

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**AZ ILLEGÁLIS FORRÁSOKBÓL SZÁRMAZÓ TÖMÉNY SZESZESITALOKBAN  
ELŐFORDULÓ ALIFÁS ALKOHOLOK HATÁSA GRANULOCITÁK ÉS  
MONOCITÁK FUNKCIONÁLIS ÁLLAPOTÁRA**

**PÁL LÁSZLÓ**

**TÉMAVEZETŐ: DR. SZÚCS SÁNDOR**



**DEBRECENI EGYETEM  
EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA  
DEBRECEN  
2014.**

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	3
<b>2. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	4
<b>3. A KUTATÁS CÉLKITŰZÉSEI</b> .....	12
<b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....	13
4.1. Felhasznált anyagok .....	13
4.2. Granulociták szeparálása a szuperoxid-anion termelés vizsgálatához .....	13
4.3. Granulociták kezelése az alifás alkoholokkal .....	14
4.4. Granulociták szuperoxid-anion termelésének stimulálása és mérése .....	15
4.5. Mononukleáris fehérvérsejtek és granulociták szeparálása a fagocitózis vizsgálatához... 15	
4.6. Zimozán részecskék jelzése és opsonizálása a fagocitózis vizsgálatához..... 16	
4.7. Fagocitózis vizsgálata .....	16
4.8. Az eredmények prezentálása és statisztikai elemzés .....	18
<b>5. EREDMÉNYEK</b> .....	19
5.1. Az alifás alkoholok hatása granulociták szuperoxid-anion termelésére .....	19
5.2. Az alifás alkoholok hatása granulociták fagocitózisára..... 28	
5.3. Az alifás alkoholok hatása monociták fagocitózisára..... 35	
<b>6. MEGBESZÉLÉS</b> .....	42
<b>7. AZ EREDMÉNYEK ALKALMAZÁSÁNAK LEHETŐSÉGE</b> .....	48
<b>8. ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	49
<b>9. SUMMARY</b> .....	50
<b>10. IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	51
<b>11. TÁRGYSZAVAK</b> .....	60
<b>12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....	61
<b>13. KÖZLEMÉNYEK</b> .....	62
<b>14. FÜGGELÉK</b> .....	64

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

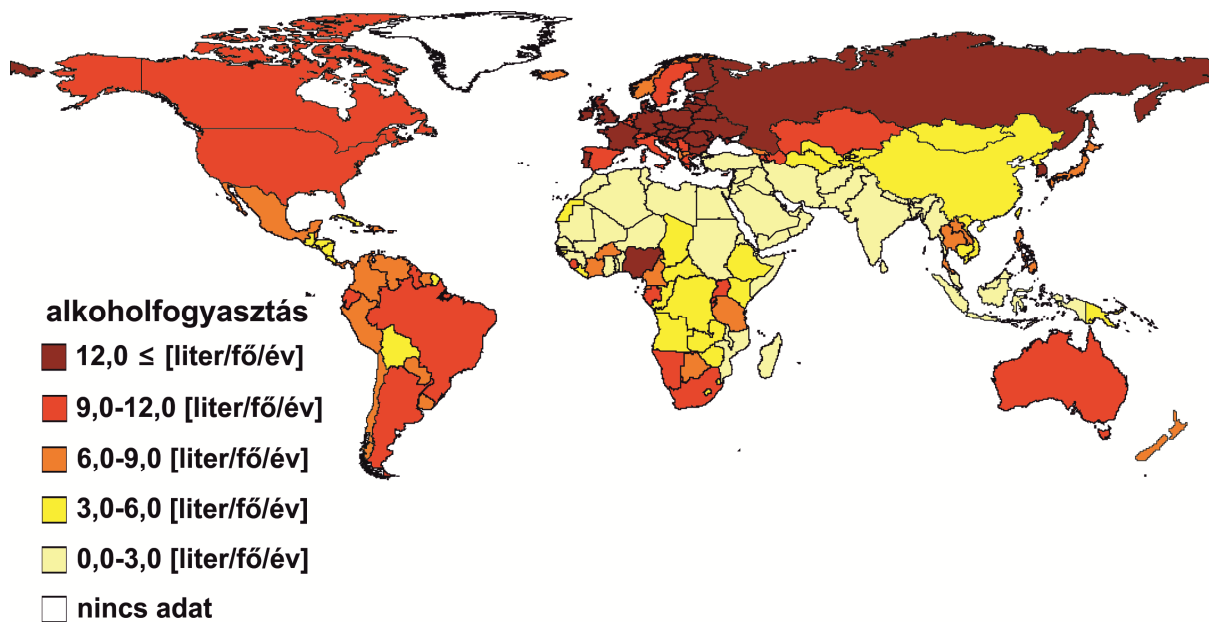
<b>ANOVA</b>	variancia analízis (analysis of variance)
<b>CD14</b>	clusters of differentiation 14
<b>DAG</b>	diacil-glicerol
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenillindol
<b>EDTA</b>	etilén-diamin-tetraecetsav
<b>EtOH</b>	etanol
<b>EU</b>	Európai Unió
<b>FBS</b>	fötális borjú szérum
<b>Fc<math>\gamma</math>R</b>	Fc gamma receptor
<b>FI</b>	fagocitózis index
<b>FITC</b>	fluoreszcein izotiocianát
<b>FITC-OZ</b>	opszonizált és fluoreszcein izotiocianáttal jelzett zimoján A
<b>FMLP</b>	N-formil-metionil-leucil-fenilalanin
<b>FPR</b>	formil-peptid receptor
<b>HIV</b>	humán immundeficiencia vírus
<b>IARC</b>	Nemzetközi Rákkutató Intézet (International Agency for Research on Cancer)
<b>Ig G</b>	immunglobulin G
<b>MLT</b>	membrán lipid tutaj
<b>NADPH</b>	redukált-nikotinamid-adenin-dinukleotid
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	szuperoxid-anion
<b>PA</b>	foszfatidilsav
<b>PDBu</b>	forbol-12,13-dibutirát
<b>PKC</b>	protein kináz C
<b>PLD</b>	foszfolipáz-D
<b>PMNL</b>	polimorfonukleáris leukocita
<b>ROI</b>	reaktív oxigén intermedier
<b>SD</b>	standard deviáció
<b>SOD</b>	szuperoxid dizmutáz
<b>WHO</b>	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)

## 2. 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 a sör és a bor mellett egyre nagyobb mennyiségben állítottak elő különböző gyümölcsökből és gabonafélékből erjesztéssel, majd az ezt követő desztillálással 35-50 % etil-alkoholt (a továbbiakban alkohol) tartalmazó tömény szeszesitalokat (1). 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 (2). 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 (3). Ez a mennyiség azonban földrajzi területenként, illetve azon belül országoként széles határok között változhat, így a legalacsonyabb, 0-6,0 liter/fő a közel-keleti és dél-kelet ázsiai országokban, Észak- és Dél-Amerikában 6,0-12,0 liter/fő, míg ennél nagyobb Európában és Oroszországban (1. ábra) (3).

1. ábra

A világ 15 évnél idősebb lakosságának alkoholfogyasztása abszolút alkoholra átszámítva

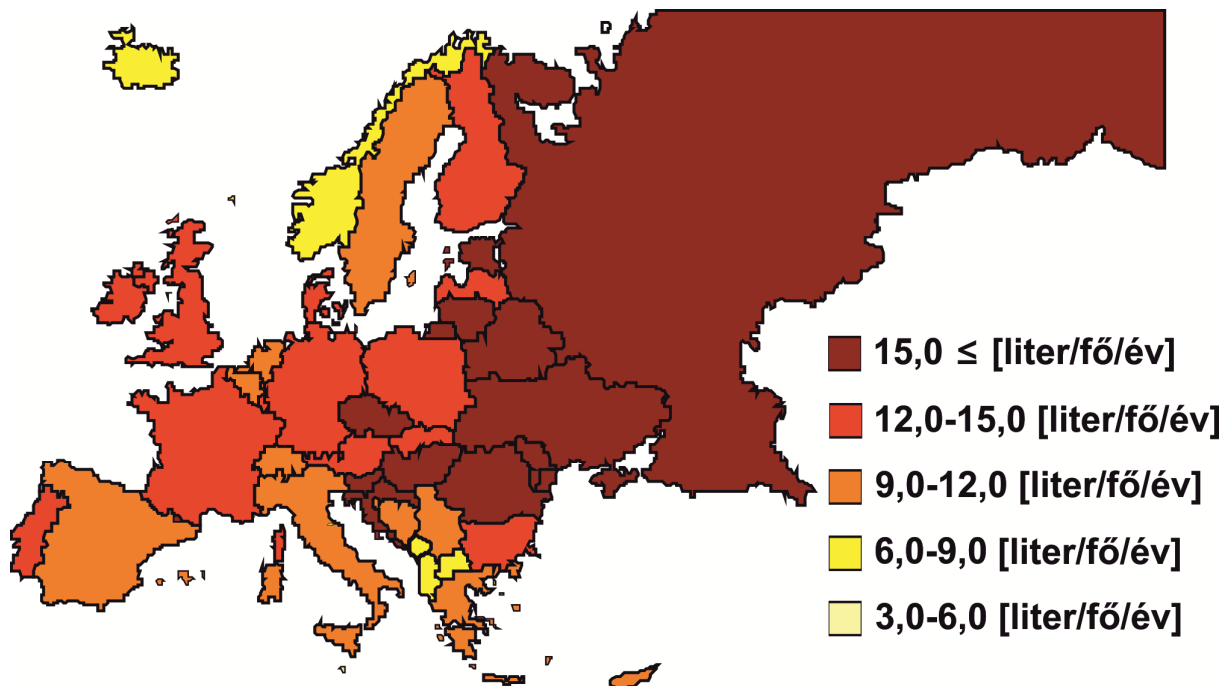


forrás: Global Status Report on Alcohol and Health, WHO, Geneva, 2011. (3).

A legelterjedtebb az alkoholfogyasztás Európában, ahol az évente megivott alkohol mennyisége átlagosan közel 15,0 liter/fő (2. ábra) (3). Európa országait összehasonlítva, Magyarország az évi 16,27 liter/fő értékkel a rangsorban a második, míg a világ összes országát figyelembe véve a harmadik helyet foglalja el (2. ábra) (3).

## 2. ábra

**Európa 15 évnél idősebb lakosságának alkoholfogyasztása abszolút alkoholra átszámítva**



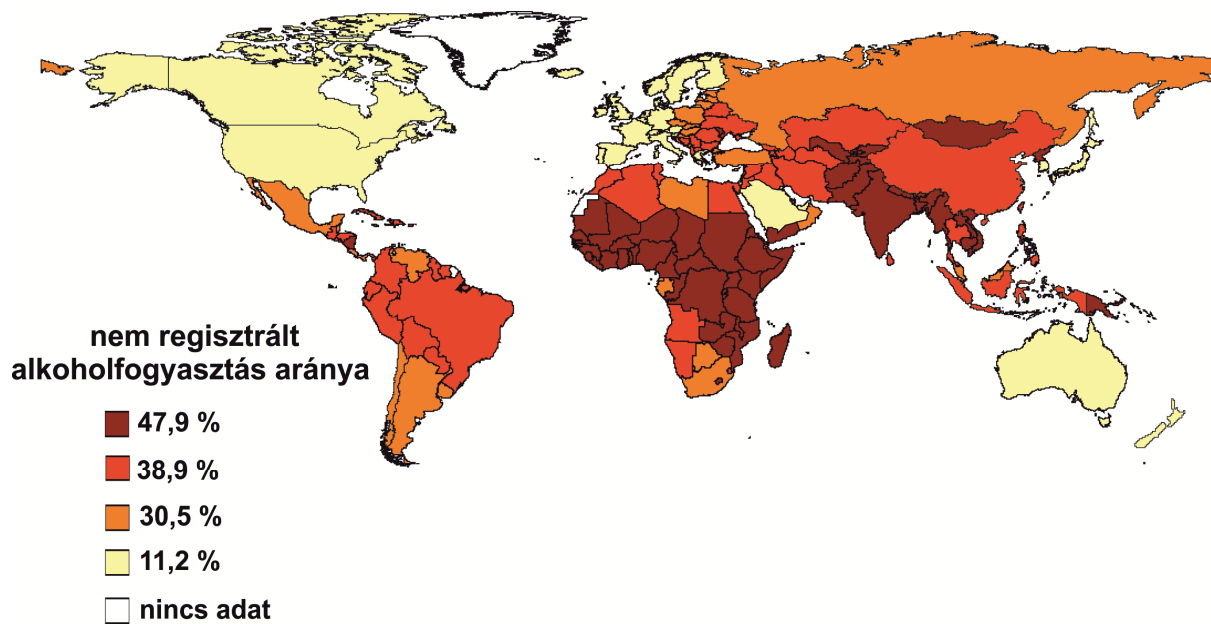
forrás: Global Status Report on Alcohol and Health, WHO, Geneva, 2011. (3).

Az alkoholos termékeket terhelő jövedéki adó megfizetésének elkerülése miatt a legális kereskedelem mellett világszerte jelentős az illegális forrásokból származó szeszesitalok értékesítése is (3). A WHO állásfoglalása szerint nem legális eredetűnek tekintendő minden olyan alkoholos ital, melyet a fekete piacon hatósági zárjegy nélkül árusítanak, 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 (3). 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 (4). 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 (3). 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 (3. ábra) (3).

### 3. ábra

#### Nem regisztrált alkoholfogyasztás átlagos aránya a világ 15 évnél idősebb lakosságának körében

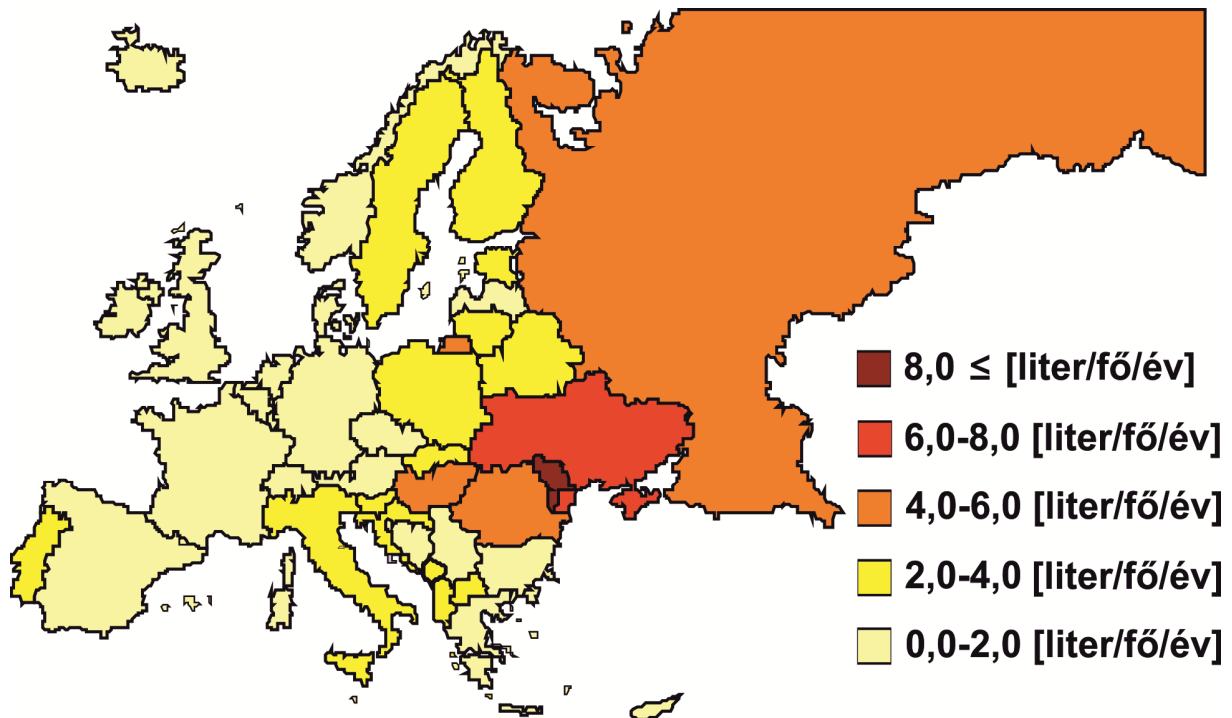


forrás: Global Status Report on Alcohol and Health, WHO, Geneva, 2011. (3).

Európa egészségét 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 (4. ábra) (3). Így az ellenőrizetlen eredetű alkoholtartalmú italok Magyarországon 24 %-kal (4,0 liter/fő), Romániában 26 %-kal (4,0 liter/fő), Ukrajnában 48 %-kal (7,5 liter/fő) és Moldovában 55%-kal (10,0 liter/fő), illetve Oroszországban 30 %-kal (4,7 liter/fő) járulnak hozzá a lakosság teljes alkoholfogyasztásához (4. ábra) (3).

#### 4. ábra

### Illegális alkoholfogyasztás mértéke Európában a 15 évnél idősebb lakosság körében abszolút alkoholra átszámítva



forrás: Global Status Report on Alcohol and Health, WHO, Geneva, 2011. (3).

Ezek elsősorban olyan házilag előállított, a legális kereskedelemben kaphatóknál nagyobb etanol koncentrációjú tömény szeszesitalok, melyeknek a minőségét nem ellenőrzik, ilyen például Magyarországon a pálinka, Szlovákiában a borovicska, slivovica, Oroszországban és Ukrajnában a samogon (4, 5). Az említett közép- és kelet-európai országokban a kétes eredetű, illetve minőségű alkoholtartalmú italok fogyasztása várhatóan a közeljövőben sem fog csökkenni, hiszen azok lényegesen olcsóbbak a jövedéki adóval terhelt, a legális kereskedelemben beszerezhető termékekénél, ezért megfizethetőbbek a hátrányos gazdasági és szociális helyzetbe jutott társadalmi rétegek számára (3, 4, 6). Sőt, Magyarországon a házi főzésű pálinkák fogyasztása még tovább növekedhet, mivel a 2003. évi CXXVII. törvény 2010-es módosítása értelmében háztartásonként 50,0 liter 86%-os alkoholtartalmú ital állítható elő adómentesen, amelyből hígítással 86,0 liter 50%-os tömény szeszesital készíthető (7). A Nemzeti Adó- és Vámhivatal becslése szerint ilyen módon évente több mint 12,0 millió liter nem regisztrált forrásból származó tömény szeszesital kerülhet előállításra, illetve ezt követően a feketepiacra (8). A gyümölcspárlatok készítését engedélyező 2003. évi CXXVII.

törvény 64.§-a azonban a jövedéki adó (1667 Ft/liter, 50 %-os szeszesital esetében) befizetését követően lehetőséget biztosít a magán-, vagy bérfőzéssel előállított tömény szeszesitalok legális kereskedelmi forgalomban történő értékesítésére, így azok a zárjegy megvásárlását követően jogi értelemben már legálisnak tekinthetők (7).

