedő eloszlásait Chi-négyzet statisztikával választottuk ki. A regisztrált és a nem regisztrált tömény szeszesitalok fogyasztásából adódó expozíció becslésére három forgatókönyvet alkalmaztunk. Az első, melyet „populációs átlagnak” neveztünk, és ebben az esetben a 15 évnél idősebb korosztály egy főre eső éves alkoholfogyasztását vettük figyelembe. A második scenáriónál a „rendszeres ivók” egy főre eső alkoholfogyasztásával számoltunk. A rendszeres ivók számát úgy határozzák meg, hogy a 15 évnél idősebbek számából kivonják az absztinensek számát. A harmadik forgatókönyvnél két alkategóriát képeztünk. Az „A” verzióban a „krónikus nagyivók” fogyasztását vettük figyelembe, ez férfiaknál  $60\text{ g/nap}$ , nőknél

40 g/nap etanol fogyasztásnak felelt meg. A „B” verzióban ugyanezzel a fogyasztási adatokkal számoltunk, de tekintetbe vettük a regisztrált, és a nem regisztrált alkoholfogyasztás arányát is. Az expozíció becslését követően, az egészségkockázatot az EK módszerrel határoztuk meg. Az EK definíció szerint a kérdéses anyag toxikológiai határértékének és az általa okozott becsült expozíciónak a hányadosa. Kombinált expozíció esetén az EAA-k fogyasztásából (kivéve a metanolt) adódó egészségkockázat becslésére kombinált expozíciós küszöbértéket (EKc) számítottunk. Az expozícióbecslések bizonytalansága és a fajok közötti különbségek miatt a szakirodalomban a 100-nál kisebb EK értékeket tekintik fokozott egészségkockázatnak.

### **3.8. Statisztikai elemzés**

A regisztrált, és a nem regisztrált minták etanol és EAA tartalmának statisztikai összehasonlítását az IBM SPSS program 22.0 verziójával végeztük (22.0.1-es verzió, IBM Inc, Armonk, New York, USA). A különböző etanol tartalmú minták összehasonlíthatósága érdekében a tömény szeszesitalok EAA tartalmát egy liter abszolút etanolra vonatkoztatva mg/liter egységben adtuk meg. Az EAA-k koncentrációját nullának tekintettük abban az esetben, ha mennyiségük a GC/MS mérés detektálhatósági határa alatt volt. A statisztikai elemzés céljából a mintákat két csoportra osztottuk, az egyikbe a regisztrált (n=119), a másikba a nem regisztrált (n=87) tömény szeszesitalok tartoztak. A regisztrált italokból két alcsoportot képeztünk: gyümölcsből (n=53) és gabonafélékből (n=49) előállított tömény szeszesitalok. Az összes nem regisztrált tömény szeszesitalt (n=87) gyümölcsből készül, ezért ebben az esetben nem képeztünk alcsoportokat. Az agavéből (n=3), a melaszból (n=7) és az ismeretlen alapanyagból előállított (n=7) regisztrált, és nem regisztrált tömény szeszesitalokat a kis mintaszám miatt nem bontottuk alcsoportokra. Az adatsorok normalitás vizsgálatára Shapiro-Wilk próbát alkalmaztunk. Mivel azok nem bizonyultak normál eloszlásúnak, a regisztrált, és a nem regisztrált tömény szeszesitalok etanol és EAA koncentrációjának összehasonlítását Mann-Whitney U teszttel végeztük. Ugyanezt a módszert használtuk az egyes alcsoportok összehasonlítására is. Az eredményeket oszlopdiagramokon ábráztuk, a mediánt, a minimum és maximum értékeket, valamint az interkvartilis tartományt tüntettük fel. A regisztrált, és a nem regisztrált tömény szeszesitalok etanol és EAA koncentrációja közötti különbséget akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha a megfelelő csoportok összehasonlításnál a p érték kisebb volt, mint 0,05.

A kezeletlen, illetve az EAA-kal kezelt PMNL-k és monociták fagocitózisának, valamint a PMNL-k migrációjának és membrán fluiditásának a mértékét egy-szemponos variancia-analízissel [One-way Analysis of Variance (ANOVA)] hasonlítottuk össze, az átlagok

páronkénti összehasonlítását Neumann-Keuls-féle post hoc teszttel végeztük. Az eredmények közötti különbséget akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha a p értéke 0,05-nél kisebb volt. Az eredményeinket vonaldiagramokon ábráztuk. A grafikonokon hat független kísérlet eredményéből számított átlagértékek és a hozzájuk tartozó szórások ( $\pm$ SD) láthatók.

Az EK értékek megoszlásának összehasonlítására Kolmogorov-Smirnov próbát használtunk. Ebben az esetben a statisztikai elemzés Stata 10.1 for Windows (StataCorp LLC, College Station, TX, USA) szoftver segítségével történt. Az EK értékek megoszlását dobozdiagramokon mutattuk be, és az ábrákon a mediánt, az interkvartilis tartományt, továbbá az 1%-os és a 99 %-os percentilis értékeket tüntettük fel. A megoszlás közötti különbséget akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha a p értéke 0,05-nél kisebb volt.

