

POLINEZASIĆENE MASNE KISELINE I IMUNOST: STANIČNI ODGOVOR U MLIJEČNIH KRAVA

Mislav Đidara, Marcela Šperanda

Sažetak

Imunosni sustav pod utjecajem je niza hranjivih tvari koje omogućavaju optimalni imunوسي odgovor. Pretjerana ili restriktivna hranidba mogu imati negativni učinak na imunوسي obranu te posljedično mogu umanjiti sposobnost životinjskog organizma za borbu protiv patoloških mikroorganizama. U esencijalne hranjive tvari spadaju dakako i masne kiseline. Sisavci nemaju sposobnost stvaranja n-3 ili n-6 masnih kiselina pa ih je nužno unijeti putem hrane. Riblje ulje i laneno sjeme najbolji su i najjeftiniji izvori n-3 masnih kiselina dostupnih u hranidbi životinja. Utjecaj n-3 masnih kiselina moguće je pratiti i preko djelovanja stanične komponente imunوسي sustava. Najjednostavniji način za ovo je praćenje sposobnosti proliferacije limfocita, fagocitoze i proizvodnje kemijskih medijatora nužnih za staničnu komunikaciju. Djelovanje n-3 masnih kiselina na fagocite očituje se kroz sposobnost fagocitoze. I pokusi na mliječnim kravama pokazuju da masne kiseline djeluju na staničnu komponentu imunوسي sustava. Proliferacija limfocita je sposobnost limfocita da se nakon stimulacije umnažaju. Sposobnost proliferacije limfocita mliječnih krava inkubiranih u mediju sa linolnom kiselinom smanjena je u odnosu na limfocite inkubirane u mediju s linolenskom kiselinom. Mononuklearne stanice iz krvi krava hranjenih lanenim sjemenom pokazuju smanjenu sposobnost proliferacije u usporedbi s limfocitima krava hranjenih uz dodatak n-6 masnih kiselina. N-3 masne kiseline utječu i na kemijske medijatore poput eikozanoida, citokina i dušičnog oksida. Limfociti krava inkubiranih u mediju s linolnom kiselinom pokazuju smanjenu sposobnost proizvodnje prostaglandina E2, dok oni inkubirani u mediju s linolenskom kiselinom pokazuju smanjenu sposobnost proizvodnje leukotriena B4. Masne kiseline utječu na proizvodnju eikozanoida, a poznato je da eikozanoidi reguliraju proizvodnju citokina pa je logično zaključiti da će n-3 masne kiseline djelovati i na proizvodnju citokina. Pokusi na mliječnim kravama nisu pokazali učinak hranidbe lanenim sjemenom na proizvodnju TNF- α , IL-1 β or IL-6, osim smanjenja proizvodnje IL-10..

Ključne riječi: imunوسي sustav, masne kiseline, n-3 PUFA, laneno sjeme.

Uvod

Nedvojbeno je dokazano da otpornost prema infekcijama značajno ovisi o sposobnosti suočavanja imunوسي sustava s patogenim mikroorganizmima. Imunosni sustav životinja pod utjecajem je nekoliko esencijalnih nutrijenata, koji imaju važnu ulogu u očuvanju optimalnog imunوسي odgovora.

Mislav Đidara, Marcela Šperanda, Zavod za stočarstvo, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3, 31000 Osijek; mdidara@pfos.h.

Deficitarna ili prekomjerna hranidba određenim hranjivim tvarima može imati štetan učinak na imunostni odgovor te posljedično može smanjiti sposobnost organizma u borbi protiv patogenih mikroorganizama i drugih uzročnika.

Lipidi su biološke molekule topive u organskim otapalima. U lipide ubrajamo kolesterol, trigliceride, sfingolipide, slobodne masne kiseline, biljne sterole, vitamine topive u mastima, različite pigmente i fosfolipide. Fosfolipidi su osnovna komponenta staničnih membrana, a služe i kao izvor masnih kiselina za sintezu biološki važnih molekula, poput eikozanoida. Eikozanoidi su skupina molekula u koju ubrajamo prostaglandine, tromboksane i leukotriene. Kolesterol je također važna komponenta staničnih membrana, a služi kao prekursor za sintezu steroidnih hormona (Mattos i sur., 2000).

Brojne su uloge masnih kiselina u imunostnim stanicama. Masne kiseline djeluju i kao kovalentni modifikatori strukture proteina te na taj način utječu na funkciju i smještaj proteina unutar stanice. Masne kiseline djeluju i kao regulator genske ekspresije, bilo djelujući na procese unutarstanične signalizacije, bilo djelujući na aktivaciju transkripcijskih faktora. Masne kiseline služe kao izvor energije, no također su sastavni dio fosfolipida te na taj način određuju fizikalne i funkcionalne osobitosti membrana (Calder, 2007a).