Népegészségügyi szempontból az ellenőrizetlen körülmények között előállított tömény szeszesitalok és házi főzésű pálinkák megkülönböztetett figyelmet érdemelnek, mivel ezek a nem megfelelő gyártási technológiából adódóan több olyan komponenst is tartalmazhatnak, amelyek károsíthatják az emberi szervezetet (9). 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 (ólmot tartalmazó vízvezetékcsövek, gépkocsik vízűtői) kerülhetnek a házilag készített italokba (9, 10, 11). 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 (10, 11). 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 (12, 13). Az acetaldehid az etanollal együttesen hatva az IARC állásfoglalása alapján emberben szintén bizonyítottan rákkeltő hatású (12, 13). 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 (14, 15). 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 (14, 15, 16). Gázkromatográfiás vizsgálatok egyértelműen bizonyították, hogy a legális kereskedelemben kaphatóknál az ellenőrizetlen körülmények között gyártott, majd a feketepiacon értékesített tömény szeszesitalok és házi főzésű pálinkák az etanol mellett változó mennyiségben és szignifikánsan nagyobb koncentrációban (10-70 mM/liter) metanolt, és nagyobb szénatom számú alifás alkoholokat, így 1- és 2-propanolt, 1- és 2-butanolt, izo-butanolt, valamint izoamil alkoholt is tartalmaznak (4, 9). Ezeket élesztőgombák (*Saccharomyces cerevisiae*) szintetizálják az alapanyagban lévő szénhidrátok alkoholos fermentációja alatt, és nem megfelelő lepárlás esetén a desztillált szeszesitalban koncentrációjuk megnövekedhet (17). Toxikológiai vizsgálatok szerint a nagyobb szénatom

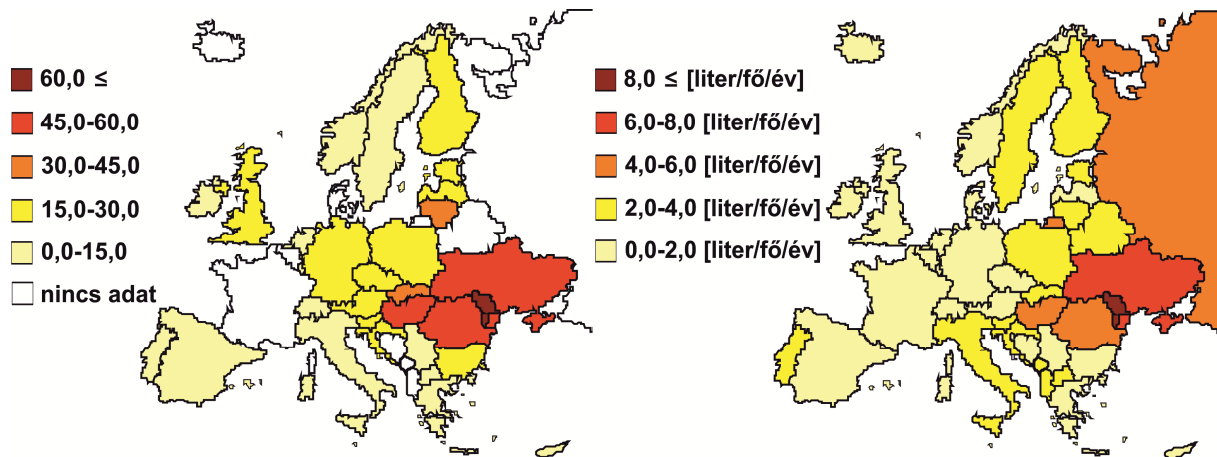
számú alkoholok májkárosító hatása többszöröse az etanolénak (18). Így például izolált patkánymájon végzett perfúziós kísérletek igazolták, hogy az expozíció hatására a hepatocitákból a házi főzésű pálinkákban kimutatható alifás alkoholok az etanolnál 2,0-4,0-szer nagyobb, a sejtek membránjának károsodására utaló laktát-dehidrogenáz, glutamát-piruvát-transzamináz, valamint glutamát-dehidrogenáz kiáramlást idéztek elő (18).

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 egészségügy számára (19). Számos epidemiológiai és klinikai vizsgálat több mint 60 különböző kórkép létrejöttében igazolta a túlzott alkoholfogyasztás etiológiai szerepét, így az jelentősen növeli a perifériás neuropátia, a mentális-, a szív- és érrendszeri betegségek, a hipertónia, valamint a 2-es típusú diabetes mellitus kialakulásának kockázatát (3, 20). Ezen túlmenően lényeges szerepe van a gyomor-, illetve hasnyálmirigy megbetegedések előidézésében is (21). Az IARC állásfoglalása alapján az etanol emberben bizonyítottan rákkeltő hatású, epidemiológiai tanulmányok sora támasztja alá, hogy a nagymértékű italozás rizikótényező a szájüregi-, a garat-, a nyelőcső-, a gyomor-, a máj-, az emlő-, a vastag- és a végbélrák kialakulásában (22, 23, 24). Jól ismert az is, hogy ok-okozati összefüggés van az alkoholizmus és a krónikus májbetegségek, valamint a májzsugor kialakulása között (21). Közép- és Kelet-Európában a nyugat-európai országokhoz képest különösen magas a 25-64 éves korú lakosság krónikus májbetegségek és májzsugor miatti halálozása (19). Így például Magyarország Európai Unió (EU) csatlakozásának évében, 2004-ben ez a mortalitási mutató Litvániában 1,8-szorosa (32,3/100 000 fő), Magyarországon 4,1-szerese (74,9/100 000 fő), Moldovában 6,5-szorosa (117,3/100 000 fő), Romániában 2,9-szerese (53,8/100 000 fő) és Ukrajnában 3,2-szerese (58,2/100 000 fő) volt az azonos évi EU-s átlagnak (18,1/100 000 fő) (25). Bár hazánkban azóta a májcirrózis okozta halálozás csökkenő tendenciát mutatott, de még 2010-ben is 3,14-szerese volt (51,9/100 000 fő) az EU-s átlagnak (16,5/100 000 fő) (25). Ugyanakkor az egy főre jutó alkoholfogyasztásban nem voltak ekkora különbségek a nyugat-európai államokhoz képest, ezért a felsorolt közép- és kelet-európai országok lakosságának EU-s átlagnál magasabb krónikus májbetegségek és májzsugor miatti halálozása az elfogyasztott alkohol mennyiségén, környezeti és genetikai tényezőkön, *Hepatitis* vírusfertőzések szövődményén kívül, 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 (5. ábra) (3, 4, 18, 19).

### 5. ábra

#### A krónikus májbetegségek és májcirrózis okozta halálozás és az illegális alkoholfogyasztás mértéke Európában



standardizált halálozási arányszám  
25-64 év/100 000 fő, 2010.

az illegális alkoholfogyasztás mértéke

forrás: Health for All Mortality Database,  
WHO, Copenhagen, 2013. (25).

forrás: Global Status Report on Alcohol  
and Health, WHO, Geneva, 2011. (3).

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 (26-28). Ennek következtében az átlagos populációhoz képest a krónikus alkoholisták fokozottan érzékenyek a bakteriális, főként a *Streptococcus pneumoniae*, a *Klebsiella pneumoniae*, a *Legionella pneumoniae*, a *Haemophilus influenzae*, a *Salmonella enterica*, a *Listeria monocytogenes*, valamint a vírusos, köztük a *Humán immundeficiencia vírus* (HIV-1), a *Hepatitis B* és *C* infekciókra (26-29). Ezért epidemiológiai vizsgálatok szerint körükben magasabb az említett patogén mikroorganizmusok által okozott tüdőgyulladás, a tuberkulózis, a HIV-1, a *Hepatitis B* és *C* fertőzések prevalenciája, valamint az infekciók okozta halálozás (26-29).

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) (26-31). 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 (26-29, 32, 33). A PMNL-k, mint az emberi vérkeringésben legnagyobb arányban jelenlévő természetes immunkompetens sejtek, meghatározó szerepet játszanak a szervezet baktériumok és vírusok elleni védekezésében (34, 35). A baktériumok sejtfalában megtalálható kemotaktikus peptidek, továbbá gyulladáscitokinek hatására gyorsan és nagyszámban jelennek meg a fertőzés helyén, majd fagocitózist követően elpusztítják a kórokozókat (34, 35). 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 (36). A  $O_2^{\cdot-}$ -ből további reaktív oxigén intermedierek (ROI) keletkeznek, mint például hidroxil gyök, perklorát gyök, hidrogén-peroxid és hipohalogenidek (36). Alkoholistáknál a fertőzésekre adott természetes immunválasz károsodását okozhatják a patogén mikroorganizmusok destrukciójában szintén részt vevő monociták funkcionális állapotában bekövetkezett defektusok is (26-29, 37).

### 3. A KUTATÁS CÉLKITŰZÉSEI

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 (26-33). Korábbi in vitro vizsgálatok ugyanis kimutatták, hogy az etanol gátolja a PMNL-k  $O_2^{\cdot-}$  termelését (38-40), valamint a granulociták és a monociták fagocitózisát (41-43). Az emberi szervezetbe kerülve a fagocita sejtek funkcionális állapotát azonban önmagukban és az etanollal együttesen hatva szintén befolyásolhatják a feketepiacon vásárolt tömény szeszesitalokban 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 (44). 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 szeszesitalokban 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?

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. Felhasznált anyagok

A granulociták és monociták kezelésére használt metanolt, etanolt, 1-propanolt, 2-propanolt, 1-butanolt, 2-butanolt, 2-metil-1-propanolt (izo-butanol), és 3-metil-1-butanolt (izoamil alkohol) a Merck Kft-től (Darmstadt, Németország) szereztük be. A granulociták  $O_2^{\cdot-}$  termelésének vizsgálatánál alkalmazott szuperoxid dizmutázt (SOD, 4500 U/mg fehérje, marha vörösvértestekből kinyert), ferricitokróm c-t, forbol-12,13-dibutirátot (PDBu), N-formil-metionil-leucil-fenilalanint (FMLP), főtális borjú szérumot (FBS) a Sigma-Aldrich Kft-től (Stenheim, Németország) vásároltuk. A sejtek szeparálására használt 1,077 g/ml és 1,119 g/ml sűrűségű Ficoll-Histopaque oldatokat, a fagocitózis meghatározására a zimoan-A részecskéket (*Saccharomyces cerevisiae*), a részecskék és a sejtmagok jelzésére a fluorescein izotiocianátot (FITC), illetve a 4',6'-diamidino-2-fenillindolt (DAPI), valamint a sejtek fixálásra a paraformaldehidet szintén a Sigma-Aldrich Kft-től szereztük be. A monociták specifikus jelzéséhez használt egér anti-humán CD14 monoklonális antitestet a Becton Dickinson Hungary Kft-től (Környe, Magyarország), míg a DyLight 594 anti-egér IgG antitestet a Vector Laboratories Kft-től (Peterborough, Anglia) vásároltuk. A fagocitózis vizsgálatához szükséges sejtenyészítő kamrákat (nyolc kamra/lemez) a VWR International Kft-től (Radnor, PA, USA) rendeltük. A kísérletekhez szükséges humán AB szérumot a Debreceni Regionális Vérellátó Központtól vettük. A vizsgálatokhoz alkalmazott további reagensek [nátrium-klorid, glükóz, kálium-klorid, kalcium-klorid, magnézium klorid, dextrán, nátrium-dihidrogén foszfát, etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), stb.] analitikai tisztaságúak voltak.

### 4.2. Granulociták szeparálása a szuperoxid-anion termelés vizsgálatához

A granulociták szeparálását teljes vérből centrifugálással előállított, a fehérvérsejtek és a trombociták jelentős részét tartalmazó humán „buffy coat” vérkészítményből végeztük. A felhasznált preparátumokat a Debreceni Regionális Vérellátó Központtól vásároltuk. A sejtek izolálására az aznapi utolsó vérvételből származó készítményt használtuk fel. A PMNL-k szeparálására az irodalomban korábban leírt módszereket alkalmaztuk (45, 46). Harmincöt ml „buffy coat” preparátumhoz 15,0 ml 6,0 % dextránt tartalmazó fiziológiás sóoldatot adtunk, majd 60 percen keresztül szobahőmérsékleten, 1,0 g-n állni hagytuk az elegyet a

vörösvértestek kiülepítése céljából. A granulocitákat a preparátumból nyert fehérvérsejt-dús plazmából szeparáltuk Beckman J6-HC (Beckman Instruments, Palo Alto, USA) elutriációs centrifuga segítségével. A sejt-dús plazmát (50,0 ml) 12,0 ml/perc áramlási sebességgel injektáltuk a rendszerbe 2000 fordulat/perc rotor sebességnél 20 °C-on. Az elutriációs puffer 123,0 mM NaCl-ot, 4,9 mM KCl-ot, 16,0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-ot, 0,01% EDTA-t, 5,5 mM glükózt és 0,2% inaktivált borjú szérumot tartalmazott. Fokozatosan (1,0 ml/perc) növelve az elutriációs puffer áramlási sebességét 16,0 ml/percig, 100,0 ml-es frakciókat gyűjtöttünk össze. A centrifugálás leállítását követően az elutriációs kamrában maradt granulocitákat kimostuk. A PMNL-kat ezt követően 350 g-n, 20 °C-on, 5 percig centrifugáltuk (Eppendorf 5810 R, Eppendorf AG, Hamburg, Németország), majd Hanks' oldatban (pH 7,2) 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.

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

A szeparálást követően a granulocitákat ( $6 \times 10^6$  sejt) 60 percig 37,0 °C-on inkubáltuk 1,0 ml 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. Ezeket a koncentrációkat irodalmi adatok és előzetes vizsgálatok alapján határoztuk meg (44). Megállapítottuk, hogy az egyes alifás alkoholok szuperoxid-anion termelést gátló hatása különböző koncentrációknál érvényesül. Ezért minden alifás alkohol esetében eltérő koncentrációterületben végeztük a sejtek kezelését. A PMNL-k etanollal és alifás alkoholok keverékével történt egyidejű inkubációja során minden alkohol végkoncentrációja 10, illetve 20 mM volt. A kezelést követően centrifugában (Eppendorf 5810 R, Eppendorf AG, Hamburg, Németország) 1 percig 2000 fordulat/perc rotor sebességgel centrifugáltuk a sejteket, majd a felülúszót eltávolítva 1,0 ml Hanks' oldatban újra szuszpendáltuk a granulocitákat. A PMNL-k életképességét az alkoholos kezelést követően tripánkék festéssel ellenőriztük, az életképes sejtek aránya minden esetben 90% fölé bizonyult.

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

A  $O_2^{\cdot-}$  termelést ferricitokró-m-c SOD-zal gátolható redukciója alapján határoztuk meg (47). A granulocitákat ( $6 \times 10^5$  sejt) Hanks' oldatban inkubáltuk 15 percig  $37,0^\circ C$ -on PDBu-val, illetve FMLP-vel. Ezek a stimuláló szerek különböző jelátviteli útvonalakon keresztül aktiválják a PMNL-k  $O_2^{\cdot-}$  termelését. A minták végső térfogata  $0,5\text{ ml}$ , a ferricitokró-m-c koncentrációja  $50\ \mu M$ , a PDBu és az FMLP koncentrációja  $100,0\text{ nM}$ , illetve  $1,0\ \mu M$  volt. Az abszorbancia változását spektrofotometriásan mértük  $550\text{ nm}$ -en, kettőssugarú Shimadzu UV-160A spektrofotométer segítségével (Shimadzu Seisakusho Ltd. Kyoto, Japán). A termelt  $O_2^{\cdot-}$  mennyiségét a redukált ferricitokró-m-c moláris extinkciós koefficiense ( $2,1 \times 10^4\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) alapján számítottuk ki (48). Az alifás alkoholok  $O_2^{\cdot-}$  termelésre kifejtett gátló hatásának százalékos arányát a következő képlet alapján számítottuk:  $100 - [(\text{kezelt sejtek } O_2^{\cdot-} \text{ termelése} / \text{kezeletlen sejtek } O_2^{\cdot-} \text{ termelése}) \times 100]$ .

#### **4.5. Mononukleáris fehérvérsejtek és granulociták szeparálása a fagocitózis vizsgálatához**

A Debreceni Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével (protokoll azonosító: DE OEC RKEB/IKEB 3649-2012) és a véradók megfelelő szóbeli és írásbeli tájékoztatását követően egészséges önkéntes egyénektől ( $n=11$ )  $18\text{ ml}$  perifériás vért vettünk EDTA-t tartalmazó Vacutainer csövekbe (Becton-Dickinson, Cedex, Franciaország). A donorok életkora  $23\text{-}54$  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 vérvétel minden alkalommal délelőtt  $8$  és  $9$  óra között történt. Ezt követően azonnal elkezdtük a mononukleáris fehérvérsejtek és a PMNL-k szeparálását, melyre a szakirodalomban korábban leírt módszert alkalmaztuk (49, 50). A vérmintákat Hanks' oldattal kétszeresére hígítottuk, majd kétlépcsős Ficoll sűrűség gradiensre ( $1,077\text{ g/ml}$  és  $1,119\text{ g/ml}$ ) rétegeztük és a mintákat  $400\text{ g-n}$   $20^\circ C$ -on  $30$  percig centrifugáltuk (Eppendorf 5810 R, Eppendorf AG, Hamburg, Németország). A szeparálást követően a mononukleáris sejtek a plazma és az  $1,077\text{ g/ml}$  sűrűségű, míg a granulociták a két különböző sűrűségű Ficoll réteg határán halmozódtak fel. Az így kinyert sejteket összegyűjtöttük, majd kétszer mostuk Hanks' oldattal. A mononukleáris sejtek és a PMNL-k

életképességét tripánkék festéssel ellenőriztük, az életképes sejtek aránya minden esetben legalább 96-98% volt.

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

A zimozán részecskék fluoreszcens jelzését és opszonizálását korábban közölt módszerek alapján végeztük (51). A részecskéket ( $3 \times 10^7$ /ml) 0,01 mg/ml FITC-t tartalmazó karbonát pufferben (pH 9,6) 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 háromszor mostuk, Hanks' oldatban  $3 \times 10^7$ /ml koncentrációban lefagyasztottuk és későbbi felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

#### **4.7. Fagocitózis vizsgálata**

A granulociták és monociták fagocitózisának meghatározása a szakirodalomban leírt módszerek szerint történt (41, 52, 53). A szeparálást követően a sejteket ( $3 \times 10^5$ /kamra) 300 µl 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 300 µl Hanks' oldatban kamránként  $3 \times 10^6$  fagocitálandó FITC-OZ részecskét, és különböző koncentrációban etanolt, az illegális szeszesitalokban megtalálható alifás alkoholokat mértünk, valamint azok keverékét, az etanolt és az alifás alkoholok elegyét adtuk. A granulociták és a monociták kezelése során alkalmazott alifás alkoholkoncentrációkat az 1. számú táblázat tartalmazza. A vizsgálatok során a kezeletlen sejteket tekintettük kontrollnak. Előzetes kísérletek során határoztuk meg a megfelelő részecske/sejtszám arányt, mely 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 zimozán részecskék fluoreszcenciáját tripánkék festéssel kioltottuk. A sejteket 4%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk, sejtmagjukat 4',6'-diamidino-2-fenillindollal (DAPI) festettük. A monociták azonosítására indirekt immunfluoreszcens módszert alkalmaztunk (54). Először CD14 ellenes, majd DyLight 594 fluoureszcens festéssel konjugált IgG monoklonális antitestekkel specifikusan jelöltük a monocitákat. 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 indexszel (FI) fejeztük ki (100 sejt által bekebelezett részecskék száma/100).

### 1. táblázat

#### Granulociták és monociták kezelése során alkalmazott alifás alkoholkoncentrációk

alifás alkohol	alkalmazott koncentrációk granulociták esetében	alkalmazott koncentrációk monociták esetében
metanol		
etanol		
1-propanol	0,05 mM	0,005 mM
2-propanol	0,5 mM	0,05 mM
1-butanol	1,0 mM	0,5 mM
2-butanol	10,0 mM	5,0 mM
izo-butanol		
izoamil alkohol		
alifás alkohol keverék	0,05 mM	0,005 mM
	0,5 mM	0,05 mM
	5,0 mM	0,5 mM
alifás alkohol keverék + etanol (EtOH)	0,05 mM + 10,0 mM EtOH	0,005 mM + 10,0 mM EtOH
	0,5 mM + 10,0 mM EtOH	0,05 mM + 10,0 mM EtOH
	5,0 mM + 10,0 mM EtOH	0,5 mM + 10,0 mM EtOH

#### **4.8. Az eredmények prezentálása és statisztikai elemzés**

A dolgozatban lévő ábrákon hat független kísérlet eredményeinek az átlagértékeit és a szórást [ $\pm$ standard deviáció (SD)] tüntettük fel. 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.