## **4. Eredmények**

### **4.1. A regisztrált és a nem regisztrált forrásból származó tömény szeszesitalok etanol és egyéb alifás alkoholtartalma**

A regisztráltakhoz képest a nem regisztrált tömény szeszesitalok EAA koncentrációja szignifikánsan magasabb volt. A nem regisztrált tömény szeszesitalok a regisztrált forrásból származókhöz viszonyítva szignifikánsan több metanolt, 1-butanolt, 2-butanolt, 1-propanolt, izobutanolt és izoamil-alkoholt tartalmaztak. A regisztrált, gyümölcsből készült tömény szeszesitalok szignifikánsan több EAA-t tartalmaztak, mint a regisztrált, gabonafélékből előállított társaik. A nem regisztrált, gyümölcsből készült tömény szeszesitalok EAA koncentrációja szintén szignifikánsan nagyobb volt a regisztrált, gabonából fermentált italokénál. Eredményeink szerint a nem regisztrált, gyümölcsből előállított italok szignifikánsan több EAA-t tartalmaztak, mint a regisztráltak. Az etanol koncentrációja szignifikánsan magasabb volt a nem regisztrált tömény szeszesitalokban. Az etanol koncentrációja szintén szignifikánsan nagyobb volt a nem regisztrált, gyümölcsből készült italokban, mint a regisztrált forrásból származó, gyümölcsből előállított tömény szeszesitalokban.

### **4.2. Az alifás alkoholok metabolitjainak hatása a monociták és a polimorfonukleáris leukociták fagocitózisára**

Az acetaldehid 0,005 mM-tól 10,0 mM-ig terjedően minden vizsgált koncentrációban szignifikánsan gátolta a monociták és a PMNL-k fagocitózisát. A formaldehid, az acetone, az 1-propanal, az 1-butanal és a 2-butanon 0,0005 mM - 0,05 mM közötti koncentrációtartományban szignifikánsan gátolta a sejtek fagocitózisát. Az EAA-k metabolitjainak keveréke minden vizsgált koncentrációban (0,0005 mM – 0,05 mM) szignifikánsan gátolta a monociták és a PMNL-k fagocita aktivitását. Az acetaldehidet és az alifás alkohol metabolitok keverékét együttesen használva az inkubációk során azt tapasztaltuk, hogy a kombinált expozíció hatására szignifikánsan tovább csökkent a PMNL-k és a monociták fagocitózisa a csak acetaldehiddel kezelt sejtekhez képest.

### **4.3. Az etanol, a metanol és az alifás alkoholok keverékének hatása a PMNL-k migrációs képességére és membrán fluiditására**

Az etanol 0,005 mM és 0,5 mM közötti, míg a metanol, és az EAA keveréke 0,0005 mM és 0,5 mM közötti koncentrációtartományban szignifikánsan fokozta a sejtek migrációs

képességét. A csak etanollal kezelt sejtekhez képest, az EAA-k keveréke 0,05 mM-os koncentrációtól kezdődően tovább fokozta a PMNL-k migrációs képességét. Az etanol, a metanol, és az EAA keveréke növelte a PMNL-k membrán fluiditását, szignifikáns változást 0,5 mM-os koncentrációnál okoztak. A kombinált expozíció esetén az EAA-k keveréke tovább tudta növelni a PMNL-k membrán fluiditását a csak etanollal kezelt sejtekhez viszonyítva, de a változás nem volt szignifikáns.

#### **4.4. A regisztrált és a nem regisztrált tömény szeszesitalok fogyasztásából adódó egészségkockázat populációs alapú becslése**

Az etanol EK értékei a gyümölcsből készült, regisztrált, és nem regisztrált tömény szeszesitalok fogyasztása esetén 20 alattiak voltak a férfiak, a nők és a teljes lakosság körében. A nem regisztráltakhoz képest populációs átlagnál és rendszeres ivóknál az EK értékei szignifikánsan kisebbek voltak a regisztrált szeszesitalok (alapanyagtól függetlenül), és a regisztrált, gyümölcsből készült tömény szeszesitalok fogyasztása esetén. Metanol tekintetében a regisztrált és a nem regisztrált szeszesitalok, valamint a gyümölcsből készült regisztrált és nem regisztrált tömény szeszesitalok ivása esetén az EK értékei 100 alá estek mind a három fogyasztási szinten. Az 1-propanol- és az 1-butanolexpozíciónál az EK 1%-os percentilis értékei csak a krónikus nagyivóknál (A verzió) estek 100 alá a nem regisztrált, illetve a nem regisztrált, gyümölcsből készített tömény szeszesitalok fogyasztása esetén. Ugyanezen a fogyasztási szinten az izoamil-alkohol expozíciónál az EK 1%-os percentilis értékei a regisztrált, és a nem regisztrált, gyümölcsből előállított tömény szeszesitalok fogyasztása esetén estek 100 alá. Az EKc 1%-os percentilis értékei csak a krónikus nagyivóknál (A verzió, férfiak és nők) estek 100 alá a regisztrált, és a nem regisztrált tömény szeszesitalok, továbbá a gyümölcsből előállított, regisztrált, és nem regisztrált tömény szeszesitalok fogyasztása esetén. Ezen kívül az EKc 1%-os percentilis értéke a krónikus nagyivó férfiak esetében (B verzió) 100 alá esett a regisztrált, gyümölcsből készült tömény szeszesitalok fogyasztása esetén. A nőkhöz képest az EK medián értékei alacsonyabbak voltak minden fogyasztási szinten a regisztrált, és a nem regisztrált tömény szeszesitalokat, valamint a regisztrált és a nem regisztrált gyümölcsből készült tömény szeszesitalokat fogyasztó férfiaknál. A krónikus nagyivók kivételével (A verzió) az etanol- expozíció esetén szignifikáns különbség volt az EK értékeinek valószínűségi megoszlásában a regisztrált, és a nem regisztrált tömény szeszesitalok, valamint a regisztrált, és a nem regisztrált, gyümölcsből készült tömény szeszesitalok fogyasztása esetén mindhárom fogyasztási szinten. Metanol, 1-propanol, 1-butanol, 2-butanol, izobutanol és izoamil-alkohol expozíciónál az EK, valamint kombinált expozíció estén az EKc értékeinek megoszlása szintén