Struktura masnih kiselina određuje njihovu funkciju. Masne kiseline se međusobno razlikuju po duljini lanca ugljikovih atoma, broju dvostrukih veza u lancu, i vrsti izomera koju tvori pojedina dvostruka veza u lancu. Masne kiseline mogu biti zasićene i nezasićene. Zasićene masne kiseline ne posjeduju dvostruke veze u lancu ugljikovih atoma. Nezasićene masne kiseline dijelimo u pojedine kategorije ovisno o poziciji prve dvostruke veze u lancu ugljikovih atoma gledano s obzirom na metilni kraj molekule masne kiseline. Linolna kiselina, primjerice, ima 18 ugljikovih atoma u lancu i dvije dvostruke veze (18:2). Prva dvostruka veza nalazi se na šestoj poziciji gledano od metilnog kraja, pa linolnu kiselinu svrstavamo u n-6 odnosno ω -6 kategoriju masnih kiselina. Linolenska kiselina (18:3) spada u n-3 kategoriju masnih kiselina s obzirom da se prva dvostruka veza nalazi na trećoj poziciji u odnosu na metilni kraj. Sisavci imaju sposobnost konverzije masnih kiselina iz jedne u drugu, ali samo unutar pojedinih kategorija. Kod njih nije razvijen mehanizam za konverziju masnih kiselina između pojedinih kategorija (Mattos i sur., 2000).

Masne kiseline sisavci primaju putem hrane ili ih sami sintetiziraju *de novo* iz acetyl-CoA. Masne kiseline se mogu elongirati (produljiti) ili desaturirati, a na taj im se način mijenjaju biokemijska svojstva. Masne kiseline se produljuju djelovanjem enzima elongaza, koji postojećem lancu pridodaju dva nova

ugljikova atoma. Desaturaciju kataliziraju enzimi desaturaze, koji umeću dvostruku vezu u lanac ugljikovih atoma. Enzimi desaturaze klasificirani su ovisno o poziciji na koju umeću dvostruku vezu. Primjerice, $\Delta 6$ desaturaza umeće dvostruku vezu između šestog i sedmog ugljikovog atoma gledajući od karboksilnog kraja molekule masne kiseline. Kod sisavaca ne postoji mogućnost umetanja dvostruke veze na pozicijama iznad $\Delta 9$. Sisavci stoga ne mogu sintetizirati masne kiseline iz n-3 i n-6 kategorija (Cook, 1996). S obzirom da su n-3 i n-6 masne kiseline neizostavno potrebne sisavcima smatramo ih esencijalnim masnim kiselinama te ih životinje u organizam moraju unijeti putem hrane.

Za razliku od životinja, biljke mogu transformirati oleinsku kiselinu (18:1n-9), koja već posjeduje jednu dvostruku vezu, u linolnu kiselinu (18:2n-6) na način da se na mjesto C-9 atoma pomoću Δ^{12} -desaturaze umetne još jedna dvostruka veza. U biljkama se također djelovanjem Δ^{15} -desaturaze linolna kiselina transformira u α -linolensku kiselinu (18:3n-3).

Sisavci mogu transformirati α -linolensku kiselinu koju su unijeli putem hrane u eikozapentaensku kiselinu (20:5n-3), a nju pak u dokozaheksaensku kiselinu (22:6n-3). Sličnim slijedom reakcija linolna kiselina se preko γ -linolenske (18:3n-6) i dihomo- γ -linolenske (20:3n-6) kiseline transformira u arahidonsku (20:4n-6) kiselinu. Morske biljke, a osobito jednostanične alge u fitoplanktonu elongiraju i desaturiraju α -linolensku kiselinu tvoreći eikozapentaensku i dokozaheksaensku kiselinu. Hranidbenim lancem ove kiseline stižu do riba pa je stoga količina ovih kiselina u ribljem ulju obilata (Elizabeth i sur., 1998).

1. Metodologija proučavanja djelovanja PUFA na imunosni sustav

Postoji niz dostupnih metoda pomoću kojih je moguće proučavati djelovanje PUFA na komponente imunosnog sustava. Brojne su *in vitro* metode pa se tako u pojedinima za kulturu stanica koriste čiste masne kiseline, miješane masne kiseline ili drugi lipidi (trigliceridi, fosfolipidi, lipoproteini). Ova se istraživanja obavljaju u strogo kontroliranim uvjetima, no s druge strane takvi uvjeti nisu po svojoj prirodi fiziološki. Stanice u takvim uvjetima ne dolaze u kontakt s drugim vrstama stanica, s kojima bi inače u živome organizmu bili u kontaktu. Koncentracije masnih kiselina koje se pri tome koriste, često višestruko nadmašuju one koje bi i u najekstremnijim situacijama bile moguće *in vivo* (Calder i sur., 2002).