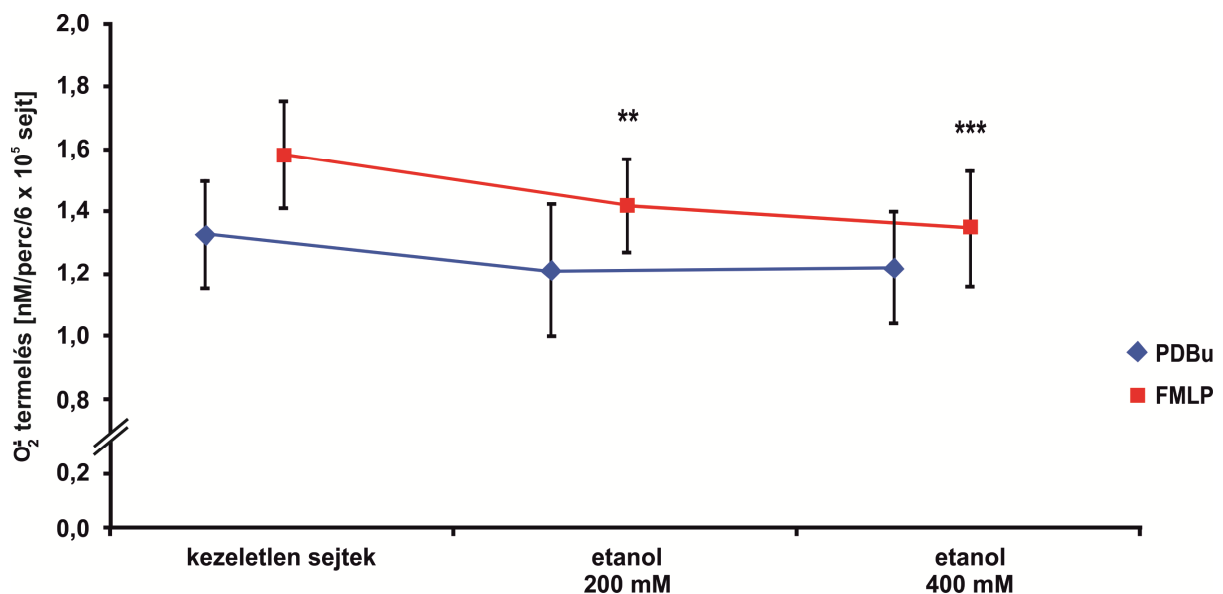
## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. Az alifás alkoholok hatása granulociták szuperoxid-anion termelésére

A 6. ábrán az etanolnak a granulociták FMLP-vel és PDBu-val stimulált  $O_2^{\cdot-}$  termelésére gyakorolt hatása látható. A kezeletlen PMNL-k átlagos  $O_2^{\cdot-}$  termelése PDBu stimuláció esetén  $1,499 \pm 0,131$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt, míg az FMLP által indukált  $1,693 \pm 0,130$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt volt. Etanollal történt kezelés hatására 200 mM-os, illetve 400 mM-os koncentrációknál figyeltünk meg szignifikáns csökkenést az FMLP-indukálta  $O_2^{\cdot-}$  produkcióban. A  $O_2^{\cdot-}$  termelés átlagértéke 200 mM-nál  $1,569 \pm 0,115$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt, míg 400 mM-nál  $1,513 \pm 0,138$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt volt ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ). A granulociták PDBu-indukálta  $O_2^{\cdot-}$  produkciójában nem volt szignifikáns különbség a kezeletlen sejtekhez viszonyítva.

6. ábra

Az etanol hatása PDBu-val és FMLP-vel stimulált granulociták szuperoxid-anion produkciójára

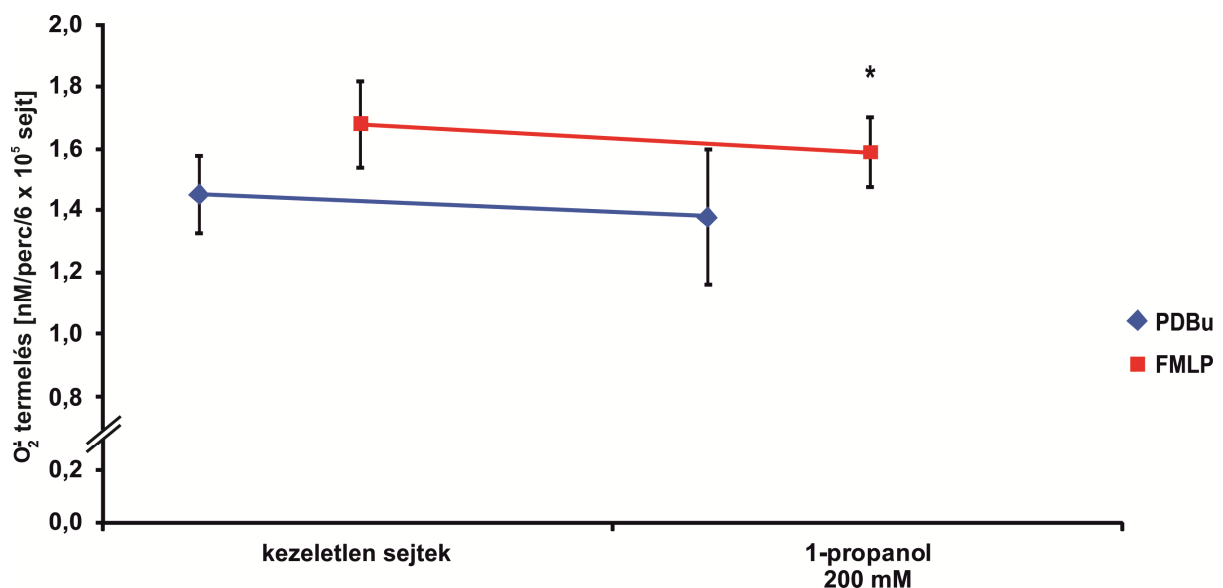


A granulocitákat humán „buffy coat” preparátumból szeparáltuk, majd 1 órán keresztül etanollal inkubáltuk. A kezelést követően a sejteket centrifugáltuk és 1,0 ml Hanks’ oldatban újra szuszpendáltuk. A granulocitákat 15 percig inkubáltuk FMLP-vel, illetve PDBu-val, majd spektrofotometriásan mértük az abszorbancia változást. Az ábrán hat független mérés eredményeiből számított átlagértékek és a szórások (SD±) láthatóak. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

A 7. ábra az 1-propanolnak a PMNL-k  $O_2^{\cdot -}$  termelésére gyakorolt hatását mutatja FMLP-vel és PDBu-val történt stimulálást követően. A kezeletlen granulociták átlagos  $O_2^{\cdot -}$  termelése PDBu-val és FMLP-vel indukálva  $1,462 \pm 0,127$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt, illetve  $1,687 \pm 0,140$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt volt. Az 1-propanollal történt kezelés hatására 200 mM-os koncentrációnál szignifikánsan csökkent a PMNL-k FMLP-stimulálta  $O_2^{\cdot -}$  produkciója ( $1,597 \pm 0,114$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt,  $p < 0,05$ ), míg a sejtek PDBu-val indukált  $O_2^{\cdot -}$  termelésében nem volt szignifikáns csökkenés a kontrollhoz képest.

7. ábra

**Az 1-propanol hatása PDBu-val és FMLP-vel stimulált granulociták szuperoxid-anion  
produkcójára**

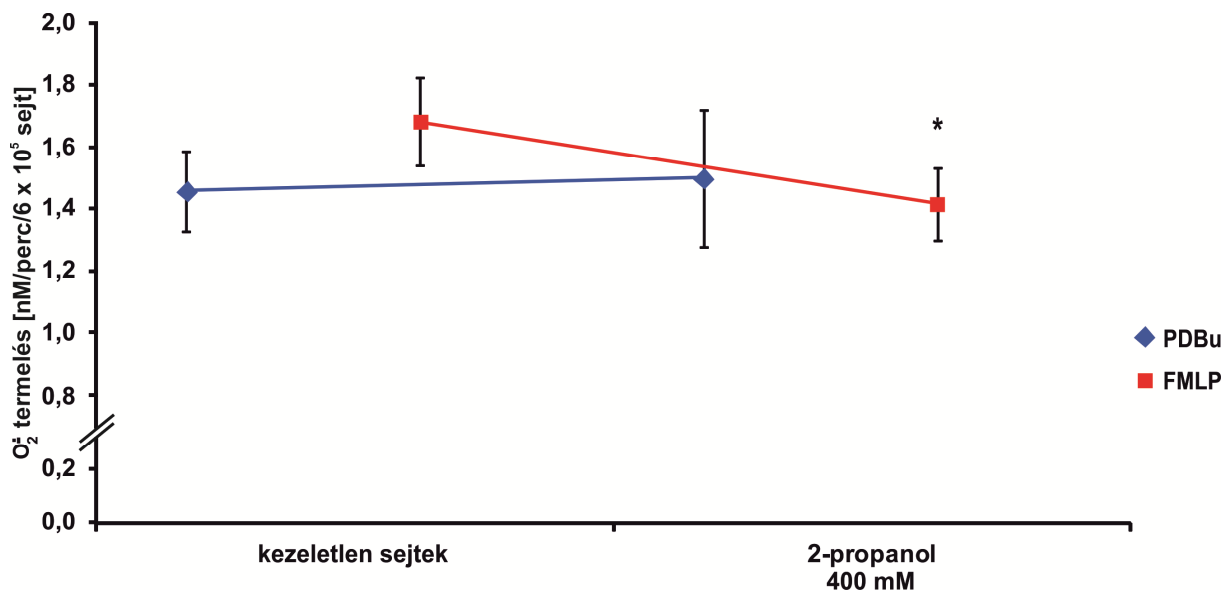


A granulocitákat humán „buffy coat” preparátumból szeparáltuk, majd 1 órán keresztül 1-propanollal inkubáltuk. A kezelést követően a sejteket centrifugáltuk és 1,0 ml Hanks' oldatban újra szuszpendáltuk. A granulocitákat 15 percig inkubáltuk FMLP-vel, illetve PDBu-val, majd spektrofotometriásan mértük az abszorbancia változást. Az ábrán hat független mérés eredményéből számított átlagértékek és a szórások (SD±) láthatóak. \*  $p < 0,05$

A 2-propanolnak a granulociták FMLP-vel és PDBu-val stimulált  $O_2^{\cdot -}$  termelésére gyakorolt hatása a 8. ábrán látható. A kezeletlen granulociták átlagos  $O_2^{\cdot -}$  termelése PDBu-val történt stimulációnál  $1,466 \pm 0,131$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt, míg FMLP-vel indukálva  $1,687 \pm 0,154$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt volt. A 2-propanol hatására 400 mM-os koncentrációnál figyeltünk meg szignifikáns csökkenést az FMLP-vel stimulált  $O_2^{\cdot -}$  produkcióban ( $1,424 \pm 0,257$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt,  $p < 0,05$ ), a neutrofilek PDBu-indukálta  $O_2^{\cdot -}$  termelésében azonban nem volt szignifikáns eltérés a kezeletlen sejtekhez viszonyítva.

### 8. ábra

#### A 2-propanol hatása PDBu-val és FMLP-vel stimulált granulociták szuperoxid-anion produkcójára

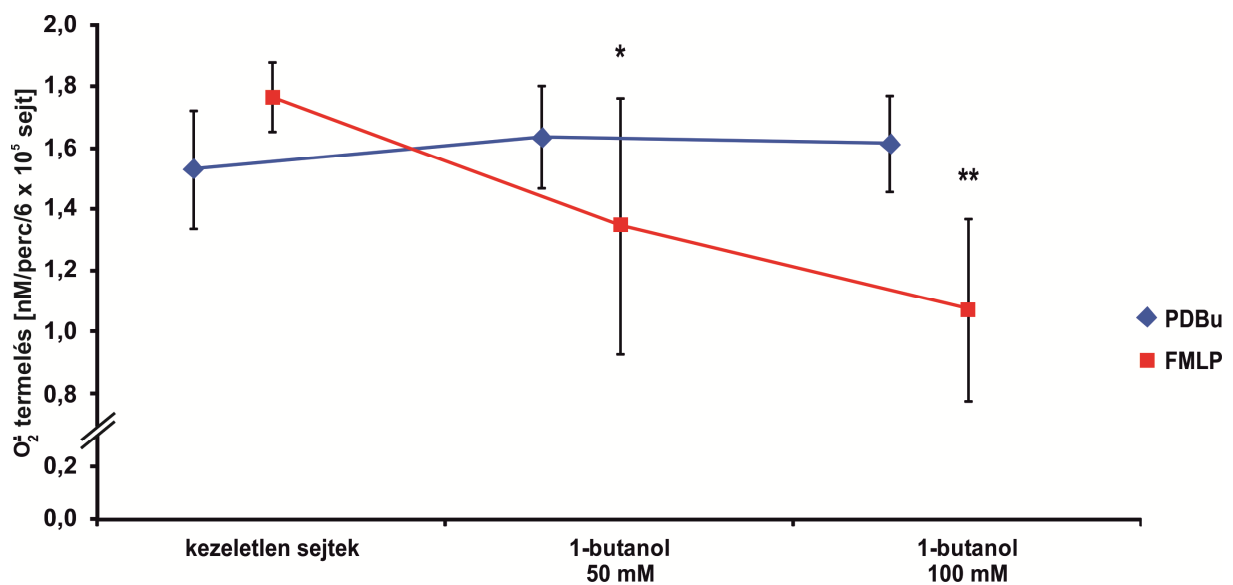


A granulocitákat humán „buffy coat” preparátumból szeparáltuk, majd 1 órán keresztül 2-propanollal inkubáltuk. A kezelést követően a sejteket centrifugáltuk és 1,0 ml Hanks' oldatban újra szuszpendáltuk. A granulocitákat 15 percig inkubáltuk FMLP-vel, illetve PDBu-val, majd spektrofotometriásan mértük az abszorbancia változást. Az ábrán hat független mérés eredményeiből számított átlagértékek és a szórások ( $SD \pm$ ) láthatóak. \*  $p < 0,05$

A 9. ábrán az 1-butanolnak a granulociták  $O_2^{\cdot -}$  termelésére gyakorolt hatása látható FMLP-vel és PDBu-val történt stimuláció esetén. A kezetlen granulociták átlagos  $O_2^{\cdot -}$  produkciója PDBu stimuláció hatására  $1,528 \pm 0,192$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt, míg FMLP-vel indukálva  $1,765 \pm 0,113$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt volt. Az 1-butanollal történt kezelés esetén 50, illetve 100 mM-os koncentrációknál volt megfigyelhető szignifikáns gátlás az FMLP-vel stimulált  $O_2^{\cdot -}$  termelésében, melynek átlagértéke 50 mM-os koncentrációnál  $1,342 \pm 0,418$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt, míg 100 mM-osnál  $1,069 \pm 0,300$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt volt ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$ ). A granulociták PDBu-indukálta  $O_2^{\cdot -}$  produkciójában nem volt szignifikáns csökkenés a kontrollokhöz viszonyítva.

### 9. ábra

#### Az 1-butanol hatása PDBu-val és FMLP-vel stimulált granulociták szuperoxid-anion produkciójára

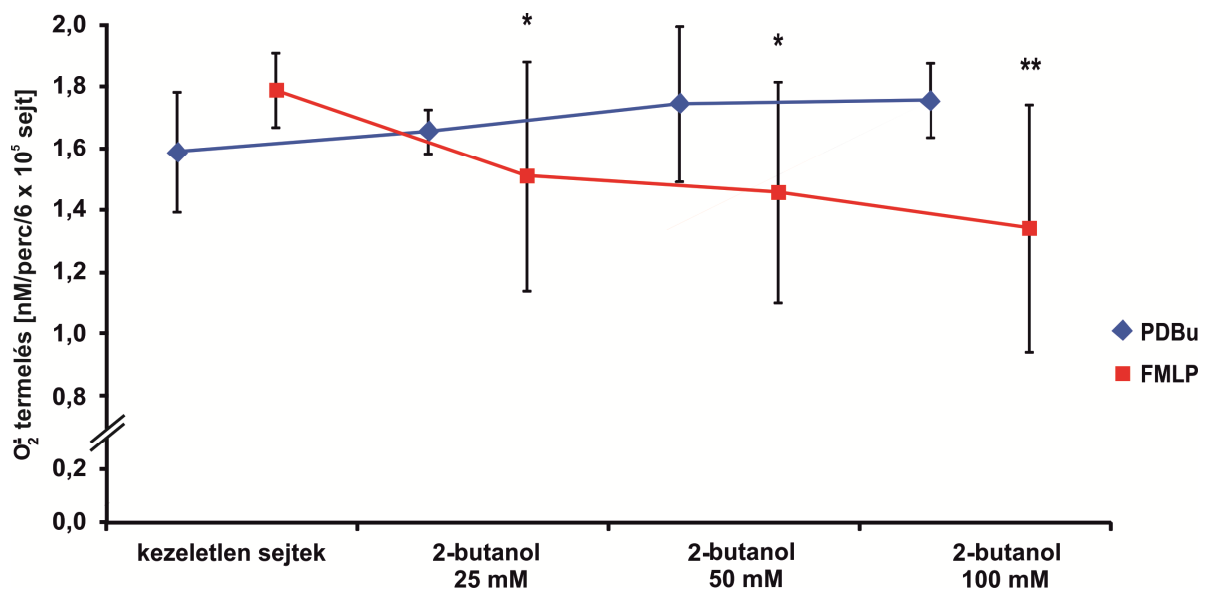


A polimorfonukleáris leukocitákat humán „buffy coat” preparátumból szeparáltuk, majd 1 órán keresztül 1-butanollal inkubáltuk. A kezelést követően a sejteket centrifugáltuk és 1,0 ml Hanks’ oldatban újra szuszpendáltuk. A granulocitákat 15 percig inkubáltuk FMLP-vel, illetve PDBu-val, majd spektrofotometriásan mértük az abszorbancia változást. Az ábrán hat független mérés átlagából számított átlagértékek és a szórások (SD±) láthatóak. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$

A 10. ábrán a 2-butanolnak a PMNL-k  $O_2^{\cdot -}$  termelésére gyakorolt hatása látható FMLP-vel és PDBu-val végzett stimuláció esetén. A kezeletlen granulociták átlagos  $O_2^{\cdot -}$  termelése PDBu stimulációnál  $1,589 \pm 0,197$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt, míg FMLP-vel indukálva  $1,790 \pm 0,122$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt volt. A 2-butanollal történt kezelés esetén szignifikáns gátlás 25 mM-os, 50 mM-os, illetve 100 mM-os koncentrációknál volt megfigyelhető az FMLP-vel stimulált sejtek  $O_2^{\cdot -}$  produkciójában. Ezek átlag értéke 25 mM-nál  $1,513 \pm 0,373$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt, 50 mM-nál  $1,457 \pm 0,359$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt, míg 100 mM-nál  $1,341 \pm 0,405$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt volt. A granulociták PDBu-indukálta  $O_2^{\cdot -}$  termelésében nem volt szignifikáns csökkenés a controlokhoz viszonyítva.