szignifikánsan különbözött a regisztrált, és a nem regisztrált tömény szeszesitalok, valamint a regisztrált, és a nem regisztrált, gyümölcsből készült tömény szeszesitalok fogyasztása esetén mindhárom fogyasztási forgatókönyvnél.

## 5. Megbeszélés

Bár a túlzott mértékű alkoholfogyasztással kapcsolatos egészségkárosodások főként az etanolnak tulajdoníthatók, feltételezések szerint a szeszesitalokban, köztük a tömény szeszesitalokban legnagyobb koncentrációban lévő EAA-k is hozzájárulhatnak a megbetegedések kialakulásához. Ezért a fokozott EAA expozícióval összefüggő egészségkockázatok becsléséhez nélkülözhetetlen a regisztrált és a nem regisztrált tömény szeszesitalok EAA tartalmának szisztematikus vizsgálata és összehasonlítása.

Az EAA-k mind a regisztrált, mind a nem regisztrált tömény szeszesitalokban előfordulhatnak, de a koncentrációjuk a különböző típusú alkoholos italokban jelentős mértékben különbözhet. Például egy vizsgálat során a különböző európai országokból származó regisztrált alkoholos italok EAA tartalmát határozták meg, és megállapították, hogy az analizált sör- és borminták átlagos EAA koncentrációja 98 mg/liter, illetve 351 mg/liter volt. Lényeges eltérések lehetnek a különböző alapanyagokból készült tömény szeszesitalok EAA koncentrációjában is. Korábbi kutatások szerint az EAA-k koncentrációja a gabonából készült tömény szeszesitalok közül a vodkában átlagosan 33 mg/liter, a skót whiskyben pedig 844 mg/liter volt. Ennél több a gyümölcsből előállított tömény szeszesitalok átlagos EAA koncentrációja, mely akár 6356 mg/liter is lehet. Azonban a nem emberi fogyasztásra szánt alkoholos készítmények (arcszeszek, parfümök, orvosi tinktúrák) többnyire nem tartalmaznak EAA-kat, viszont az etanolkoncentrációjuk még a tömény szeszesitalokénál is magasabb. Ezért a különböző típusú, és a jelentősen eltérő EAA tartalmú regisztrált, és nem regisztrált szeszesitalok összehasonlítása félrevezető lehet. Arra vonatkozóan, hogy van-e szignifikáns különbség a regisztrált, és a nem regisztrált szeszesitalok EAA tartalmában, általános következtetést levonni csak az azonos típusú és hasonló EAA koncentrációjú italok összehasonlítása után lehet. Az alacsony EAA tartalmú szeszesitalok torzító hatásának elkerülése érdekében vizsgálatunk során csak a regisztrált, gyümölcsből és gabonából készített, illetve a nem regisztrált, gyümölcsből előállított tömény szeszesitalok EAA alkoholkoncentrációját hasonlítottuk össze. Eredményeink megerősítik azt, hogy az etanol, a metanol, az 1-propanol, az 1-butanol, a 2-butanol, az izobutanol és az izoamil-alkohol koncentrációja a nem regisztrált tömény szeszesitalokban szignifikánsan magasabb, mint a regisztrált társaikéban. Kutatásunk alapján ugyancsak szignifikánsan nagyobb volt a nem regisztrált tömény szeszesitalok összes EAA tartalma.

Egy korábbi tanulmányban felvetődött, hogy ha regisztrált, és a nem regisztrált tömény szeszesitalok összehasonlításánál kizárják azokat a regisztrált tömény alkoholos italokat,