Drugi način proučavanja utjecaja PUFA na imunosne stanice je da nakon provedenog hranidbenog tretmana na životinjama, izoliramo željene stanice iz

krvi ili organa te ih kultiviramo *ex vivo*. Iako i ova metoda sadrži određene nedostatke, kao i čista *in vitro* kultura stanica, ipak je ona bliža realnom *in vivo* stanju. Ova metoda omogućava kontrolirane uvjete za proučavanje specifičnih stanica i funkcija te otkrivanje mehanizama koji kontroliraju funkcionalne procese. Limitirajući faktor za *ex vivo* proučavanje stanica imunosnog sustava kod mliječnih krava je mogućnost izolacije tih stanica iz pojedinih vrsta tkiva. Kod istraživanja na laboratorijskim životinjama ovo ne predstavlja preveliki problem, jer nakon njihovog žrtvovanja (miševi, štakori) ili klanja (kunići, svinje), potrebne su stanice dostupne iz svih vrsta tkiva (slezene, timusa, limfnih čvorova, limfnoga tkiva smještenog u plućima i stijenci crijeva). Kod krava se kao izvor ovih stanica nameću krv i limfni čvorovi.

Najveći broj najkvalitetnijih istraživanja utjecaja PUFA na djelovanje imunosnog sustava napravljen je na laboratorijskim životinjama odnosno njihovim stanicama. To je i razlog zašto se u ovome pregledu velikim dijelom osvrćemo na ta istraživanja. Treba međutim biti vrlo oprezan u usporedbi rezultata tih istraživanja i onih obavljenih na kravama i njihovim stanicama. Razlika u fiziologiji preživača i nepreživača očita je u dijelu probave, no razlike postoje i u ostalim fiziološkim procesima pa tako i onima vezanima uz imunosni sustav. Varijacije u imunosnom odgovoru kod laboratorijskih životinja nisu toliko velike s obzirom da se koriste čiste linije križane u srodstvu. Međutim imunosni odgovor razlikuje se ne samo među vrstama životinja nego i među pasminama. Ovaj problem može se očitovati prilikom istraživanja na mliječnim kravama, s obzirom na genetsku varijabilnost. Laboratorijske životinje su u najvećem broju istraživanja hranjene s velikim količinama masnih kiselina, što nikako nije moguće postići u istraživanjima s kravama s obzirom na limitirajući faktor udjela masti u hrani.

2. Sastav masnih kiselina u imunosnim stanicama

Imunosne stanice (limfociti slezene, peritonealni makrofagi) glodavaca hranjenih za njih uobičajenom hranom obično sadrže fosfolipide u čijem sastavu arahidonska kiselina obuhvaća 15-20% udjela, dok je udio dugolančanih n-3 masnih kiselina vrlo mali (Calder i sur. 1994). Modificiranjem sastava masnih kiselina u obroku dolazi do promjene sastava masnih kiselina u imunosnim stanicama. U njihovom sastavu postaju zastupljenije one masne kiseline koje su zastupljenije u hrani. Stoga je moguće obogatiti imunosne stanice arahidonskom kiselinom, na način da pokusne životinje hranimo hranom s dodatkom arahidonske kiseline (Peterson i sur., 1998). S druge strane, hranidba uz dodatak dugolančanih n-3 masnih kiselina eikozapentaenske i

dokozaheksaenske kiseline povećat će udio upravo tih kiselina u sastavu fosfolipida imunosnih stanica. Uobičajeno je da se povećanje udjela n-3 masnih kiselina odvija na račun n-6 masnih kiselina, osobito arahidonske kiseline. Ugradnja EPA i DHA u imunosne stanice ljudi dostiže vrhunac unutar četiri tjedna od početka uzimanja većih količina tih kiselina u hrani (Rees i sur. 2006). Vrhunac ugradnje tih masnih kiselina u imunosne stanice u snažnoj je korelaciji s količinom masnih kiselina koje se konzumiraju.