10. ábra

**A 2-butanol hatása PDBu-val és FMLP-vel stimulált granulociták szuperoxid-anion  
produkcójára**

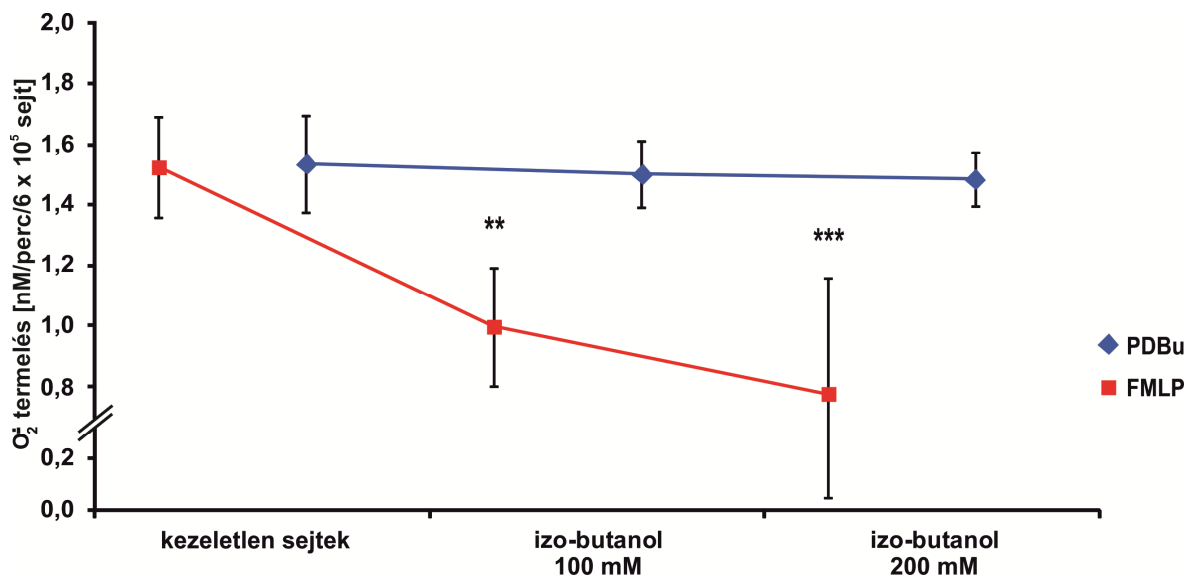


A polimorfonukleáris leukocitákat humán „buffy coat” preparátumból szeparáltuk, majd 1 órán keresztül 2-butanollal inkubáltuk. A kezelést követően a sejteket centrifugáltuk és 1,0 ml Hanks’ oldatban újra szuszpendáltuk. A granulocitákat 15 percig inkubáltuk FMLP-vel, illetve PDBu-val, majd spektrofotometriásan mértük az abszorbancia változást. Az ábrán hat független mérés átlagából számított átlagértékek és a szórások (SD±) láthatóak. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

A 11. ábrán az izo-butanolnak a granulociták  $O_2^{\cdot-}$  termelésére gyakorolt hatása látható FMLP-vel és PDBu-val végzett stimuláció esetén. A kezetlen granulociták átlagos  $O_2^{\cdot-}$  termelése PDBu stimulációval  $1,540 \pm 0,157$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt, míg FMLP-vel  $1,531 \pm 0,164$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt volt. Az izo-butanol hatására 100 mM-os, és 200 mM koncentrációnál volt megfigyelhető szignifikáns csökkenés az FMLP-vel stimulált PMNL-k  $O_2^{\cdot-}$  termelésében. Ezek átlagértéke 100 mM-nál  $1,007 \pm 0,193$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt, míg 200 mM-nál  $0,785 \pm 0,384$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt volt. A PMNL-k PDBu-indukálta  $O_2^{\cdot-}$  termelésében nem volt szignifikáns eltérés a kezetlen sejtekhez képest.

### 11. ábra

#### Az izo-butanol hatása PDBu-val és FMLP-vel stimulált granulociták szuperoxid-anion termelésére

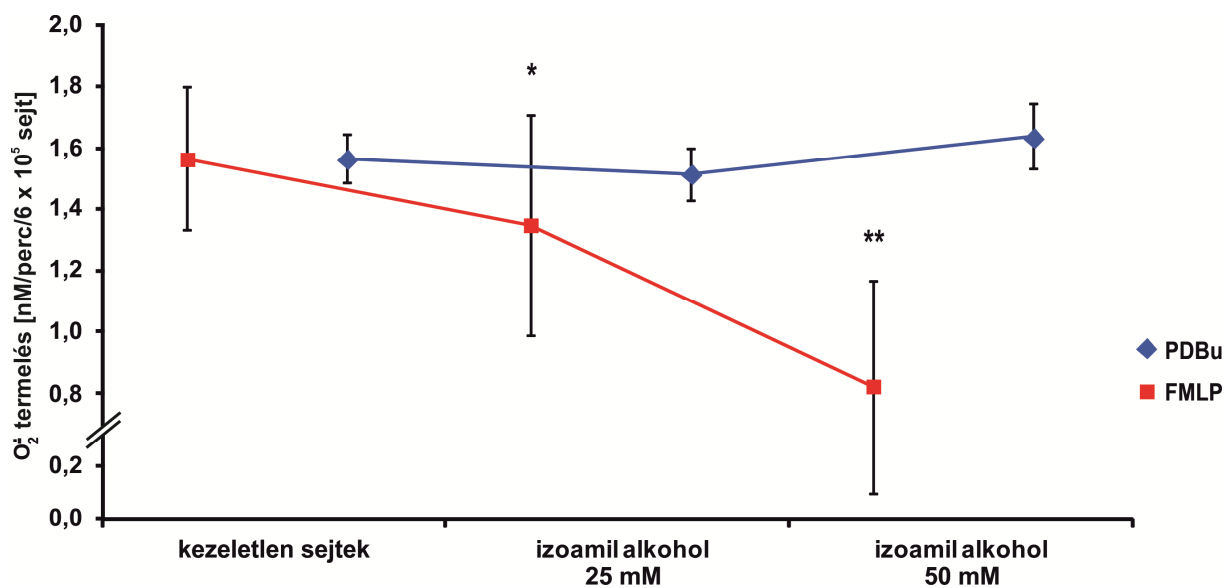


A polimorfonukleáris leukocitákat humán „buffy coat” preparátumból szeparáltuk, majd 1 órán keresztül izo-butanollal inkubáltuk. A kezelést követően a sejteket centrifugáltuk és 1,0 ml Hanks’ oldatban újra szuszpendáltuk. A granulocitákat 15 percig inkubáltuk FMLP-vel, illetve PDBu-val, majd spektrofotometriásan mértük az abszorbancia változást. Az ábrán hat független mérés átlagából számított átlagértékek és a szórások (SD±) láthatóak. \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001

A 12. ábrán az izoamil alkoholnak a PMNL-k  $O_2^{\cdot -}$  termelésére gyakorolt hatása látható FMLP-vel és PDBu-val történt stimuláció esetén. A kezeletlen PMNL-k  $O_2^{\cdot -}$  produkciója PDBu stimuláció hatására  $1,570 \pm 0,080$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt, FMLP-vel indukálva pedig  $1,570 \pm 0,236$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt volt. Az izoamil alkohollal történt kezelés esetén szignifikáns gátlást 25 mM-os, illetve 50 mM-os koncentrációnál figyeltünk meg az FMLP-vel stimulált sejtek  $O_2^{\cdot -}$  termelésében a kezeletlen granulocitákhoz képest ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ). Az átlagérték 25 mM-nál  $1,349 \pm 0,366$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt, míg 50 mM-nál  $0,815 \pm 0,354$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt volt. A sejtek PDBu-indukálta  $O_2^{\cdot -}$  produkciójában nem volt szignifikáns változás a kontrollokhöz viszonyítva.

12. ábra

**Az izoamil alkohol hatása PDBu-val és FMLP-vel stimulált granulociták szuperoxid-anion produkciójára**

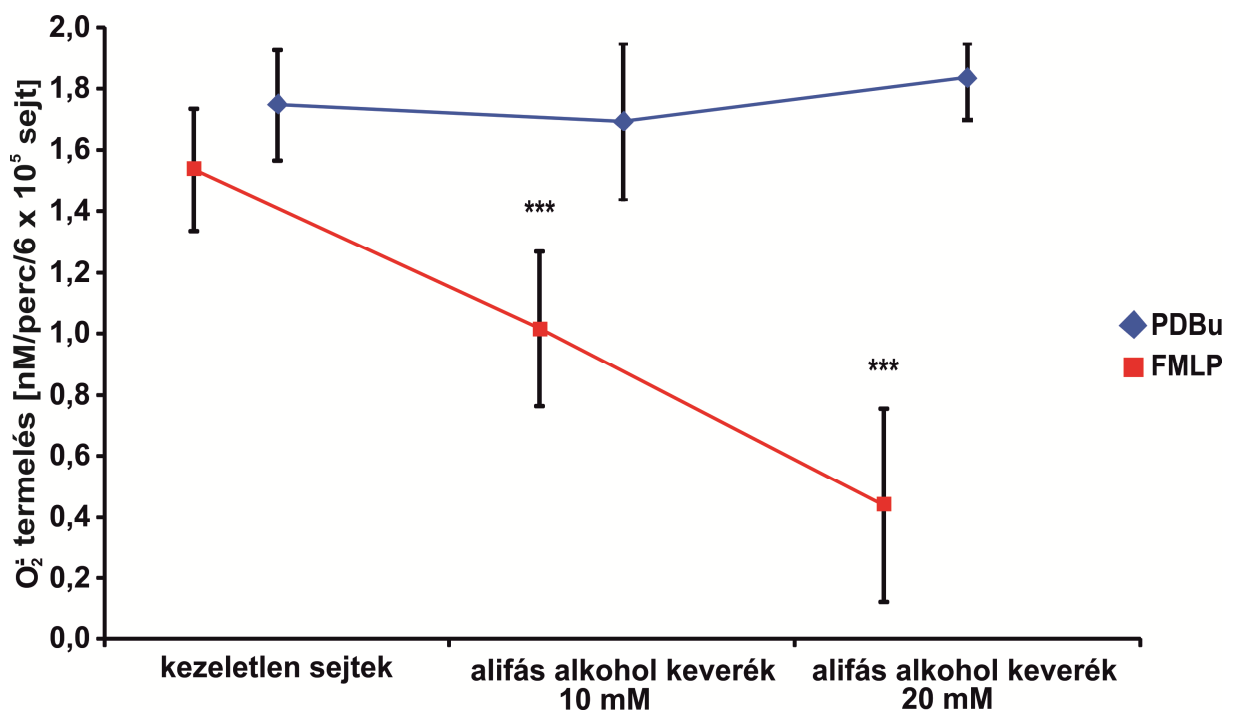


A polimorfonukleáris leukocitákat humán „buffy coat” preparátumból szeparáltuk, majd 1 órán keresztül izoamil alkohollal inkubáltuk. A kezelést követően a sejteket centrifugáltuk és 1,0 ml Hanks’ oldatban újra szuszpendáltuk. A granulocitákat 15 percig inkubáltuk FMLP-vel, illetve PDBu-val, majd spektrofotometriásan mértük az abszorbancia változást. Az ábrán hat független mérés átlagából számított átlagértékek és a szórások (SD±) láthatóak. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

A 13. ábrán az alifás alkoholok keverékének granulociták  $O_2^{\cdot-}$  termelésére gyakorolt hatása látható FMLP-vel és PDBu-val történt stimuláció esetén. A kezeletlen PMNL-k átlagos  $O_2^{\cdot-}$  termelése PDBu stimulációval  $1,802 \pm 0,180$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt, míg FMLP-vel  $1,538 \pm 0,200$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt volt. Az alifás alkoholok keverékének hatására, ha az etanol és egyes alkoholok végkoncentrációja 10 mM, illetve 20 mM volt, szignifikánsan csökkent az FMLP-vel stimulált granulociták  $O_2^{\cdot-}$  produkciója. Az átlagérték 10 mM-nál  $1,019 \pm 0,254$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt, míg 20 mM-nál  $0,441 \pm 0,318$  nM/perc/ $6 \times 10^5$  sejt volt. A sejtek PDBu-indukálta  $O_2^{\cdot-}$  termelésében nem volt szignifikáns eltérés a kezeletlen granulocitákhoz képest.

13. ábra

Az alifás alkohol keverék hatása PDBu-val és FMLP-vel stimulált granulociták szuperoxid-anion produkciójára



A polimorfonukleáris leukocitákat humán „buffy coat” preparátumból szeparáltuk, majd 1 órán keresztül alifás alkoholok keverékével inkubáltuk. A kezelést követően a sejteket centrifugáltuk és 1,0 ml Hanks' oldatban újra szuszpendáltuk. A granulocitákat 15 percig inkubáltuk FMLP-vel, illetve PDBu-val, majd spektrofotometriásan mértük az abszorbancia változást. Az ábrán hat független mérés átlagából számított átlagértékek és a szórások (SD±) láthatóak. \*\*\*p < 0,001

## Az alifás alkoholok szuperoxid-anion termelést gátló hatásának mértéke

A 2. számú táblázatban az etanol, az egyes alifás alkoholok, valamint azok keverékének  $O_2^{\cdot-}$  termelést csökkentő legkisebb hatásos koncentrációi, valamint a  $O_2^{\cdot-}$  termelés gátlásának mértéke látható százalékban kifejezve. A táblázatban szereplő adatok összehasonlításával megállapítható, hogy a granulociták FMLP-indukálta  $O_2^{\cdot-}$  termelésére a legkisebb gátlóhatást az 1-propanol, míg a legnagyobbat az izo-butanol fejtette ki. Az alifás alkoholokat keverékben alkalmazva az egyedi kezelésekhez képest csökkent a minimális hatásos koncentráció, ugyanakkor megnövekedett a  $O_2^{\cdot-}$  termelés gátlásának mértéke.

### 2. táblázat

#### Az alifás alkoholok szuperoxid-anion termelést gátló hatásának mértéke

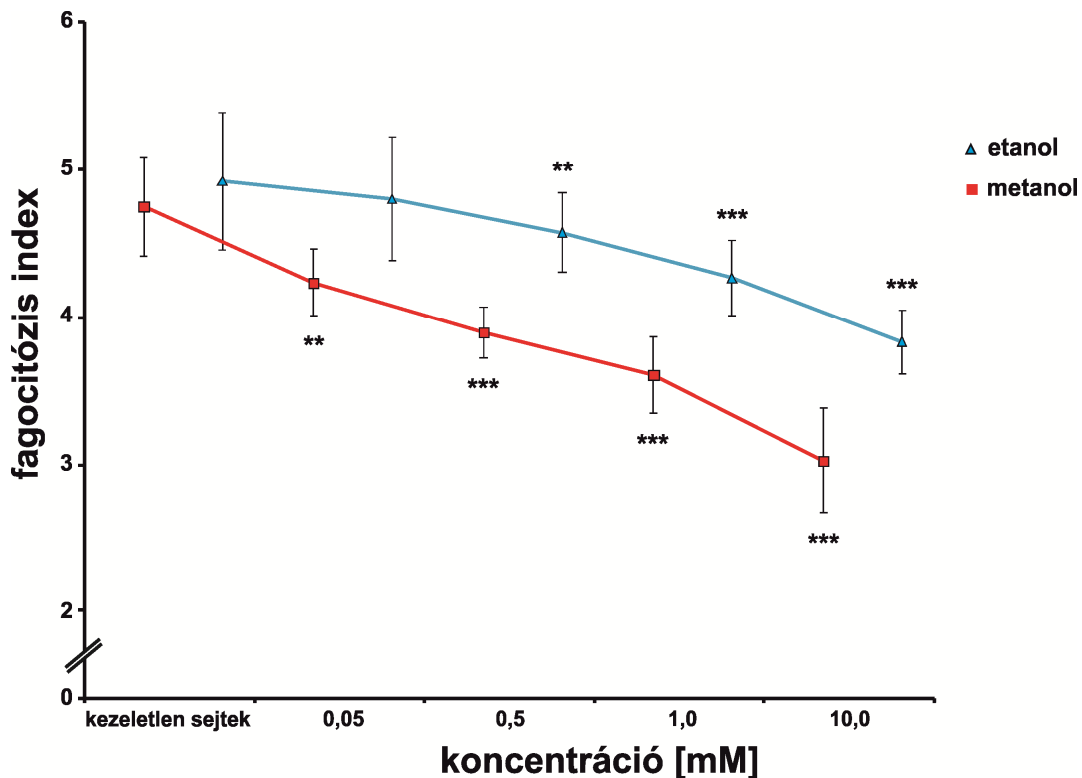
alifás alkohol	legkisebb hatásos koncentráció [mM]	szuperoxid-anion gátlásának mértéke a legkisebb hatásos koncentráció esetében [%]
1-propanol	200	5,3
etanol	200	7,3
izoamil alkohol	25	14,0
2-butanol	25	15,5
2-propanol	400	15,6
1-butanol	50	23,9
izo-butanol	100	34,2
alifás alkohol keverék	10*	66,3

\* az egyes alkoholok végkoncentrációja az inkubációs elegyben

## 5.2. Az alifás alkoholok hatása granulociták fagocitózisára

A 14. ábra az etanol és a metanol granulociták fagocitózisára gyakorolt hatását mutatja. Etanollal történt kezelés esetén 0,5 mM-os (FI:  $4,57 \pm 0,27$ ), 1,0 mM-os (FI:  $4,27 \pm 0,25$ ) és 10 mM-os (FI:  $3,82 \pm 0,22$ ) koncentrációknál figyeltünk meg szignifikáns csökkenést a sejtek fagocitózisának mértékében a kezeltlen sejtekhez (FI:  $4,92 \pm 0,46$ ) viszonyítva. Szignifikáns volt a különbség a kontroll sejtek (FI:  $4,75 \pm 0,34$ ) és a metanollal inkubált granulociták fagocita aktivitásában a következő koncentrációknál: 0,05 mM (FI:  $4,24 \pm 0,23$ ), 0,5 mM (FI:  $3,90 \pm 0,17$ ), 1 mM (FI:  $3,61 \pm 0,26$ ) és 10 mM (FI:  $3,03 \pm 0,36$ ).