amelyek kis mennyiségben tartalmaznak EAA-kat (vodka és whisky), akkor a legális és az illegális forrásból származó italok EAA koncentrációjában már nem lesz különbség. A feltételezés megalapozottságának ellenőrzése érdekében, először összehasonlítottuk a regisztrált, gabonából készült tömény szeszesitalok EAA tartalmát a regisztrált, és a nem regisztrált, gyümölcsből készült társaikéval. Eredményeink azt mutatták, hogy az EAA koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt a gabonából készült tömény szeszesitalokban, mint a regisztrált, és a nem regisztrált gyümölcspárlatokéban. Ezért külön statisztikai elemzést végeztünk, az egybevetésből kizártuk a gabonából készült italokat, és csak a regisztrált, és a nem regisztrált, gyümölcsből előállított tömény szeszesitalok EAA tartalmát hasonlítottuk össze. A koncentrációk közötti különbség ezt követően is megmaradt, és a nem regisztrált gyümölcspárlatok EAA tartalma szignifikánsan magasabb volt, mint a regisztrált társaiké. Ezek az eredmények azt támasztják alá, hogy a korábbi tanulmányban megfogalmazott feltételezés nem volt kellően megalapozott. Az általunk is megfigyelt különbségek egyik lehetséges oka az, hogy a tömény szeszesitalok készítéséhez eltérő desztillációs technológiát alkalmaznak, hiszen a regisztrált forgalomból vásárolható italok jellemzően ellenőrzött körülmények között, minősített nagyüzemi lepárló készülékkel készülnek. Ezzel szemben a nem regisztrált eredetű tömény szeszesitalok előállítási körülményei az iparitól jelentősen eltérhetnek és gyakran nem megfelelőek, valamint a lepárlást nem mindig szakember végzi. Az összetételben az eltérésekhez az italok gyártásához használt alapanyagok típusa szintén hozzájárulhat. Korábbi vizsgálatok kimutatták ugyanis, hogy a gabonafélékkel összehasonlítva, a gyümölcsök erjedése során az etanol mellett jóval nagyobb arányban keletkeznek más alkoholok is, így például a gyümölcsökben lévő pektinből metanol jöhet létre. Ezért ha a gyümölcs cefre feldolgozása során nem megfelelő a desztilláció hatékonysága az EAA-k jóval nagyobb mennyiségben lehetnek jelen az elkészült párlatban. Eredményeink összhangban állnak ezekkel a feltételezésekkel, és igazolják azt, hogy a tömény szeszesitalok EAA tartalmát a lepárlás során alkalmazott technológia, és a készítésükhöz használt alapanyagok típusa egyaránt befolyásolhatja, de a tömény szeszesitalok EAA koncentrációját meghatározó tényezők részletesebb feltárásához még további vizsgálatok szükségesek. Mivel a nem regisztrált forrásból származó tömény szeszesitalok a nagyobb EAA tartalmuk miatt megnövelhetik az alkoholfogyasztás okozta betegségterhet különösen a tézis „Bevezetésében” említett KKE országokban, ezért ott a megbetegedések primer prevenciójának érdekében a tömény szeszesitalok összetételének pontos ismeretére és minőségük ellenőrzésére kiemelt figyelmet kell fordítani.

Mivel ezek a sejtek az elfogyasztott tömény szeszesitalokkal a szervezetbe jutott alifás alkoholok biotranszformációja során képződő aldehidekkel is exponálódhatnak, indokolt volt annak vizsgálata, hogy befolyásolják-e ezek a metabolitok a patogén mikroorganizmusok elleni védekezésben fontos szerepet játszó PMNL-k és monociták fagocitózisát. Eredményeink szerint az EAA-k metabolitjai koncentrációtól függően gátolták a PMNL-k és a monociták fagocita aktivitását. Kombinált expozíció esetén az egyedi metabolitokkal kezelt sejtekhez képest további csökkenést tapasztaltunk a PMNL-k és a monociták fagocitózisában. Az EAA-k metabolitjai az acetaldehiddel egyidejűleg nagyobb mértékben károsíthatják a fagocita funkciót, mert a kizárólag acetaldehiddel végzett kezeléshez viszonyítva, az EAA-k metabolitjainak elegyét és az acetaldehidet együttesen alkalmazva a fagocitózis gátlása még jobban növekedett. Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy az EAA-k metabolitjai szinergista módon csökkentették PMNL-k és a monociták fagocitózisát. A fagocitózis gátlása nem tulajdonítható a vizsgált aldehidek citotoxikus hatásának, mivel a metabolitokkal történt kezelést követően nem változott a PMNL-k és a monociták életképessége.

Krónikus nagyivóknál az acetaldehid is befolyásolhatja az immunrendszer működését. A korábbi *in vitro* kísérletekben az EAA-k metabolitjai közül csak az acetaldehid monociták fagocitózisára gyakorolt hatását vizsgálták. Megállapították, hogy az acetaldehid 0,0625 mM-os, 0,125 mM-os és 0,5 mM-os koncentrációban gátolta a sejtek fagocita aktivitását. Hasonló koncentrációknál 0,05 mM és 0,5 mM, figyeltük meg mi is a fagocita funkció csökkenését, bár eredményeink szerint az acetaldehid már 0,0625 mM-nál kisebb, 0,005 mM-os koncentrációban is képes volt gátolni a PMNL-k és a monociták fagocitózisát.