14. ábra  
Az etanol és a metanol hatása granulociták fagocitózisára

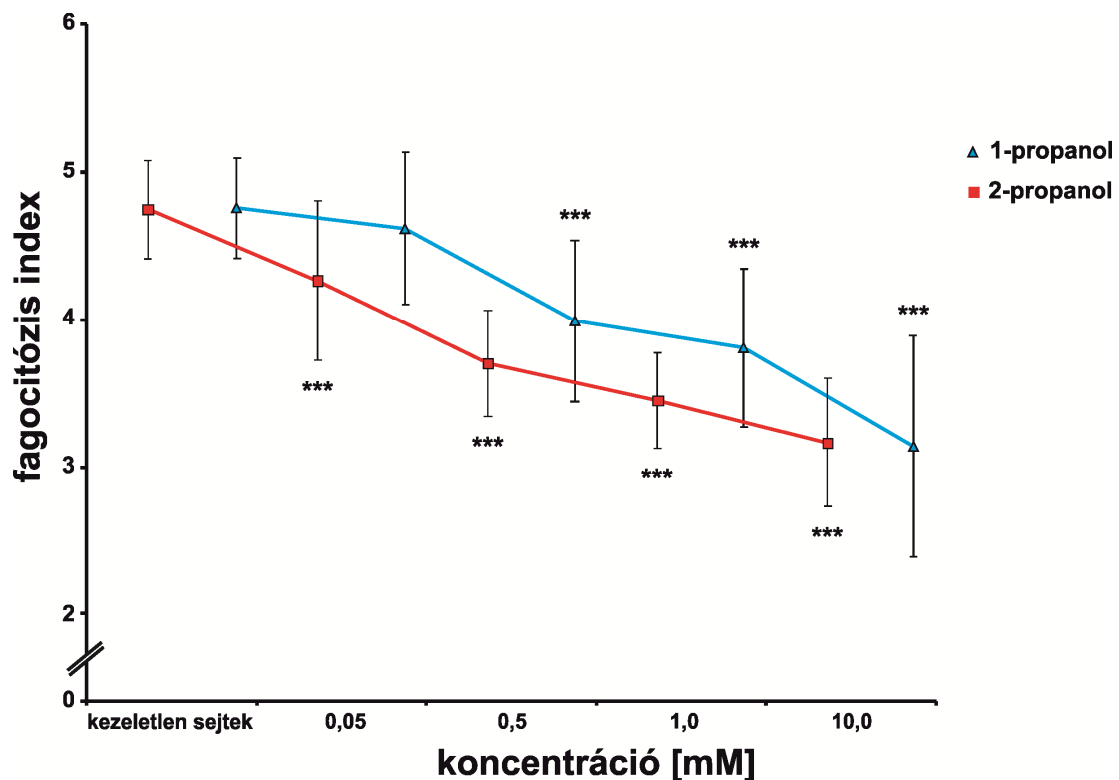


A granulocitákat egészséges donorok vénás véréből szeparáltuk Ficoll sűrűség gradiensen történő centrifugálással. Ezt követően a sejteket FITC-OZ ( $1 \times 10^7$ /ml) részecskéket és etanolt, vagy metanolt tartalmazó Hanks' oldatban inkubáltuk 1 órán keresztül  $37^\circ\text{C}$ -on. A kezelést követően az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint meghatároztuk a kezeltlen és a kezelt sejtek fagocitózisát. Az ábrán hat független mérés átlagából számított átlagértékek és a szórások ( $\text{SD} \pm$ ) láthatóak. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

A 15. ábrán az 1-propanol és a 2-propanol hatása látható a PMNL-k fagocitózisára. A kezeletlen sejtekhez (FI:  $4,75 \pm 0,34$ ) viszonyítva, a fagocitózis index szignifikánsan csökkent a granulociták 1-propanollal [0,5 mM (FI:  $3,98 \pm 0,54$ ), 1,0 mM (FI:  $3,80 \pm 0,53$ ), 10 mM (FI:  $3,13 \pm 0,75$ )], illetve 2-propanollal [0,05 mM (FI:  $4,27 \pm 0,54$ ), 0,5 mM (FI:  $3,70 \pm 0,36$ ), 1,0 mM (FI:  $3,45 \pm 0,32$ ), 10 mM (FI:  $3,17 \pm 0,43$ )] történt kezelése esetén.

15. ábra

Az 1-propanol és a 2-propanol hatása a granulociták fagocitózisára

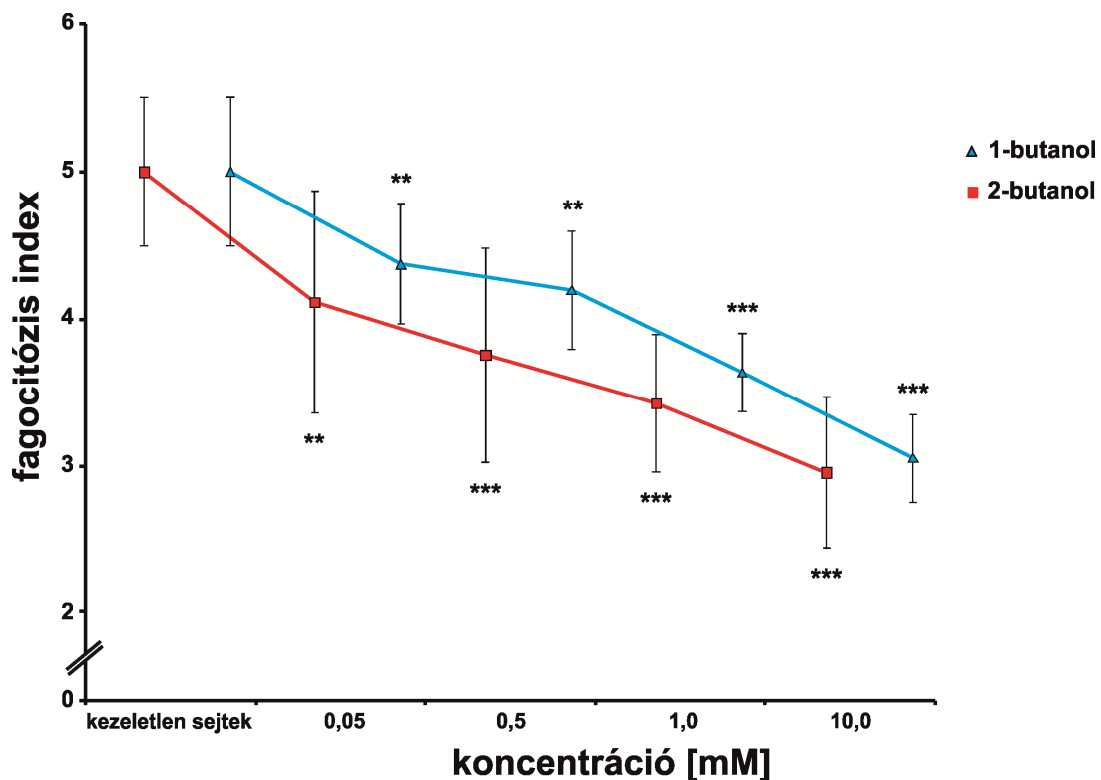


A granulocitákat egészséges donorok vénás véréből szeparáltuk Ficoll sűrűség gradiensen történő centrifugálással. Ezt követően a sejteket FITC-OZ ( $1 \times 10^7$ /ml) részecskéket és 1-propanolt, vagy 2-propanolt tartalmazó Hanks' oldatban inkubáltuk 1 órán keresztül 37 °C-on. A kezelést követően az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint meghatároztuk a kezeletlen és a kezelt sejtek fagocitózisát. Az ábrán hat független mérés átlagából számított átlagértékek és a szórások ( $SD \pm$ ) láthatóak. \*\*\* $p < 0,001$

Az 1-butanol és a 2-butanol granulociták fagocitózisára gyakorolt hatását a 16. ábra mutatja. A kezeletlen sejtekhez (FI:  $5,01 \pm 0,50$ ) viszonyítva, az 1-butanollal [0,05 mM (FI:  $4,38 \pm 0,41$ ), 0,5 mM (FI:  $4,20 \pm 0,40$ ), 1,0 mM (FI:  $3,65 \pm 0,27$ ), 10,0 mM (FI:  $3,07 \pm 0,30$ )], valamint 2-butanollal [0,05 mM (FI:  $4,13 \pm 0,75$ ), 0,5 mM (FI:  $3,77 \pm 0,72$ ), 1,0 mM (FI:  $3,44 \pm 0,47$ ), 10,0 mM (FI:  $2,97 \pm 0,51$ )] inkubált granulociták szignifikánsan kevesebb FITC-OZ részecskét kebeleztek be.

16. ábra

Az 1-butanol és a 2-butanol hatása a granulociták fagocitózisára

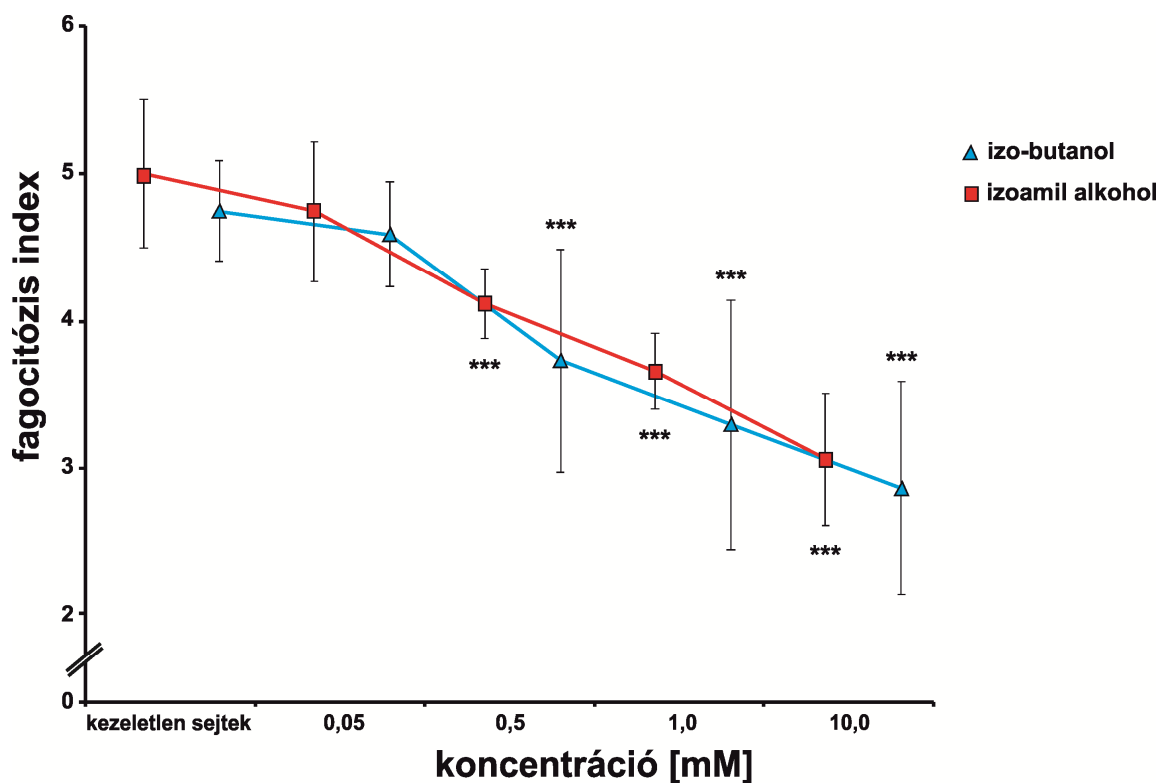


A granulocitákat egészséges donorok vénás véréből szeparáltuk Ficoll sűrűség gradiensen történő centrifugálással. Ezt követően a sejteket FITC-OZ ( $1 \times 10^7$ /ml) részecskéket és 1-butanolt, vagy 2-butanolt tartalmazó Hanks' oldatban inkubáltuk 1 órán keresztül  $37^\circ\text{C}$ -on. A kezelést követően az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint meghatároztuk a kezeletlen és a kezelt sejtek fagocitózisát. Az ábrán hat független mérés átlagából számított átlagértékek és a szórások ( $SD \pm$ ) láthatóak. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

A 17. ábrán az izo-butanol és az izoamil alkohol hatása látható a granulociták fagocitózisára. Az izo-butanollal történt kezelést követően szignifikánsan csökkent a sejtek fagocita funkciója [kontroll (FI:  $4,75 \pm 0,34$ ), 0,5 mM (FI:  $3,74 \pm 0,75$ ), 1,0 mM (FI:  $3,31 \pm 0,84$ ), 10,0 mM (FI:  $2,88 \pm 0,72$ )], továbbá az izoamil alkohol koncentrációtól függő módon gátolta a granulociták fagocitózisát [kontroll (FI:  $5,01 \pm 0,50$ ), 0,5 mM (FI:  $4,13 \pm 0,24$ ), 1,0 mM (FI:  $3,67 \pm 0,26$ ), 10,0 mM (FI:  $3,07 \pm 0,44$ )].

17. ábra

Az izo-butanol és az izoamil alkohol hatása a granulociták fagocitózisára

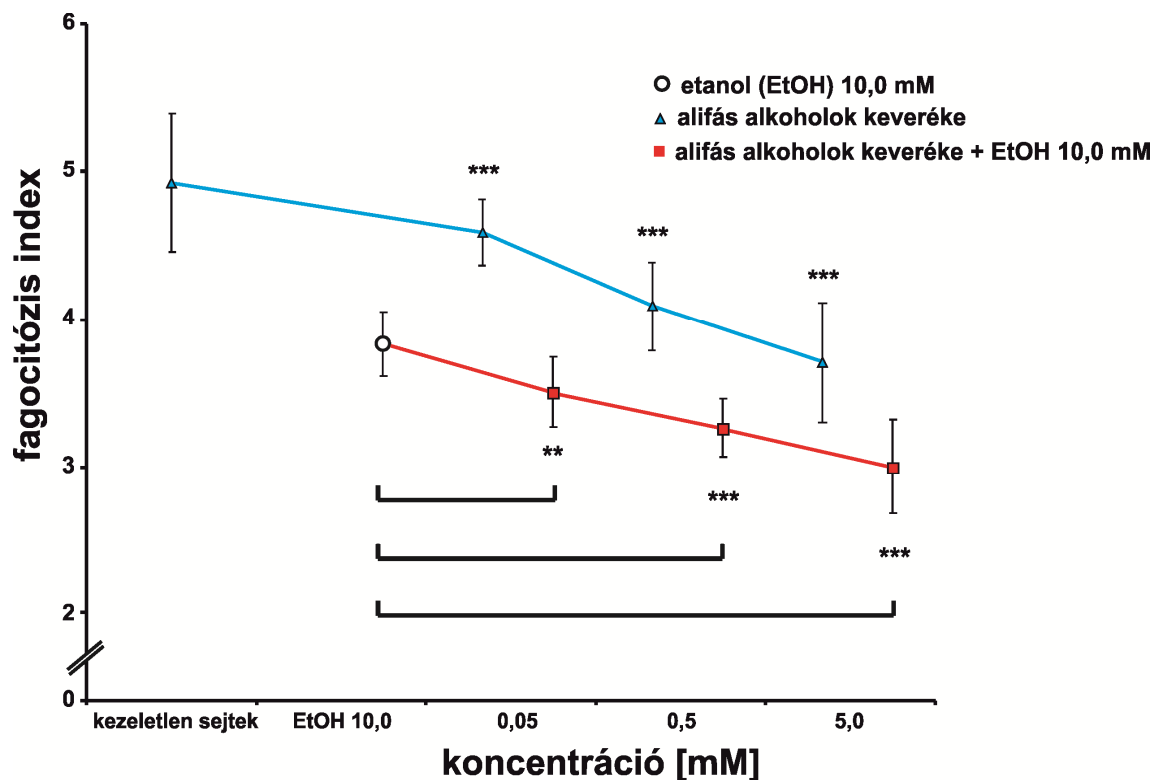


A granulocitákat egészséges donorok vénás véréből szeparáltuk Ficoll sűrűség gradiensen történő centrifugálással. Ezt követően a sejteket FITC-OZ ( $1 \times 10^7$ /ml) részecskéket és izo-butanolt, vagy izoamil alkoholt tartalmazó Hanks' oldatban inkubáltuk 1 órán keresztül  $37^\circ\text{C}$ -on. A kezelést követően az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint meghatároztuk a kezeletlen és a kezelt sejtek fagocitózisát. Az ábrán hat független mérés átlagából számított átlagértékek és a szórások ( $\text{SD} \pm$ ) láthatóak. \*\*\* $p < 0,001$

A 18. ábra mutatja az alifás alkoholok keverékének hatását a granulociták fagocitózisára etanol nélkül, illetve etanollal együtt. Csak alifás alkoholok keverékének jelenlétében a PMNL-k fagocitózis indexe [0,05 mM (FI:  $4,59 \pm 0,22$ ), 0,5 mM (FI:  $4,09 \pm 0,30$ ), 5,0 mM (FI:  $3,71 \pm 0,40$ )] szignifikánsan kisebb volt a kezeltlen sejtekhez (FI:  $4,92 \pm 0,46$ ) viszonyítva. Összehasonlítva a kizárólag 10 mM etanollal (FI:  $3,84 \pm 0,22$ ) inkubált sejtekkel, az etanollal és egyidejűleg alifás alkoholok elegyével kezelt granulociták fagocitózisának mértéke [0,05 mM (FI:  $3,51 \pm 0,24$ ), 0,5 mM (FI:  $3,27 \pm 0,20$ ), 5,0 mM (FI:  $3,01 \pm 0,32$ )] szignifikánsan tovább csökkent. Ebben az esetben a kezeltlen sejtek fagocitózis indexe:  $4,78 \pm 0,29$  volt.

### 18. ábra

**Az alifás alkoholok keverékének, valamint az etanol és az alifás alkoholok keverékének együttes hatása a granulociták fagocitózisára**



A granulocitákat egészséges donorok vénás véréből szeparáltuk Ficoll sűrűség gradiensen történő centrifugálással. Ezt követően a sejteket FITC-OZ ( $1 \times 10^7$ /ml) részecskéket és 10 mM etanolt, alifás alkohol keverékét, vagy egyidejűleg 10,0 mM etanolt és alifás alkohol keverékét tartalmazó Hanks' oldatban inkubáltuk 1 órán keresztül  $37^\circ\text{C}$ -on. A kezelést követően az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint meghatároztuk a kezeltlen és a kezelt sejtek fagocitózisát. Az ábrán hat független mérés átlagából számított átlagértékek és a szórások (SD $\pm$ ) láthatóak. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

### **Az alifás alkoholok granulocita fagocitózist gátló hatásának mértéke**

A 3. számú táblázatban az etanol, az egyes alifás alkoholok, valamint azok keverékének granulociták fagocitózist gátló legkisebb hatásos koncentrációi, valamint a fagocita aktivitás csökkenésének mértéke látható százalékban kifejezve. A táblázatban szereplő adatok összehasonlításával megállapítható, hogy a granulociták fagocita funkciójára az egyes alifás alkoholok közül a legkisebb gátlóhatást az etanol, míg a legnagyobbat az izo-butanol mutatta.

#### **3. táblázat**

##### **Az alifás alkoholok granulocita fagocitózist gátló hatásának mértéke**

<b>alifás alkohol</b>	<b>legkisebb hatásos koncentráció [mM]</b>	<b>fagocitózis gátlásának mértéke a legkisebb hatásos koncentráció esetében [%]</b>
<b>alifás alkohol keverék</b>	0,05*	6,7
<b>etanol</b>	0,5	7,1
<b>2-propanol</b>	0,05	10,1
<b>metanol</b>	0,05	10,7
<b>1-butanol</b>	0,05	12,5
<b>1-propanol</b>	0,5	16,2
<b>izoamil alkohol</b>	0,5	17,5
<b>2-butanol</b>	0,05	17,5
<b>izo-butanol</b>	0,5	21,2

\* az egyes alkoholok végkoncentrációja az inkubációs elegyben

## **Az alifás alkoholok keverékének és az etanol együttes hatása a granulociták fagocitózisára**

A 4. számú táblázatban az etanol, az etanol és alifás alkoholok keverékének granulociták fagocitózisára gyakorolt hatása látható. A fagocita aktivitás csökkenésének mértéke százalékban van kifejezve a kezeletlen sejtekhez viszonyítva. A táblázatban szereplő adatok összehasonlításával megállapítható, hogy a granulociták fagocita funkcióját az etanol és alifás alkoholok keverékének együttes alkalmazása tovább csökkentette a csak etanollal kezelt sejtekhez viszonyítva.