Az *in vitro* kísérleteinkben megfigyelt koncentrációk ismeretében felmerült az a kérdés, hogy az EAA-kat tartalmazó tömény szeszesitalok fogyasztása esetén az aldehidek koncentrációja a vérben elérheti-e azt az értéket, melynél *in vivo* körülmények között is várható a fagocitózis gátlása. A szakirodalomban csak kevés adat található az EAA-k metabolitjainak plazmakoncentrációjáról. Az eddigi toxikológiai vizsgálatokban alkoholmérgezést követően mérték a vérben az etanol mellett az acetaldehid, és az acetone koncentrációját. Az egyik ilyen kutatás eredményei azt mutatták, hogy az etanol intoxikációt követően az érintett egyének vére 21,0 mM-54 mM etanol koncentráció mellett, átlagosan 0,014 mM acetaldehidet tartalmazott. Egy másik vizsgálatban, ugyancsak etanol mérgezésben, nem sokkal a szeszesital elfogyasztása után az etanol átlagos koncentrációja 68 mM, míg az acetaldehidé 0,136 mM, az acetone pedig

0,172 mM volt. Egy detoxikálásra kórházba szállított férfi vérében 8 mM-os etanol, illetve 11,0 mM-os acetón koncentrációt mértek. A PMNL-k és a monociták fagocitózist gátló legkisebb hatásos koncentrációk a mi kísérleti rendszerünkben az acetaldehid esetében 0,005 mM, az acetonnál 0,0005 mM volt. Összehasonlítva ezeket az adatokat az alkohol függőségben szenvedők vérében mért acetaldehid (0,014 mM; 0,136 mM) és acetón koncentrációkkal (0,172 mM; 11,0 mM) megállapítható, hogy ezek az in vivo értékek magasabbak az általunk meghatározott legkisebb hatásos koncentrációknál. Ezért megalapozott az a feltételezésünk, hogy alkohol függőségben szenvedőknél és krónikus nagyivóknál nemcsak az EAA-k, hanem azok metabolitjai is gátolhatják a PMNL- és a monociták fagocitózist, ezáltal hozzájárulhatnak a fertőző betegségek iránti érzékenység kialakulásához. Ennek bizonyítására azonban további kutatások szükségesek.

Mivel az elfogyasztott tömény szeszesitalokkal EAA-k is a gyomor- és bélrendszerbe, illetve a májba jutnak, vizsgáltuk azt, hogy az etanolon kívül az EAA-k képesek-e befolyásolni a PMNL-k migrációját és membrán fluiditását, ezáltal növelni az alkoholos hepatitisz kialakulásának a kockázatát. Eredményeink azt mutatták, hogy in vitro körülmények között az etanol, és a metanol koncentrációtól függően növelte a PMNL-k migrációját, és az etanol 0,005 mM, míg a metanol már egy nagyságrenddel kisebb, 0,0005 mM koncentrációban képes volt fokozni a sejtek migrációs képességét. Ugyanezek az alkoholok a PMNL-k membrán fluiditásának szignifikáns növekedését nagyobb, 0,5 mM koncentrációnál idézték elő. Kimutattuk azt is, hogy a PMNL-k migrációja akkor is megnőtt, ha a sejteket EAA-k 0,0005 mM-os keverékével kezeltük. Korábbi vizsgálatok során meghatározták, hogy az alkoholfüggőségben szenvedők vérében az etanol és az EAA-k koncentrációja tömény szeszesitalok fogyasztása után 10 mM, illetve 0,01–0,10 mM koncentráció tartományban volt. Ezek az értékek lényegesen magasabbak azoknál a koncentrációknál, melyeknél a kísérleteink során növekedett a PMNL-k migrációja. Ezen kívül az EAA-k 0,05 mM-os keveréke 10,0 mM etanol jelenlétében a PMNL-k migrációs aktivitásának további növekedését okozta a csak 10,0 mM etanollal kezelt sejtekhez képest. Ebből arra következtethetünk, hogy az EAA-k migrációt fokozó hatása még viszonylag nagy etanol koncentráció mellett is érvényesül. Bár a fluoreszcencia anizotrópia tovább csökkent amikor a sejteket EAA-k keverékével és 10,0 mM etanollal együtt kezeltük, a változás statisztikailag nem volt szignifikáns a csak 10 mM etanollal exponált PMNL-khoz képest. Ez az eredmény arra utal, hogy a magasabb etanol koncentráció esetén az EAA-k hatása a PMNL-k membrán fluiditására már nem mutatható ki.

Egy másik vizsgálatban az etanol, az 1-propanol és az 1-butanol az általunk alkalmazottnál nagyobb, 9,1–27,3 mM koncentrációnál, és rövidebb inkubációs idő esetén (15-30 perc) fokozta a PMNL-k migrációs képességet és membrán fluiditását. Az általunk végzett migrációs kísérletek során a sejteket 60 percen, míg a membrán fluiditás vizsgálatokor 4 órán keresztül inkubáltuk, és az EAA-k koncentrációja (0,0005 mM-0,5 mM) is lényegesen kisebb volt. Ezért feltételezhető, hogy hosszabb expozíciós idő esetén az EAA-k már alacsonyabb koncentrációkban is fokozhatják a PMNL-k migrációját és membrán fluiditását. Ennek az a toxikológiai jelentősége, hogy az EAA-k biológiai felezési ideje etanol jelenlétében 1,71 és 8,36 óra között változik. Következésképpen feltételezhető, hogy az alkoholfüggőségben szenvedők PMNL-i in vivo körülmények között hosszú ideig exponálódhatnak EAA-kal, ezáltal növelhetik a sejtek migrációs aktivitását és membrán fluiditását. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a tömény a szeszesitalokban található EAA-k az alkoholfüggőségben szenvedők szervezetében elért koncentrációknál hozzájárulnak a PMNL-k májba történő fokozott migrációjához. Ezért az etanollal együttesen hatva nagyobb mértékű májkárosodást okozhatnak, és ily módon növelhetik az alkoholos hepatitisz kialakulásának a kockázatát. Ennek igazolására azonban további in vitro és in vivo vizsgálatok szükségesek.

A sejtmembrán számos egyéb funkciója mellett, védi a sejteket a környezeti hatásoktól. A sejtmembrán fizikai struktúráját azonban különböző kémiai vegyületek károsíthatják, ezek közül fiziológiás szempontból az egyik legjelentősebb az etanol, mely a szeszesitalokkal jut az emberi szervezetbe. Ezért vizsgálatokat végeztek arra vonatkozóan, hogy miként befolyásolja az etanol a sejtmembrán integritását. Korábbi eredmények bizonyítják, hogy az etanol beépülhet a sejtmembrán kettős lipid rétegébe, ezáltal fokozhatja annak fluiditását. A lipid kettősrétegben bekövetkezett strukturális változások miatt károsodhat a membránhoz kötött fehérjék és ioncsatornák funkciója, inaktiválódhatnak bizonyos membránhoz kötött, és cytoszolikus enzimek. Ennek hatására számos biológiai folyamat változhat meg, többek között a membrán transzport, enzimreakciók és intracelluláris jelátviteli folyamatok. Módosulhat a PMNL-k sejtmembránján található, és a fagocitózisban fontos szerepet játszó Fc gamma receptorok (FcγR-k) működése is. PMNL-kon végzett kísérleteink igazolták, hogy nemcsak az etanol, hanem a metanol és az EAA-k elegye is képes megnövelni a sejtek membrán fluiditását, de nagyobb koncentrációban (0,5 mM) annál, ami a migrációt már fokozta (0,0005 mM). Ezért további vizsgálatok szükségesek arra vonatkozóan, hogy az EAA-k az alkoholfüggőségben szenvedők szervezetében elért koncentrációknál a membrán fluiditás változása milyen mértékben járulhat hozzá az alkoholos hepatitisz kialakulásához.

Tekintettel arra, hogy az EAA-k koncentrációja szignifikánsan magasabb volt a nem regisztrált tömény szeszesitalokban, meg akartuk határozni, hogy vajon van-e különbség a regisztrált, és a nem regisztrált tömény szeszesitalok fogyasztásából származó egészségkockázat között? Mivel a lakosság különböző csoportjain belül (rendszeres alkoholfogyasztók, krónikus nagyivók), a nők és a férfiak alkoholfogyasztásában különbségek vannak, fogyasztási szintenként és nemenként külön-külön kockázatbecslés végeztünk. A populációs alapú összehasonlító kockázatbecslésünk alapján elmondható, hogy az átlagos és a rendszeres alkoholfogyasztók egészségkockázata a regisztrált tömény szeszesitalok, és a regisztrált, gyümölcsből készült tömény szeszesitalok fogyasztása esetén nagyobb, mint azoknál, akik ugyanezeknek a tömény szeszesitaloknak a nem regisztrált megfelelőit isszák. Ez azzal magyarázható, hogy az átlagos és a rendszeres alkoholfogyasztók egy főre jutó, regisztrált forrásból származó tömény szeszesital fogyasztása majdnem a kétszerese volt (átlagos fogyasztóknál 5,9 liter/fő/év, rendszeres fogyasztóknál 7,0 liter/fő/év) a nem regisztrált forrásból származó tömény szeszesital fogyasztásnak (átlagos fogyasztóknál 3,1 liter/fő/év, rendszeres fogyasztóknál 3,6 liter/fő/év). Ezért körükben nemcsak a regisztrált tömény szeszesitalok fogyasztásából adódó etanol, hanem az EAA expozíció is nagyobb volt annál, mint ami a nem regisztrált társaik fogyasztásából származott. Ezért a regisztrált forrásból származó tömény szeszesitalok ivása esetén az EAA expozícióval járó egészségkockázat szintén magasabbnak bizonyult a nem regisztrált tömény szeszesitalok fogyasztásából adódóhoz képest. Ezzel szemben a krónikus nagyivóknál nem volt szignifikáns különbség az etanol expozícióból adódó egészségkockázat között a regisztrált, illetve nem regisztrált tömény szeszesital fogyasztás esetén. Feltételezésünk szerint ez annak tulajdonítható, hogy az ebbe a csoportba tartozó egyének szervezetébe hasonló mennyiségű etanol jut a regisztrált és a nem regisztrált tömény szeszesitalokból, és a gyümölcs párlatokból. Ezen kívül a metanol expozíció veszélyesnek bizonyult mindhárom fogyasztási szinten, mindegyik típusú tömény szeszesital fogyasztása esetén, de a legkockázatosabbnak a gyümölcsből előállított tömény szeszesitalok ivása adódott. Az EAA-k együttes expozíciójánál a harmadik forgatókönyv A változatát feltételezve csak a krónikus nagyivók voltak veszélyeztetve mind a regisztrált, mind a nem regisztrált tömény szeszesitalok és a gyümölcspárlatok fogyasztása esetén, de a nem regisztrált, gyümölcsből készült tömény szeszesitalok ivása szignifikánsan magasabb egészségkockázatot jelentett. Ezzel szemben, a harmadik forgatókönyv B változatát feltételezve az EAA-k együttes expozíciójával járó kockázat nem volt nagyobb azoknál a krónikus nagyivóknál sem, akik nem regisztrált, gyümölcsből készült tömény szeszesitalokat fogyasztottak. Ugyanakkor a krónikus nagyivók társadalmi-gazdasági státusza jellemzően alacsony, kevés jövedelemmel