### **4. táblázat**

**A fagocitózis gátlásának mértéke etanollal, etanollal és egyidejűleg alifás alkoholok keverékével kezelt granulociták esetében**

<b>kezelés</b>	<b>legkisebb hatásos koncentráció [mM]</b>	<b>fagocitózis gátlásának mértéke [%]</b>
<b>10 mM EtOH</b>	-	19,7
<b>alifás alkohol keverék + 10 mM EtOH</b>	0,05*	26,6

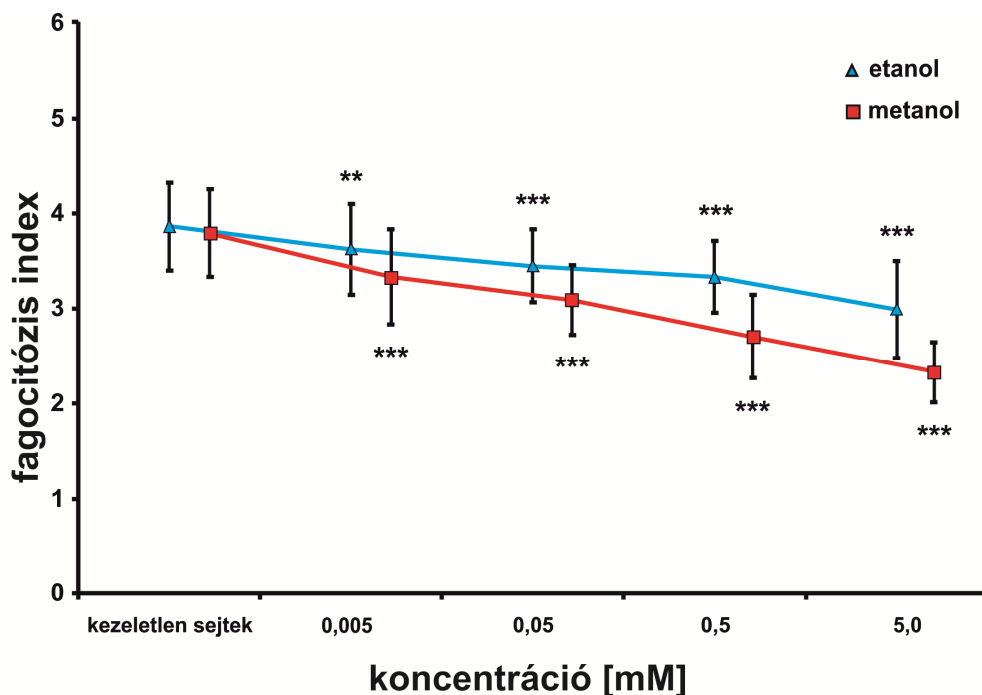
\* az egyes alkoholok végkoncentrációja az inkubációs elegyben (kivéve etanol)

### 5.3. Az alifás alkoholok hatása monociták fagocitózisára

A 19. ábrán az etanol és a metanol monociták fagocitózisára gyakorolt hatása látható. Etanollal történt inkubálás esetén 0,005 mM-os (FI:  $3,62 \pm 0,48$ ), 0,05 mM-os (FI:  $3,44 \pm 0,38$ ), 0,5 mM-os (FI:  $3,33 \pm 0,37$ ) és 5 mM (FI:  $2,99 \pm 0,51$ ) koncentrációknál figyeltünk meg szignifikáns csökkenést a fagocitózis indexben a kezeltlen monocitákhoz (FI:  $3,86 \pm 0,46$ ) viszonyítva. Metanol jelenlétében szintén szignifikánsan csökkent a monociták fagocita aktivitása a kontroll sejtekhez képest (FI:  $3,79 \pm 0,46$ ) a következő koncentrációknál: 0,005 mM (FI:  $3,33 \pm 0,50$ ); 0,05 mM (FI:  $3,09 \pm 0,37$ ); 0,5 mM (FI:  $2,71 \pm 0,44$ ); 5 mM (FI:  $2,33 \pm 0,32$ ).

19. ábra

#### Az etanol és a metanol hatása a monociták fagocitózisára

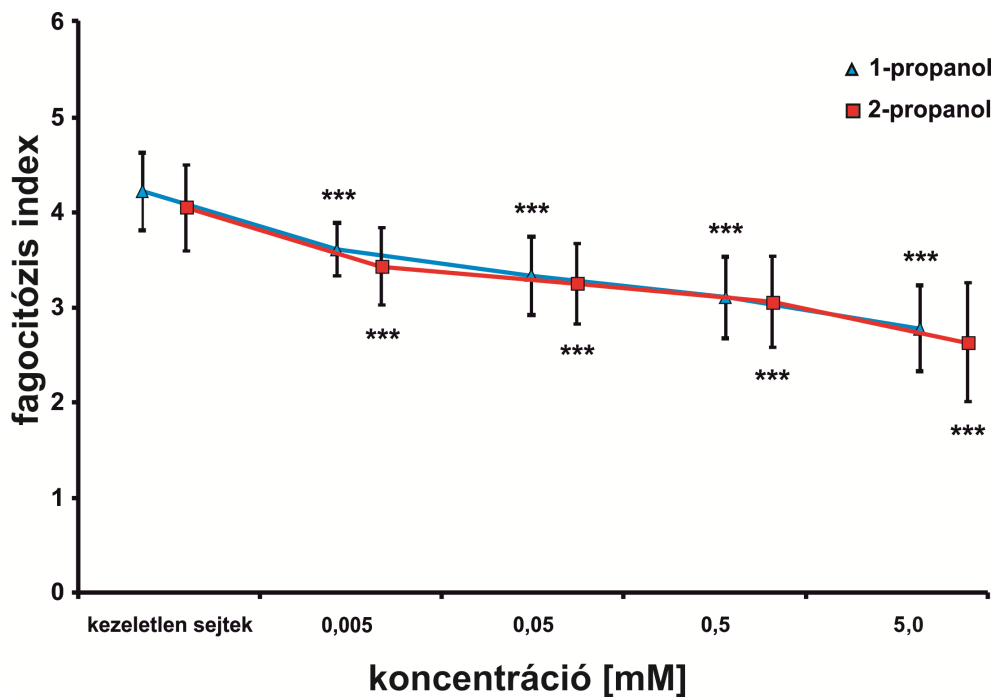


A mononukleáris sejteket egészséges donorok vénás véréből szeparáltuk Ficoll sűrűség gradiensen történő centrifugálással. A monocitákat sejtenyészítő kamrákba szelektíven kikapasztottuk, ezt követően a sejteket FITC-OZ ( $1 \times 10^7$ /ml) részecskéket és etanolt, vagy metanolt tartalmazó Hanks' oldatban inkubáltuk 1 órán keresztül 37 °C-on. A kezelést követően az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint meghatároztuk a kezeltlen és a kezelt sejtek fagocitózisát. Az ábrán hat független mérés átlagából számított átlagértékek és a szórások (SD±) láthatóak. \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001

A 20. ábra mutatja az 1-propanol és a 2-propanol hatását a monociták fagocitózisára. Az 1-propanol [kontroll (FI:  $4,15 \pm 0,41$ ), 0,005 mM (FI:  $3,55 \pm 0,28$ ), 0,05 mM (FI:  $3,28 \pm 0,41$ ), 0,5 mM (FI:  $3,05 \pm 0,42$ ), 5 mM (FI:  $2,72 \pm 0,45$ )], illetve a 2-propanol [kontroll (FI:  $3,98 \pm 0,45$ ), 0,005 mM (FI:  $3,37 \pm 0,39$ ), 0,05 mM (FI:  $3,28 \pm 0,41$ ), 0,5 mM (FI:  $3,05 \pm 0,47$ ), 5 mM (FI:  $2,72 \pm 0,62$ )] szignifikánsan gátolta a sejtek fagocita aktivitását.

20. ábra

Az 1-propanol és a 2-propanol hatása a monociták fagocitózisára

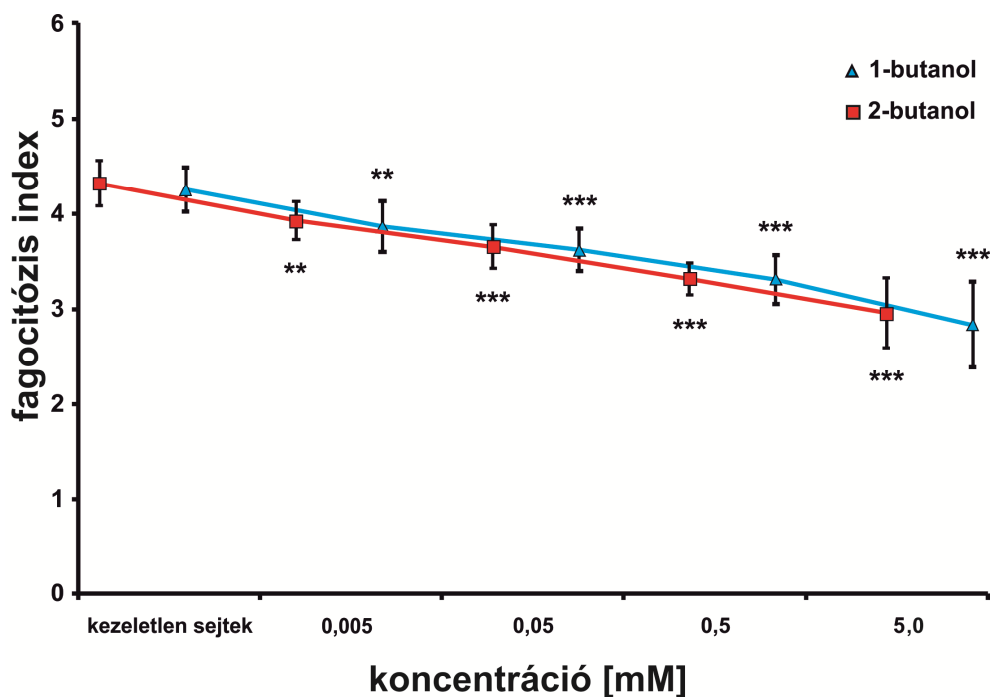


A mononukleáris sejteket egészséges donorok vénás véréből szeparáltuk Ficoll sűrűség gradiensen történő centrifugálással. A monocitákat sejtenyésző kamrákba szelektíven kitapasztottuk, ezt követően a sejteket FITC-OZ ( $1 \times 10^7$ /ml) részecskéket és 1-propanolt, vagy 2-propanolt tartalmazó Hanks' oldatban inkubáltuk 1 órán keresztül 37 °C-on. A kezelést követően az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint meghatároztuk a kezeletlen és a kezelt sejtek fagocitózisát. Az ábrán hat független mérés átlagából számított átlagértékek és a szórások (SD±) láthatóak. \*\*\*p < 0,001

Az 1-butanol és a 2-butanol hatása a monociták fagocitózisára a 21. ábrán látható. A kezeletlen sejtekhez (FI:  $4,24 \pm 0,23$ ) viszonyítva 1-butanol [0,005 mM (FI:  $3,86 \pm 0,26$ ), 0,05 mM (FI:  $3,61 \pm 0,22$ ), 0,5 mM (FI:  $3,31 \pm 0,25$ ), 5 mM (FI:  $2,84 \pm 0,45$ )], valamint 2-butanol jelenlétében [0,005 mM (FI:  $3,86 \pm 0,19$ ), 0,05 mM (FI:  $3,59 \pm 0,23$ ), 0,5 mM (FI:  $3,26 \pm 0,17$ ), 5 mM (FI:  $2,90 \pm 0,36$ )] a monociták szignifikánsan kevesebb FITC-OZ részecskét kebeleztek be.

21. ábra

Az 1-butanol és a 2-butanol hatása a monociták fagocitózisára

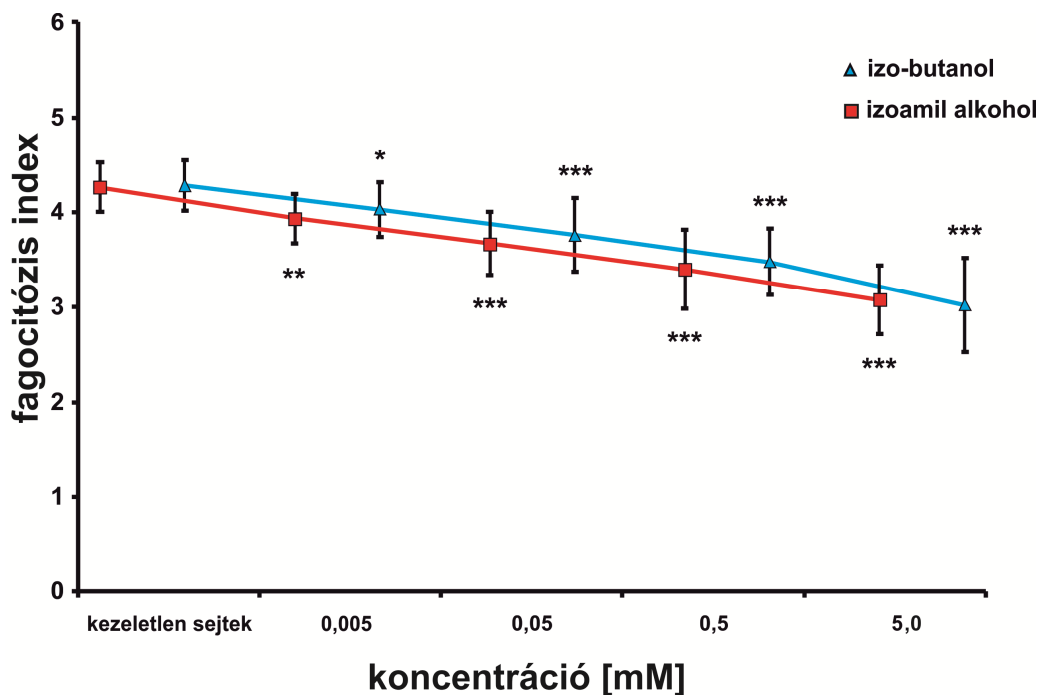


A mononukleáris sejteket egészséges donorok vénás véréből szeparáltuk Ficoll sűrűség gradiensen történő centrifugálással. A monocitákat sejtenyészítő kamrákba szelektíven kikapasztottuk, ezt követően a sejteket FITC-OZ ( $1 \times 10^7$ /ml) részecskéket és 1-butanolt, vagy 2-butanolt tartalmazó Hanks' oldatban inkubáltuk 1 órán keresztül  $37^\circ\text{C}$ -on. A kezelést követően az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint meghatároztuk a kezeletlen és a kezelt sejtek fagocitózisát. Az ábrán hat független mérés átlagából számított átlagértékek és a szórások (SD $\pm$ ) láthatóak. \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001

A 22. ábra az izo-butanol és az izoamil alkohol monociták fagocitózisára gyakorolt hatását mutatja. Az izo-butanollal történt kezelést követően szignifikánsan csökkent a sejtek fagocita funkciója [kontroll (FI:  $4,27 \pm 0,27$ ), 0,005 mM (FI:  $4,02 \pm 0,29$ ), 0,05 mM (FI:  $3,75 \pm 0,39$ ), 0,5 mM (FI:  $3,47 \pm 0,35$ ), 5 mM (FI:  $3,02 \pm 0,49$ )], továbbá az izoamil alkohol koncentrációtól függő módon gátolta a monociták fagocitózisát [kontroll (FI:  $4,34 \pm 0,26$ ), 0,005 mM (FI:  $4,01 \pm 0,27$ ), 0,05 mM (FI:  $3,74 \pm 0,34$ ), 0,5 mM (FI:  $3,46 \pm 0,42$ ), 5 mM (FI:  $3,13 \pm 0,37$ )].

22. ábra

Az izo-butanol és az izoamil alkohol hatása a monociták fagocitózisára

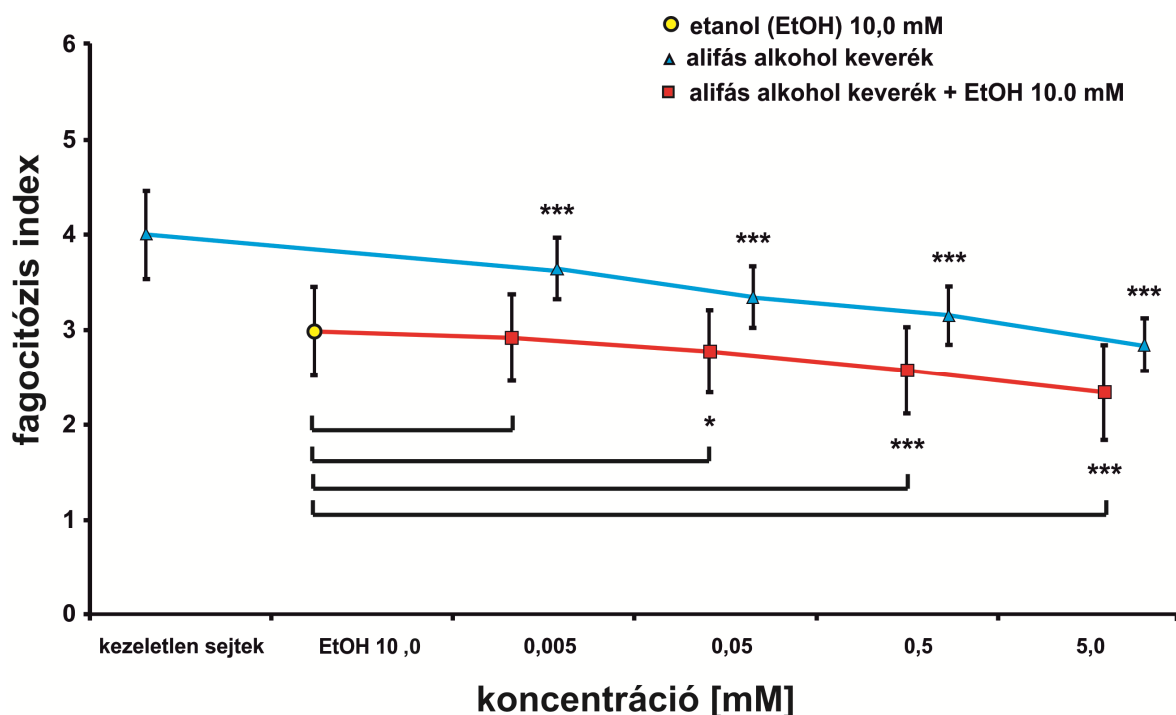


A mononukleáris sejteket egészséges donorok vénás véréből szeparáltuk Ficoll sűrűség gradiensen történő centrifugálással. A monocitákat sejtenyésző kamrákba szelektíven kikapasztottuk, ezt követően a sejteket FITC-OZ ( $1 \times 10^7$ /ml) részecskéket és izo-butanolt, vagy izoamil alkoholt tartalmazó Hanks' oldatban inkubáltuk 1 órán keresztül 37 °C-on. A kezelést követően az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint meghatároztuk a kezeletlen és a kezelt sejtek fagocitózisát. Az ábrán hat független mérés átlagából számított átlagértékek és a szórások (SD±) láthatóak. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001

A 23. ábra mutatja az alifás alkoholok keverékének hatását a monociták fagocitózisára etanol nélkül, illetve etanollal együtt. Csak alifás alkoholok elegyének jelenlétében a monociták fagocitózis indexe [0,005 mM (FI: 3,57 ± 0,31), 0,05 mM (FI: 3,28 ± 0,31), 0,5 mM (FI: 3,09 ± 0,30), 5 mM (FI: 2,79 ± 0,26)] szignifikánsan kisebb volt a kezeletlen sejtekhez (FI: 3,92 ± 0,46) viszonyítva. Összehasonlítva a kizárólag 10 mM etanollal (FI: 2,88 ± 0,45) inkubált sejtekkel, az etanollal és egyidejűleg alifás alkoholok keverékével kezelt monociták fagocitózisának mértéke [0,005 mM (FI: 2,81 ± 0,44), 0,05 mM (FI: 2,67 ± 0,42), 0,5 mM (FI: 2,48 ± 0,44), 5 mM (FI: 2,26 ± 0,48)] szignifikánsan tovább csökkent. Ebben az esetben a kezeletlen sejtek fagocitózis indexe: 3,88 ± 0,36 volt.

### 23. ábra

**Az alifás alkoholok keverékének, valamint az etanol és az alifás alkoholok keverékének együttes hatása a monociták fagocitózisára**



A mononukleáris sejteket egészséges donorok vénás véréből szeparáltuk Ficoll sűrűség gradiensen történő centrifugálással. A monocitákat sejtenyésző kamrákba szelektíven kitapasztottuk, ezt követően a sejteket FITC-OZ ( $1 \times 10^7$ /ml) részecskéket és alifás alkoholok keverékével, vagy egyidejűleg 10 mM etanolt és alifás alkoholok elegyét tartalmazó Hanks' oldatban inkubáltuk 1 órán keresztül 37 °C-on. A kezelést követően az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint meghatároztuk a kezeletlen és a kezelt sejtek fagocitózisát. Az ábrán hat független mérés átlagából számított átlagértékek és a szórások (SD±) láthatóak. \*p < 0,05; \*\*\*p < 0,001

### **Az alifás alkoholok monocita fagocitózist gátló hatásának mértéke**

A 5. számú táblázatban az etanol, az egyes alifás alkoholok, valamint azok keverékének monociták fagocitózist gátló legkisebb hatásos koncentrációi, valamint a fagocita aktivitás csökkenésének mértéke látható százalékban kifejezve. A táblázatban szereplő adatok összehasonlításával megállapítható, hogy a monociták fagocita funkciójára az egyes alifás alkoholok közül a legkisebb gátlóhatást az izo-butanol, míg a legnagyobbat a 2-propanol fejtette ki.