rendelkeznek, ezért körükben a nem regisztrált alkoholok fogyasztási aránya valószínűleg nagyobb, mivel ezek a szeszesitalok olcsóbbak. Ebből kifolyólag, a nem regisztrált alkoholfogyasztás 15%-os fogyasztási arányából származó egészségkockázat valószínűleg alábecsült. Összehasonlító kockázatbecslésünk tehát arra utal, hogy az a nézet, miszerint a nem regisztrált alkoholok fogyasztásával járó egyetlen egészségkockázat a magasabb etanol koncentrációjuknak tulajdonítható, csak részben helyes. Bár ez igaz lehet, ha az összesített adatokat vesszük figyelembe, részletesebb elemzéssel azonban azonosítottunk a lakosságon belül olyan csoportokat, melyek nem regisztrált alkoholfogyasztás esetén nagyobb kockázatnak vannak kitéve. További vizsgálatok szükségesek azonban a kapott eredményeink megerősítésére.

Kutatásunk egyik erőssége az, hogy elsőként hasonlítottuk össze nagyszámú mintán a regisztrált, és a nem regisztrált szeszesitalokban található EAA-k koncentrációit. Bár a nem regisztrált forrásból származó mintáink nem voltak reprezentatívak minden nem regisztrált tömény szeszesitaltípusra (vodka, whisky, konyak), reprezentatívak voltak azokra a nem regisztrált, gyümölcsből készült tömény szeszesitalokra, melyeket a KKE országokban, köztük Magyarországon fogyasztanak. A vizsgálatunk másik erőssége az, hogy a regisztrált, és a nem regisztrált tömény szeszesitalok fogyasztásából adódó egészségkockázatot különböző fogyasztási szinteken hasonlítottuk össze, és külön-külön kockázatbecslést végeztünk a teljes lakosságra, a férfiakra és a nőkre. A kutatásunknak azonban néhány gyengesége is van. Először, a regisztrált, és a nem regisztrált tömény szeszesitalmintákat csak Magyarországon szereztük be, ami megnehezítheti eredményeink extrapolálását más KKE-i országokra. Másodszor, a krónikus nagyivóknál a kockázatbecslésünk azon feltételezésen alapult, hogy az általuk elfogyasztott etanol csak regisztrált, és nem regisztrált tömény szeszesitalal jut be a szervezetükbe. Ez az EAA expozíció túlbecsülését eredményezhette. Harmadszor, a BMDL értékek csak az etanol, a metanol és az 1-butanol esetében voltak elérhetőek, ezért a többi EAA esetében a NOAEL-értékeket használtuk az egészségkockázat becslésére. A BMDL értékekkel ellentétben, a NOAEL-ek nem nyújtanak információt a dózis-válasz összefüggésről. Ezért, amikor NOAEL-eket alkalmaztunk az EK értékek kiszámításához, a regisztrált, és a nem regisztrált tömény szeszesitalok, valamint a regisztrált, és a nem regisztrált, gyümölcsből készült tömény szeszesitalok fogyasztásával járó egészségkockázatot valószínűleg alábecsültük. Ezért további toxikológiai vizsgálatokra van szükség a többi EAA BMDL értékének meghatározására, lehetővé téve ezzel az egészségkockázat pontosabb becslését.

## 6. Az eredmények összefoglalása és következtetések

Eredményeinket összefoglalva elmondható, hogy:

1. Igazoltuk, hogy a nem regisztrált forgalomból származó tömény szeszesitalok EAA tartalma szignifikánsan nagyobb, mint a regisztrált forgalomból származóké. A nem regisztrált forrásból származó tömény szeszesitalok összetételük miatt, bizonyos KKE országokban megnövelhetik az alkoholfogyasztás okozta betegségterhet. Ezért a tömény szeszesitalok összetételének pontos ismerete és ellenőrzése fontos szerepet játszhat az alkoholfogyasztással kapcsolatos megbetegedések primer prevenciójában.
2. Bizonyítottuk, hogy nemcsak a tömény szeszesitalokban lévő EAA-k, hanem azok metabolitjai is koncentrációfüggő módon képesek gátolni a PMNL-k és monociták fagocitózist egyedi és acetaldehiddel kombinált expozíció esetén. Az EAA-k metabolitjai az acetaldehiddel együttesen hatva nagyobb mértékben károsíthatják a fagocita funkciót, mint az acetaldehid önmagában.
3. Igazoltuk, hogy a tömény szeszesitalokban található EAA-k metabolitjai toxikológiailag releváns koncentrációban képesek gátolni a PMNL-k és a monociták fagocitózist individuális expozíció esetén, és együttes hatásuk acetaldehiddel kombinált expozíciónál is kimutatható.
4. A tömény szeszesitalokban kimutatható EAA-k metabolitjai hozzájárulhatnak az etanol által indukált immunszuppresszióhoz, és ezáltal az alkohol függőségben szenvedőknél és a krónikus nagyivóknál fokozhatják a fertőző betegségek iránti érzékenységet.
5. A tömény szeszesitalokban lévő EAA-k individuális és etanollal kombinált expozíció esetén növelik a PMNL-k membrán fluiditását és migrációját. Alkohol függőségben szenvedőknél és krónikus nagyivóknál fokozhatják a PMNL-k szöveti infiltrációját, ezáltal az etanol mellett gyorsíthatják az alkoholos hepatitisz progresszióját.
6. Bizonyítottuk, hogy az átlagos és a rendszeres alkoholfogyasztók etanolexpozícióból adódó egészségkockázata a regisztrált tömény szeszesitalok fogyasztása esetén

nagyobb, mint azoknál, akik a nem regisztrált tömény szeszesitalokat isszák. A regisztrált, és a nem regisztrált tömény szeszesitalok fogyasztásával járó metanolexpozíció fokozott egészségkockázatot jelent az átlagos, és a rendszeres, valamint a krónikus nagyivók körében, de különösen magas a rizikó a gyümölcsből készült, nem regisztrált tömény szeszesitalok ivása esetén. A krónikus nagyivók körében az EAA-k együttes expozíciójával járó egészségkockázat egyaránt fokozott a regisztrált, és a nem regisztrált tömény szeszesitalok fogyasztásakor, de a legnagyobb a nem regisztrált, gyümölcsből előállított tömény szeszesitalok ivásakor. Eredményeink alapján a gyümölcsből készült, nem regisztrált tömény szeszesitalok fogyasztása jelenti a legnagyobb egészségkockázatot, ezért további vizsgálatokra van szükség annak megállapítására, hogy ennek mekkora szerepe van a KKE országokban a Nyugat-Európaéhoz képest magasabb alkoholfogyasztással összefüggő halálozásban.



Nyilvántartási szám: DEENK/27/2021.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bujdosó Orsolya

Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bujdosó, O.**, Pál, L., Nagy, A. C., Árnias, E., Ádány, R., Sándor, J., McKee, M., Szűcs, S.: Is there any difference between the health risk from consumption of recorded and unrecorded spirits containing alcohols other than ethanol? A population-based comparative risk assessment.  
*Regul. Toxicol. Pharmacol.* 106, 334-345, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.05.020>  
IF: 2.652
2. Pál, L., **Bujdosó, O.**, Szűcs, S., Baranyi, G., Borbásné Sebestyén, V., Vámosi, G., Rácz, G., Ádány, R., McKee, M., Árnias, E.: How do methanol and higher alcohols found in alcoholic beverages affect membrane fluidity and migration of granulocytes?  
*J. Food Biochem.* 42 (5), 1-8, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jfbc.12593>  
IF: 1.358
3. Árnias, E., Pál, L., Baranyi, G., **Bujdosó, O.**, Rácz, G., Ádány, R., McKee, M., Szűcs, S.: Metabolites of Aliphatic Alcohols Detected in Alcoholic Beverages Inhibit Phagocytosis.  
*Alcohol Alcohol.* 51 (4), 388-394, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/alcalc/agv132>  
IF: 2.757





### További közlemények

4. Pál, L., Muhollari, T., **Bujdosó, O.**, Fehérné Baranyai, E., Nagy, A. C., Árnas, E., Ádány, R., Sándor, J., McKee, M., Szűcs, S.: Heavy metal contamination in recorded and unrecorded spirits. Should we worry?

*Regul. Toxicol. Pharmacol.* 116, 1-10, 2020.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104723>

IF: 2.652 (2019)

5. Pál, L., Árnas, E., **Bujdosó, O.**, Baranyi, G., Rácz, G., Ádány, R., McKee, M., Szűcs, S.: Aliphatic alcohols in spirits inhibit phagocytosis by human monocytes.

*Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 37 (2), 193-201, 2015.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/08923973.2015.1009998>

IF: 1.617

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 11,036**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,767**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.01.21.



## 7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Szűcs Sándornak a dolgozat elkészítésében nyújtott segítségéért, rendkívül értékes tanácsaiért és türelméért, valamint Dr. Pál Lászlónak a gyakorlatban nyújtott segítségéért. Dr. Ádány Róza professzornőnek, Dr. Balázs Margit professzornőnek és Dr. Sándor János professzor úrnak, hogy lehetővé tették számomra a kutatást a Népegészség- és Járványtani Intézetben. 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, Dr. Rácz Gábornak, Baranyi Gergőnek, és Erdei Dóra Szibillnek a laboratóriumi munkában nyújtott segítségét. Köszönettel tartozom a Debreceni Egyetem, Népegészség- és Járványtani Intézet minden munkatársának, akik segítségükkel hozzájárultak disszertációm elkészítéséhez. Végül köszönöm a férjemnek, családomnak, barátaimnak, hogy türelmükkel és tanácsadásukkal segítették munkámat.

A doktori értekezés elkészítését támogatták a GINOP-2.3.2-15-2016-00005 és az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 projektek, melyeket az Európai Szociális Alap finanszírozott. A munkát a Magyar Tudományos Akadémia (szerződés szám: 2011 TKI 473) és az Emberi Erőforrások Minisztériuma (szerződés szám: 1E4DBNX1EG03 320 és 1Q4DBNX1STIP 320) is támogatta.