#### **5. táblázat**

**Az alifás alkoholok monocita fagocitózist gátló hatásának mértéke a kezeletlen sejtekhez viszonyítva**

<b>alifás alkohol</b>	<b>legkisebb hatásos koncentráció [mM]</b>	<b>fagocitózis gátlásának mértéke a legkisebb hatásos koncentráció esetében [%]</b>
<b>izo-butanol</b>	0,005	5,8
<b>etanol</b>	0,005	6,2
<b>izoamil alkohol</b>	0,005	7,6
<b>2-butanol</b>	0,005	8,9
<b>1-butanol</b>	0,005	8,9
<b>alifás alkohol keverék</b>	0,005*	8,9
<b>metanol</b>	0,005	12,1
<b>1-propanol</b>	0,005	14,4
<b>2-propanol</b>	0,005	15,3

\* az egyes alkoholok végkoncentrációja az inkubációs elegyben

## **Az alifás alkoholok keverékének és az etanol együttes hatása a monociták fagocitózisára**

A 6. számú táblázatban az etanol, az etanol és alifás alkoholok keverékének monociták fagocitózisára gyakorolt hatása látható. A fagocita aktivitás csökkenésének mértéke százalékban van kifejezve a kezeletlen sejtekhez viszonyítva. A táblázatban szereplő adatok összehasonlításával megállapítható, hogy a monociták fagocita funkcióját az etanol és alifás alkoholok keverékének együttes alkalmazása tovább csökkentette a csak etanollal kezelt sejtekhez viszonyítva.

### **6. táblázat**

**A fagocitózis gátlásának mértéke etanollal, etanollal és egyidejűleg alifás alkoholok keverékével kezelt monociták esetében**

<b>kezelés</b>	<b>legkisebb hatásos koncentráció [mM]</b>	<b>fagocitózis gátlásának mértéke [%]</b>
<b>10 mM EtOH</b>	-	25,8
<b>alifás alkohol keverék + 10 mM EtOH</b>	0,05*	31,2

\* az egyes alkoholok végkoncentrációja az inkubációs elegyben (kivéve etanol)

## 6. MEGBESZÉLÉS

Bár régóta ismert, hogy az alkoholos italokat rendszeresen és nagy mennyiségben fogyasztóknál csökkent a fertőzésekkel szembeni ellenálló képesség, az ennek háttérében álló kóroki tényezők vizsgálata csak az utóbbi évtizedekben került előtérbe (26-29, 55, 56). Az eddig elvégzett kutatások igazolták az etanolnak, mint az alkoholos italok fő alkotóelemének a kitüntetett szerepét mind a természetes, mind pedig az adaptív immunrendszer károsításában (26-29). Azonban laboratóriumi vizsgálatok kimutatták, hogy akár a legális kereskedelmi forgalomban kapható alkoholos italok is, de különösen az illegális forrásokból származó tömény szeszesitalok az etanol mellett számos olyan szennyező anyagot tartalmazhatnak, melyek befolyásolhatják az immunrendszer működését (4, 9-14). Gázkromatográfias analízisek szerint kiemelt jelentőséggel bírnak az illegális eredetű tömény szeszesitalokban és házi főzésű pálinkákban jelenlévő metanol, valamint a kettőnél több szénatommal rendelkező alifás alkoholok (4, 57, 58). Ezek az etanol mellett hatást gyakorolhatnak az immunrendszer működésére. Igazolták már többek között a metanol és az izo-propanol limfocita és monocita funkciókat károsan befolyásoló, illetve az 1-butanol és az izoamil alkohol granulociták  $O_2^-$  termelését gátló hatását (44, 59, 60). Az azonban még kevésbé ismert, hogy a házi főzésű pálinkákban kimutatható alifás alkoholok az immunrendszer sejtjeiben milyen egyéb funkcionális károsodásokat okozhatnak. Ezek vizsgálata népegészségügyi szempontból is fontos, ha figyelembe vesszük azt a tényt, hogy a lakosság alifás alkoholexpozíciójának egyik legjelentősebb forrása az illegális eredetű tömény szeszesitalok fogyasztása, mely világszerte, de különösen Közép- és Kelet-Európa országaiban jelentős mértékű (3, 4, 57, 58). 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 szeszesitalokban található alifás alkoholok koncentrációtól függő módon szignifikánsan csökkentették a granulociták FMLP-indukálta  $O_2^-$  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  $O_2^{\cdot-}$  termelésében. 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  $O_2^{\cdot-}$  termelésben 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 (lásd 4-es és 6-os számú táblázatok).

Ennek alapján megválaszolendő 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 (61). A formula tartalmazza az elfogyasztott alkohol mennyiségét grammban ( $A$ ), a véralkohol koncentrációt ezrelékben ( $c$ ), a testtömeget kilogrammban ( $p$ ) kifejezve, valamint az úgynevezett Widmark állandót ( $r$ ), mely figyelembe veszi az alkohol megoszlását a vér és az emberi test szervei, illetve szövetei között (61). A konstans értéke egy átlagos, 70 kg testtömegű felnőtt férfi esetében 0,7 (61). Ezek szerint az elfogyasztott alkohol mennyisége egyenlő a véralkohol koncentráció, a testtömeg és a Widmark állandó szorzatával:  $A = cpr$  (61). Az elfogyasztandó házi főzésű tömény szeszital térfogatának meghatározásához a toxikológiai számítások során a férfiakra általánosan elfogadott 70 kilogrammos testtömeget alkalmaztuk (62). A képletbe behelyettesítve az alifás alkoholok granulociták és monociták fagocitózisát gátló legkisebb hatásos koncentrációit (granulocitáknál: 0,05 mM, monocitáknál: 0,005 mM) g/literben kifejezve, először kiszámítottuk az elfogyasztandó alkohol mennyiségét ( $A$ ), majd ennek ismeretében, figyelembe véve 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) meghatároztuk a legkisebb hatásos plazmakoncentrációk eléréséhez elfogyasztandó 40 % etanolt tartalmazó házi főzésű pálinka térfogatát (4, 61). Kalkulációink eredményeit mutatja a 7. számú táblázat, melyben látható, hogy a fagocitózist gátló legkisebb hatásos plazmakoncentráció eléréséhez elfogyasztandó 40 %-os házi készítésű pálinka térfogata alifás alkoholonként különböző, granulocitáknál 35,0-1225,0 ml, míg monocitáknál 3,5-400,0 ml között változik. (A granulocitáknál az 1-propanol, az izo-butanol és az izoamil alkohol esetében nincs realitása akkora mennyiségű házi főzésű pálinka elfogyasztásának, amely szükséges lenne a fagocitózis gátlásához. Ahhoz ugyanis már 2000,0 ml-nél is több házi készítésű tömény szeszestalt kellene meginni.)

### 7. táblázat

**Biológiailag releváns plazmakoncentrációk eléréséhez elfogyasztandó 40 %-os házi pálinka térfogata**

<b>alifás alkohol</b>	<b>granulociták fagocitózist gátló legkisebb (0,05 mM) hatásos plazmakoncentráció eléréséhez elfogyasztandó 40%-os házi pálinka térfogata</b>	<b>monociták fagocitózist gátló legkisebb (0,005 mM) hatásos plazmakoncentráció eléréséhez elfogyasztandó 40%-os házi pálinka térfogata</b>
<b>metanol</b>	35,0 ml	3,5 ml
<b>1-propanol</b>	-	23,3 ml
<b>1-butanol</b>	1225,0 ml	122,5 ml
<b>2-butanol</b>	490,0 ml	49,0 ml
<b>izo-butanol</b>	-	400,0 ml
<b>izoamil alkohol</b>	-	16,3 ml

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 (63-66). 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 (63). 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 (lásd 3-as és 5-ös számú táblázatok). 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 szintet is elért (65).

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 (3, 4). 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 (3). (Ez a mennyiség 190 ml 40% etanolt tartalmazó tömény szeszesitalban van.) Epidemiológiai vizsgálatok szerint a közép- és kelet európai államokban (Csehország, Észtország, Litvánia, Szlovákia, Magyarország, Ukrajna, és Oroszország) ezeknek a személyeknek az aránya átlagosan a teljes lakosság 22,4 %-a, vagyis 48,3 millió fő volt 2012-ben (3, 67, 68). A másik rizikócsoportot azok a 18-29 éves fiatalok alkotják, akiknek körében az utóbbi évtizedekben kialakult az úgynevezett „rohamivás” (az angol nyelvű szakirodalomban „binge drinking”) szokása (69, 70). 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 (69). Mivel a házi készítésű tömény szeszesitalok olcsóbbak, mint a legális

kereskedelemben kaphatók, feltételezhető, hogy a közép- és kelet-európai országok nagyívói, alkoholistái, valamint „rohamivó” fiataljai ezeket olyan mennyiségben fogyasztják, hogy a szervezetükben az alifás alkoholok vérplazma koncentrációja eléri azt az értéket, mely biológiailag releváns granulociták és monociták fagocitózisának csökkentéséhez vezet. Ezért az említett társadalmi csoportok fokozott rizikóval rendelkeznek, és az illegálisan előállított tömény szeszesitalok alifás alkoholjai 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.

Eredményeink összhangban az etanollal és az 1-butanollal végzett kísérletek során kapott adatokkal arra utalnak, hogy az illegális forrásból származó tömény szeszesitalokban lévő alifás alkoholok nem a  $O_2^{\cdot-}$  képződését katalizáló NADPH-oxidáz enzimet gátolták, hanem az annak aktivációjához vezető, formil-peptid receptorok (FPR-k) által közvetített intracelluláris jelátviteli folyamatokat befolyásolták (40, 71-73). Az általunk stimulálószerként használt FMLP a granulociták sejtfelületén lévő, a G proteinek által kapcsolt receptorok családjába tartozó FPR-hoz kötődik. Normál körülmények között a receptor-ligandum kölcsönhatást követően a membránban található foszfolipáz-D (PLD) enzim katalizálja a foszfatidil-kolin hidrolízisét foszfatidil savvá (PA) (40, 71-73). A keletkezett PA-ból a foszfatil-sav-foszfohidroláz enzim közreműködésével keletkezik a diacil-glicerol (DAG), mely az egyik legfontosabb másodlagos hírvivő molekula (40, 71-73). A DAG aktiválja a citoszolban lévő protein kináz C (PKC) enzimet, és ennek következtében az transzlokálódik a PMNL-k membránjára (40, 71-73). Ezt követően a PKC részt vesz a NADPH-oxidáz enzim membránban és citoszolban elhelyezkedő alegységeinek foszforilációjában, ezáltal a  $O_2^{\cdot-}$  produkciójához szükséges aktív enzim-komplex létrehozásában (36). Etanol vagy 1-butanol jelenlétében azonban a PLD a PA keletkezésének rovására foszfatidil-etanol, illetve foszfatidil-butanol képződését is katalizálja (40, 71-73). Ez a PKC-t aktiváló DAG molekula mennyiségének csökkentéséhez vezet, mivel a PA a DAG prekursora. (40, 71-73). DAG hiányában a PKC nem válik működőképessé, így nem foszforilálja a  $O_2^{\cdot-}$  generációjáért felelős NADPH-oxidáz enzimet (40). Feltételezzük, hogy hasonló biokémiai mechanizmus szerint gátolják a házi főzésű pálinkákban lévő alifás alkoholok a granulociták FMLP-indukálta  $O_2^{\cdot-}$  termelését. Ezzel szemben az általunk alkalmazott másik stimulálószer, a PDBu képes helyettesíteni a DAG-t, így közvetlenül aktiválja a NADPH-oxidáz enzim alegységeinek foszforilációját katalizáló PKC-t. Ezzel

magyarázható, hogy a vizsgált alifás alkoholok nem gátolták a neutrofilek PDBu-indukálta  $O_2^{\cdot -}$  produkcióját.

A fagocitózis gátlásának mechanizmusa még nem teljesen ismert. Feltételezések szerint az etanol kedvezőtlenül befolyásolja a fagoszóma képződést (74). A granulociták és monociták sejtmembránján számos olyan receptor található, melyek meghatározó szerepet játszanak a fagocitózisban [Toll-like-, Fc gamma receptorok (FcγR)] (37, 75-77). A kísérleteink során alkalmazott humán AB szérummal opsonizált részecskék fagocitózisa az FcγR-kon keresztül zajlik (78). Az FcγR-ok nagyobb sűrűségben helyezkednek el a sejtek kettős lipid rétegében található, úgynevezett „membrán lipidutajokban” (MLT), melyek a környezetüktől eltérő, koleszterinben és szfingolipidekben gazdagabb membránrégiók (79). Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a MLT-k kiemelt szerepet játszanak a receptor-ligand komplexek létrejöttében és az azt követő sejt aktivációs folyamatokban (80). Az FcγR-ok az opsonizált partikulumok kötődését követően foszforilálódnak, majd indukálják az aktin polimerizációt, a citoskeleton átrendeződését, valamint a fagoszóma képződést (81). Korábbi vizsgálatok bizonyították, hogy az etanol beépülve a sejtek kettős lipid rétegébe károsítja a MLT-k szerkezetét (82). Ezek alapján feltételezhető, hogy az etanol fagocitózist gátló hatását a sejtmembránban található MLT-receptor komplexek struktúrájának károsításán keresztül fejt ki (83). 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.

Eredményeinket összegezve megállapíthatjuk, hogy:

1. Az illegálisan előállított tömény szeszitalokban előforduló alifás alkoholok koncentrációtól függő módon gátolják a granulociták FMLP-indukálta szuperoxid-anion produkcióját, valamint a PMNL-k és monociták fagocitózist, illetve etanollal kombinált expozíció esetén feltételezhetően szinergista módon hatnak (84, 85).
2. Eredményeink alapján lehetséges, hogy szervezetbe jutó alifás alkoholok önmagukban és az etanollal együttesen biológiailag releváns koncentrációban gátolják a granulociták és monociták fagocitózist (85, 86).
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 (85, 86).

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

A krónikus májbetegségek és a májzsugor, az alkoholfogyasztással kapcsolatos sérülések és balesetek, valamint az immunszuppresszió mellett, az illegális szeszitalok fogyasztása hozzájárulhat az egészségügyi kiadások növekedéséhez (87). Ezért az ellenőrizetlen forrásokból származó alkoholok fogyasztásának gazdasági hatásait is figyelembe kellene venniük az egészségügyi szakembereknek és politikai döntéshozóknak. Számukra vizsgálataink lényeges információkat szolgáltathatnak annak mérlegeléséhez, hogy a házi főzésű pálinkákban lévő alifás alkoholok *in vivo* körülmények között szintén befolyásolhatják-e a mononukleáris és polimorfonukleáris fagocita sejtek alapvető funkcióit, illetve annak megfontolásához, hogy tartós és nagy mennyiségű fogyasztás esetén ezen alkoholok mekkora kockázatot jelenthetnek a fertőző betegségek iránti fokozott érzékenység kialakulására. Ennek következtében kutatásunk alapul szolgálhat a döntéshozóknak hatékony preventív intézkedések kidolgozásához, mely által az említett egészségkárosodások megelőzhetők, ily módon az egészségügyi költségek csökkenthetők lennének Közép- és Kelet-Európa országaiban.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

Népegészségügyi szempontból az ellenőrizetlen körülmények között előállított tömény szeszitalok megkülönböztetett figyelmet érdemelnek, mivel az etanol mellett metanolt, és nagyobb szénatom számú alifás alkoholokat, így 1- és 2-propanolt, 1- és 2-butanolt, izo-butanolt, valamint izoamil alkoholt is tartalmazhatnak. Korábbi tanulmányok igazolták, hogy az akut és a krónikus alkoholmérgezés immunszuppresszióhoz vezet. Ezért alkoholfüggőségben szenvedők fokozottan érzékenyek a fertőző betegségekre. A patogén mikroorganizmusok okozta megbetegedésekre való fogékonyság kialakulásában fontos szerepet játszhat a granulociták, vagy más néven polimorfonukleáris leukociták (PMNL-k) és monociták funkcionális károsodása is. Előzetes vizsgálatok ugyanis kimutatták, hogy az etanol gátolja a granulociták szuperoxid-anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) termelését, valamint a PMNL-k és a monociták fagocitózist. A fagocita sejtek funkcionális állapotát azonban önmagukban és az etanollal együttesen hatva szintén befolyásolhatják az alifás alkoholok. Ezért célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy befolyásolják-e az alifás alkoholok a granulociták  $O_2^{\cdot-}$  termelését, valamint a PMNL-k és monociták fagocitózist. Az alifás alkoholok granulociták  $O_2^{\cdot-}$  termelésére kifejtett hatásának vizsgálata során a sejteket humán „buffy coat” preparátumokból szeparáltuk centrifugációs elutriációs módszerrel, majd a PMNL-kat különböző koncentrációban alifás alkoholokkal kezeltük, és ezután spektrofotometriásan mértük a sejtek forbol-dibutiráttal és N-formil-metionil-leucilfenilalaninnal (FMLP) stimulált  $O_2^{\cdot-}$  produkcióját. A fagocita funkciók vizsgálatához a PMNL-kat és mononukleáris sejteket egészséges donorok véréből izoláltuk, majd a granulocitákat és monocitákat sejtenyésző kamrákban kitapasztottuk. Ezt követően a sejteket opszonizált, fluoreszcein izotiocianáttal jelölt zimosán-A részecskékkel, és különböző koncentrációban alifás alkoholokkal inkubáltuk. A minták kiértékelését fluoreszcens mikroszkóp segítségével végeztük, melynek során megszámláltuk a sejtek által bekebelezett részecskéket. Az eredmények összehasonlítására ismételt mérésű variancia-analízist alkalmaztunk. Vizsgálataink szerint az illegális eredetű tömény szeszitalokban található alifás alkoholok koncentrációtól függő módon szignifikánsan csökkentették a granulociták FMLP-indukálta  $O_2^{\cdot-}$  termelését, valamint biológiailag releváns koncentrációban a granulociták és a monociták fagocitózist. Ezért az illegális eredetű tömény szeszitalokkal és házi főzésű pálinkákkal a szervezetbe jutó alifás alkoholok gátolhatják a granulociták és monociták fagocitózist, így nagyivóknál és alkoholistáknál hozzájárulhatnak az etanol által indukált immunszuppresszióhoz, ezáltal körükben fokozhatják a fertőző betegségek iránti érzékenységet.

## 9. SUMMARY

Unrecorded spirits have begun to attract attention from public health researchers concerned about their potentially adverse health effects. Previous studies have demonstrated that illegally produced spirits often contain methanol and other aliphatic alcohols containing more than two carbon atoms, such as 1- and 2-propanol, 1- and 2-butanol, isobutanol, and isoamyl alcohol. Clinical and laboratory studies have confirmed that acute and chronic alcohol consumption can lead to immunosuppression. As a consequence, alcohol abuse has been associated with higher incidence of a number of infectious diseases. Ethanol-induced decrease in granulocyte, also called polymorphonuclear leukocytes (PMNLs), and monocyte functions may be involved in increased susceptibility of alcoholics to infectious diseases. It is known from in vitro studies that ethanol can inhibit granulocyte superoxide-anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) generation and phagocytosis by PMNLs and monocytes. However, it is possible that exposure to the other aliphatic alcohols could also influence these cell functions. To investigate this possibility, we examined the  $O_2^{\cdot-}$  production by PMNLs and the phagocytosis of granulocytes and monocytes following treatment of the cells with aliphatic alcohols. To measure the effects of aliphatic alcohols on  $O_2^{\cdot-}$  production, granulocytes were isolated from human buffy coat preparations with countercurrent centrifugal elutriation and then incubated with aliphatic alcohols. Subsequently  $O_2^{\cdot-}$  production was stimulated with phorbol-12,13-dibutyrate and N-formyl-methionyl-leucil-phenylalanine (FMLP) and measured by superoxide dismutase inhibitable reduction of ferricytochrome c. To investigate the influence of aliphatic alcohols on phagocytosis by PMNLs and monocytes, peripheral blood was obtained from healthy volunteers. Then mononuclear cells and granulocytes were separated by centrifugation on Ficoll density gradient. The cells were placed into chamber slides to allow them to adhere. The adherent cells were incubated with fluorescein isothiocyanate labelled opsonized zymosan particles and aliphatic alcohols. Subsequently the number of ingested zymosan particles was counted using a fluorescent microscope. The results obtained were compared by repeated measures analysis of variance. Our results have demonstrated that aliphatic alcohols could suppress the FMLP-induced  $O_2^{\cdot-}$  generation by human PMNLs, the phagocytosis by human granulocytes and monocytes in a concentration dependent manner. Thus it is possible that, in combination with ethanol, these substances may inhibit phagocytosis at concentrations observed in episodic heavy drinkers and alcohol abusers thereby, contribute to their increased susceptibility to infectious diseases.

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

1. The Social Issues Research Centre (SIRC), Social and Cultural Aspects of Drinking: A report to the European Commission. Oxford 1998.
2. Kertai P.: Az alkohol- és kábítószer-fogyasztás hatása az egészségre. In Kertai P.: Megelőző Orvostan. Medicina Kiadó, Budapest 1999.
3. World Health Organization (WHO), Global Status Report on Alcohol and health. Geneva 2011.
4. Szűcs S., Sárváry A., McKee M., Ádány R.: Could the high level of cirrhosis in central and eastern Europe be due partly to the quality of alcohol consumed? An exploratory investigation. *Addiction*, 100., 536–542, 2005.
5. Nemtsov A.V.: Estimates of total alcohol consumption in Russia, 1980-1994. *Drug Alcohol Depend.*, 58., 133–142, 2000.
6. Pacula R. L.: Substance use and recessions: what can be learned from economic analyses of alcohol? *Int. J. Drug Policy*, 22., 326-334, 2011.
7. A jövedéki adóról és a jövedéki termékek forgalmazásának különös szabályairól szóló 2003. évi CXXVII. törvény módosítása. *Magyar Közlöny*; 132., 22478-22481, 2010.
8. Nemzeti Adó- és Vámhivatal (NAV), NAV évkönyv 2012. Budapest 2013.
9. Rehm J., Kanteres F., Lachenmeier D. W.: Unrecorded consumption, quality of alcohol and health consequences. *Drug Alcohol Rev*, 29: 426-436, 2010.
10. Morgan B. W., Parramore C. S., Ethridge M.: Lead contaminated moonshine: a report of Bureau of Alcohol, Tobacco and Firearms analyzed samples. *Vet. Hum. Toxicol.*, 46., 89–90, 2004.
11. Lachenmeier D. W., Rehm J., Gmel G.: Surrogate alcohol: what do we know and where do we go? *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 31., 1613–1624, 2007.
12. Lachenmeier D.W., Sohnius E.M.: The role of acetaldehyde outside ethanol metabolism in the carcinogenicity of alcoholic beverages: evidence from a large chemical survey. *Food Chem. Toxicol.*, 46., 2903–2911, 2008.

13. Lachenmeier D. W., Kanteres F., Rehm J.: Carcinogenicity of acetaldehyde in alcoholic beverages: risk assessment outside ethanol metabolism. *Addiction*, 104., 533–550, 2009.
14. Lachenmeier D. W., Sarsh B., Rehm J.: The composition of alcohol products from markets in Lithuania and Hungary, and potential health consequences: a pilot study. *Alcohol Alcohol.*, 44., 93-102, 2009.
15. International Agency for Research on Cancer.: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 2009. <http://monographs.iarc.fr>, utolsó megtekintés dátuma: 2013. november 18.
16. Zimmerli B., Schlatter J.: Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. *Mutat. Res.*, 259., 325-350, 1991.
17. Millán C., Mauricio J. C., Ortega J.M.: Alcohol and aldehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*: specific activity and influence on the production of acetic acid, ethanol and higher alcohols in the first 48 h of fermentation of grape must. *Microbios.*, 64., 93-101, 1990.
18. Strubelt O., Deters M., Pentz R., Siegers C.P., Younes M.: The toxic and metabolic effects of 23 aliphatic alcohols in the isolated perfused rat liver. *Toxicol. Sci.*, 49., 133-142, 1999.
19. Simon T.: Az alkoholfogyasztás és az alkoholizmus hatása az egészségre. In.: Ádány R. (szerk.) *Megelőző orvostan és népegészségtan*. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2012.
20. Rehm J.: The relation between different dimensions of alcohol consumption and burden of disease – an overview. *Addiction*, 105., 817-843, 2010.
21. Corrao G., Bagnardi V., Zambon A., Arico S.: Exploring the dose-response relationship between alcohol consumption and the risk of several alcohol-related conditions: a meta-analysis. *Addiction*, 94., 1551-1573, 1999.
22. International Agency for Research on Cancer (IARC): *A Review of Human Carcinogens: Personal Habits and Indoor Combustions, Volume 100E*, Lyon, 2012.

23. Baan R. on behalf of the WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group.: Carcinogenicity of alcoholic beverages. *Lancet Oncol.*, 8., 292–293, 2007.
24. Hamajima N. et al. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Alcohol, tobacco and breast cancer-collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br. J. Cancer*, 87., 1234-1245, 2002.
25. World Health Organization (WHO), European health for all mortality database (HFA-MDB). <http://data.euro.who.int/hfamdb/>, utolsó megtekintés dátuma: 2013. November 23.
26. Molina P. E., Happel K. I., Zhang P., Kolls J. K., Nelson S.: Focus On: Alcohol and the Immune System. *Alcohol Res. Health.*, 33., 97-108, 2010.
27. Nelson S., Kolls J. K.: Alcohol, host defence and society. *Nat. Rev. Immunol.*, 2., 205–209, 2002.
28. Szabo Gy.: Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol Alcohol.*, 34., 830–841, 1999.
29. Szabo G., Mandrekar P.: A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 33., 220–232, 2009.
30. Mandrekar P., Catalano D., Dolganiuc A., Kodys K., Szabo G.: Inhibition of myeloid dendritic cell accessory cell function and induction of T cell anergy by alcohol correlates with decreased IL-12 production. *J. Immunol.*, 173., 3398-33407, 2004.
31. Lopez M. C., Huang D. S., Borgs P., Wang Y., Watson R. R.: Modification of lymphocyte subsets in the intestinal-associated immune system and thymus by chronic ethanol consumption. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 18., 8-11, 1994.
32. Goral J., Karavitis J., Kovacs E. J.: Exposure-dependent effects of ethanol on the innate immune system. *Alcohol*, 42., 237-247, 2008.
33. Lau A. H., Szabo G., Thomson A. W.: Antigen-presenting cells under the influence of alcohol. *Trends Immunol.*, 1., 13-22, 2009.

34. Amulic B., Cazalet C., Hayes G. L., Metzler K. D., Zychlinsky A.: Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.*, 30., 459-489, 2012.
35. Summers C., Rankin S. M., Condliffe A. M., Singh N., Peters A. M., Chilvers E. R.: Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.*, 31., 318-324, 2010.
36. Babior B. M.: NADPH oxidase. *Curr. Opin. Immunol.*, 16., 42-47, 2004.
37. Karlmark K. R., Tacke F., Dunay I. R.: Monocytes in health and disease – Minireview. *Eur. J. Microbiol. Immunol.*, 2., 97–102, 2012.
38. Parlesak A., Diedrich J. P., Schäfer C., Bode C.: A low concentration of ethanol reduces the chemiluminescence of human granulocytes and monocytes but not the tumor necrosis factor alpha production by monocytes after endotoxin stimulation. *Infect. Immun.*, 66., 2809-2813, 1998.
39. Reinisch N., Wiedermann C. J., Ricevuti G.: Inhibition of human peripheral blood neutrophil respiratory burst by alcohol-based venipuncture site disinfection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 7., 980-982, 2000.
40. Hardy S. J., Robinson B. S., Poulos A., Harvey D. P., Ferrante A., Murray A. W.: The neutrophil respiratory burst. Responses to fatty acids, N-formylmethionylleucylphenylalanine and phorbol ester suggest divergent signalling mechanisms. *Eur. J. Biochem.*, 198., 801-806, 1991.
41. Vrsalovic M., Vrsalovic M. M., Presecki A. V., Lukac J.: Modulating role of alcohol and acetaldehyde on neutrophil and monocyte functions in vitro. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 50., 462-465, 2007.
42. Zuiable A., Wiener E., Wickramasinghe S. N.: In vitro effects of ethanol on the phagocytic and microbial killing activities of normal human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Clin. Lab. Haematol.*, 14., 137-147, 1992.
43. Jareo P. W., Preheim L. C., Gentry M. J.: Ethanol ingestion impairs neutrophil bactericidal mechanisms against *Streptococcus pneumoniae*. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 20., 1646-1652, 1996.

44. Pike M. C., Jakoi L., McPhail L. C., Snyderman R.: Chemoattractant-mediated stimulation of the respiratory burst in human polymorphonuclear leukocytes may require appearance of protein kinase activity in the cells' particulate fraction. *Blood*, 67., 909-913, 1986.
45. Berkow R. L., Dobson R. W.: Volume dependent polymorphonuclear leukocytes fractions isolated by counterflow centrifugal elutriation: PMN volume does not correlate with PMN age. *J. Leukocyte Biol.*, 6., 518-526, 1987.
46. Lampé R., Szűcs S., Ormos M., Ádány R., Póka R.: Effect of normal and preeclamptic plasma on superoxide-anion production of neutrophils from healthy non-pregnant women. *J. Reprod. Immunol.*, 79., 63-69, 2008.
47. Babior B. M., Curnutte J. T., Kipnes R. S.: Biological defense mechanisms. Evidence for the participation of superoxide in bacterial killing by xanthine oxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, 85., 235-244, 1975.
48. Pick E., Keisari Y.: Superoxide anion and hydrogen peroxide production by chemically elicited peritoneal macrophages: induction by multiple non pregnant phagocytic stimuli. *Cell Immunol.*, 59., 301-318, 1981.
49. Böyum A.: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, 97., 7, 1968.
50. English D., Andersen B. R.: Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *J. Immunol. Methods*, 5., 249-252, 1974.
51. Hed J., Hallden G., Johansson S. G., Larsson P.: The use of fluorescence quenching in flow cytometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation. *J. Immunol. Methods*, 101., 119-125, 1987.
52. Forslid J., Hed J.: In vitro effect of hydrocortisone on the attachment and ingestion phases of immunoglobulin G- and complement component 3b-mediated phagocytosis by human neutrophils. *Infect. Immun.*, 38., 811-816, 1982.

53. Szabo G., Mandrekar P.: Human monocytes, macrophages, and dendritic cells: alcohol treatment methods *Methods Mol. Biol.*, 447., 113-124, 2008.
54. Passlick B., Flieger D., Ziegler-Heitbrock H. W.: Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*, 74., 2527-2534, 1989.
55. Jerrells T. R.: Immunodeficiency associated with ethanol abuse. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 288., 229-236, 1991.
56. Szabo G.: Alcohol's contribution to compromised immunity. *Alcohol Health. Res. World*, 21., 30-41, 1997.
57. McKee M., Szűcs S., Sárváry A., Ádány R., Kiryanov N., Saburova L., Tomkins S., Andreev E., Leon D. A.: The composition of surrogate alcohols consumed in Russia. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 29., 1884–1888, 2005.
58. Lang K., Väli M., Szűcs S., Ádány R., McKee M.: The composition of surrogate and illegal alcohol products in Estonia. *Alcohol Alcohol.*, 41., 446–450, 2006.
59. Carignan D., Désy O., de Campos-Lima P. O.: The dysregulation of the monocyte/macrophage effector function induced by isopropanol is mediated by the defective activation of distinct members of the AP-1 family of transcription factors. *Toxicol. Sci.*, 125., 144-156, 2012.
60. Désy O., Carignan D., Caruso M., de Campos-Lima P. O.: Immunosuppressive effect of isopropanol: down-regulation of cytokine production results from the alteration of discrete transcriptional pathways in activated lymphocytes. *J. Immunol.*, 181., 2348-2355, 2008.
61. Gullberg R. G.: Estimating the uncertainty associated with Widmark's equation as commonly applied in forensic toxicology. *Forensic Sci. Int.*, 172., 33-39, 2007.
62. Ungváry Gy.: Kémiai kóroki tényezők okozta megbetegedések (mérgeзések) és prevenciójuk. Ungváry Gy. (szerk.) *Munkaegészségtan. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2000.*

63. Ehrig T., Bohren K. M., Wermuth B., von Wartburg J. P.: Degradation of aliphatic alcohols by human liver alcohol dehydrogenase: effect of ethanol and pharmacokinetic implications. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 12., 789-794, 1988.
64. Haffner H. T., Batra A., Wehner H. D., Besserer K., Mann K.: Methanol level and methanol elimination in alcoholic patients. *Blutalkohol*, 30., 52-62, 1993.
65. Zuba D., Piekoszewski W., Pach J., Winnik L., Parczewski A.: Concentration of ethanol and other volatile compounds in the blood of acutely poisoned alcoholics. *Alcohol*, 26., 17-22, 2002.
66. Bilzer N., Schmutte P., Jehs M., Penners B. M.: Kinetics of aliphatic alcohols (methanol, propanol-1 and isobutanol) in the presence of alcohol in the human body. *Blutalkohol*, 27., 385-409, 1990.
67. Eurostat, European Population on 1 January 2012 by age and sex,  
[http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=demo\\_pjan&lang=en](http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=demo_pjan&lang=en),  
utolsó megtekintés dátuma: 2014. február 15.
68. World Health Organization (WHO), Global Health Observatory database: Heavy episodic drinking,  
[http://apps.who.int/gho/athena/data/download.xsl?format=xml&target=GHO/SA\\_0000001415&profile=excel&filter=COUNTRY:\\*;SEX:\\*](http://apps.who.int/gho/athena/data/download.xsl?format=xml&target=GHO/SA_0000001415&profile=excel&filter=COUNTRY:*;SEX:*);  
utolsó megtekintés dátuma: 2013. november 18.
69. Kuntsche E., Rehm J., Gmel G.: Characteristics of binge drinkers in Europe. *Soc. Sci. Med.*, 59., 113-127, 2004.
70. Hemstrom O., Leifman H., Ramstedt M.: The ECAS-survey on drinking patterns and alcohol-related problems. In Norstrom T. (Ed.): *Alcohol in Postwar Europe. Consumption, drinking patterns, consequences and policy responses in 15 European countries.* Almqvist & Wiksell International, Stockholm, 2002.
71. Bonser R. W., Thompson N. T., Randall R. W., Garland L. G.: Phospholipase D activation is functionally linked to superoxide generation in the human neutrophil. *Biochem. J.*, 264., 617-620, 1989.

72. Nilsson E., Andersson T., Fallman M., Rosendahl K., Palmblad J.: Effects of ethanol on the chemotactic peptide-induced second messenger generation and superoxide production in polymorphonuclear leukocytes. *J. Infect. Dis.*, 166., 854-860, 1992.
73. Thompson N. T., Tateson J. E., Randall R. W., Spacey G. D., Bonser R. W., Garland L. G.: The temporal relationship between phospholipase activation, diacylglycerol formation and superoxide production in the human neutrophil. *Biochem. J.*, 271., 209-213, 1990.
74. Karavitis J., Murdoch E. L., Deburghraeve C., Ramirez L., Kovacs E. J.: Ethanol suppresses phagosomal adhesion maturation, Rac activation, and subsequent actin polymerization during Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis. *Cell Immunol.*, 274., 61-71, 2012.
75. Blander J. M.: Coupling Toll-like receptor signaling with phagocytosis: potentiation of antigen presentation. *Trends Immunol.*, 28., 19-25, 2007.
76. Swanson J. A., Hoppe A. D.: The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.*, 76., 1093-1103, 2004.
77. Underhill D. M., Gantner B.: Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes. Infect.*, 6., 1368-1373, 2004.
78. Swanson J. A., Hoppe A. D.: The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.*, 76., 1093-1103, 2004.
79. Rajendran L., Simons K. J.: Lipid rafts and membrane dynamics. *Cell Sci.*, 118., 1099-1102, 2005.
80. Simons K., Toomre D.: Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1., 31-39, 2000.
81. May R. C., Machesky L. M.: Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.*, 114., 1061-1077, 2001.
82. Dolganiuc A., Bakis G., Kodys K., Mandrekar P., Szabo G.: Acute ethanol treatment modulates Toll-like receptor-4 association with lipid rafts. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 30., 76-85, 2006.

83. Szabo G., Dolganiuc A., Dai Q., Pruett S. B.: TLR4, ethanol, and lipid rafts: a new mechanism of ethanol action with implications for other receptor-mediated effects. *J. Immunol.*, 178., 1243-1249, 2007.
84. Árnýas E., Pál L., Kovács Cs., 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., 844-851, 2012.
85. Pál L., Árnýas 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., 251-256, 2013.
86. Pál L., Árnýas 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., 627-628, 2013.
87. Rehm J., Kanteres F., Lachenmeier D.W.: Unrecorded consumption, quality of alcohol and health consequences. *Drug Alcohol Rev.*, 29., 426-436, 2010.

## **11. TÁRGYSZAVAK**

illegális alkoholfogyasztás, alifás alkoholok, fertőző betegségek, mikroorganizmusok elleni védekezés, granulociták, monociták, szuperoxid-anion termelés, fagocitózis

key words: unrecorded alcohol consumption, aliphatic alcohols, infectious diseases, antimicrobial defence granulocytes, monocytes, superoxide anion production, phagocytosis

## 12. 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. Árnas Ervinnek, aki szakmai és baráti tanácsaival elősegítette doktori disszertációm elkészítését. Köszönettel tartozom Dr. Ádány Róza egyetemi tanárnak, a Debreceni Egyetem Megelőző Orvostani Intézet igazgatójának és 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.

## 13. KÖZLEMÉNYEK



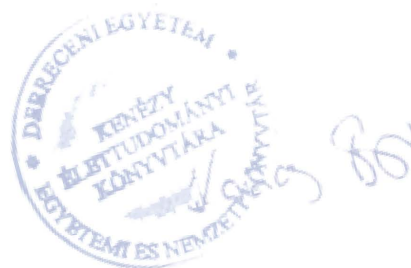
DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR  
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

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

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

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Pál, L.**, Árnias, 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. Árnias, 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.**, Árnas E., Ádány R., Szűcs S.: Illegálisan előállított tömény szeszitalokban található alkoholok hatása humán monociták fagocitózisára.  
In: Tavasz Szél. Szerk.: Keresztes Gábor, Doktoranduszok Országos Szövetsége, Budapest, 531-538, 2013.
4. **Pál, L.**, Árnas, 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.**, Árnas E., Tóth B., Ádány R., Szűcs S.: Illegálisan előállított tömény szeszitalokban található szennyező alkoholok hatása humán granulociták fagocitózisára.  
In: Fiatal kutatók az egészséges élelmiszerért. 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



## 14. FÜGGELÉK