3. Metode koje uključuju izolirane stanice

Proliferacija limfocita je jedan o češćih indikatora koji se koriste kod proučavanja izoliranih stanica, a odnosi se na sposobnost limfocita da se nakon stimulacije umnažaju. Opseg proliferacije limfocita obično se određuje pomoću radioaktivno označenog prekursora (primjerice timidina) koji se ugrađuje u DNA. Kako bi se potakla proliferacija nužan je prikladan stimulans (mitogen). Kao mitogen najčešće se koristi konkavalin A (Con A) i fitohemaglutinin (PHA) kao specifični stimulatori T-limfocita, bakterijski lipopolisaharidi (LPS) koji stimuliraju B-limfocite, te ekstrakt biljke *Phytolacca americana* koji stimulira i T- i B-limfocite. Monoklonska protutijela na neke membranske strukture (primjerice CD3 ili kombinaciju CD3 i CD4) također stimuliraju proliferaciju. Mitogen mogu biti i tvari koje stimuliraju protein kinazu C (PKC) i porast koncentracije unutarstaničnoga slobodnog kalcija. Ako je životinja senzibilizirana na određeni antigen, onda i on može djelovati kao stimulator proliferacije limfocita. Međutim proliferativni odgovor na antigen bit će puno manji u odnosu na mitogen ili protutijela. Naime, antigen će stimulirati samo one T-limfocite koji prepoznaju taj antigen. Suprotno tome stimulacija mitogenom je nespecifična, odnosno potaknuti će proliferaciju svih T- ili B-limfocita. Kao odgovor na stimulaciju mitogenom, protutijelima ili antigenom limfociti će početi proizvoditi citokine (IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-10) pa je moguće mjeriti njihovu koncentraciju. Lipopolisaharidima stimulirani monociti i makrofagi proizvode IL-1, IL-6 i TNF- α . B-limfociti proizvode Ig pa je moguće mjeriti ukupnu količinu pojedinih klasa Ig (IgG, IgA, IgM) ili protutijela unutar pojedine klase specifična za određeni antigen. Moguće je mjeriti i ekspresiju površinskih molekula (adhezijskih molekula) zaduženih za međustaničnu komunikaciju. Tako je moguće mjeriti ekspresiju površinskih molekula zaduženih za prezentiranje antigena (MHC II, MHC I) ili staničnu aktivaciju (receptori citokina). Mjerljiva je i sposobnost stanica koje prikazuju antigen (APC) da prezentiraju antigen senzibiliziranim T-limfocitima, te

sposobnost NK-stanica i citotoksičnih limfocita (CTL) da unište tumorske ili virusima zaražene stanice (Calder i sur., 2002).

4. Proliferacija limfocita

Hranidbom laboratorijskih životinja (miševa, štakora, pilića, kunića) hranom s visokim udjelom (70-200 g/kg) ribljega ulja bogatog eikozapentaenskom i dokozaheksaenskom kiselinom, dovelo je do supresije proliferacije limfocita slezene stimuliranih T- i B-limfocitnim mitogenima, u odnosu na ostale skupine hranjene mastima poput kukuruznog ulja, kokosovog ulja, šafranikovog ulja ili lanenog ulja (Fritsche i sur. 1991; Yaqoob i sur., 1994; Sanderson i sur., 1995; Yaqoob i Calder, 1995a). Hranidba laboratorijskih životinja hranom s udjelom lanenog ulja od 76-200 g/kg umanjila je proliferaciju limfocita u odnosu na kontrolne skupine hranjene uz dodatak zasićenih masti ili hranom bogatom n-6 PUFA (Fritsche i sur., 1991; Jeffery i sur., 1996). Ovi učinci ponekad su se očitovali samo kod stanica inkubiranih u autolognom serumu, a do učinka nije dolazilo ako su stanice inkubirane u govedem fetalnom serumu (Fritsche i sur. 1991; Yaqoob i sur., 1994). Inkubacija stanica u govedem fetalnom serumu mogla bi objasniti nedostatak učinka na proliferaciju limfocita u istraživanjima kod kojih je kao dodatak hranidbi korišteno riblje ili laneno ulje (Berger i sur. 1993). Dokazano je da su promjene u sastavu masnih kiselina limfocita potaknute manipuliranom hranidbom, bolje održive ako su stanice inkubirane autolognom, a ne govedem fetalnom serumu (Yaqoob i Calder, 1995a).

Thanasak i sur. (2005) pratili su proliferativni odgovor konkavalinom A stimuliranih govedih limfocita inkubiranih u mediju s dodatkom linolne odnosno linolenske kiseline. Proliferativni odgovor bio je značajno manji kod limfocita inkubiranih u mediju s većim koncentracijama linolne kiseline. Proliferativni odgovor kod limfocita inkubiranih u mediju s dodatkom linolenske kiseline nije se mijenjao bez obzira na koncentraciju linolenske kiseline. U istome pokusu praćena je proliferacija limfocita bez stimulacije konkavalinom A. Pri tome je došlo do značajno veće proliferacije limfocita inkubiranih u mediju s malom koncentracijom linolne kiseline, dok linolenska kiselina nije imala nikakvog utjecaja.

Lesard i sur. (2003) izveli su pokus s trima skupinama krava hranjenih različitim vrstama dodataka obroku: pripravkom Megalac® (kalcijevim solima palminog ulja), cjelovitim lanenim sjemenom i mikroniziranom sojom. Iz krvi krava izdvojene su mononuklearne stanice, stimulirane konkavalinom A i inkubirane u govedem fetalnom serumu te autolognom serumu. Statistički se

pokazala značajna interakcija (vrijeme x vrsta dodatka) za proliferaciju mononuklearnih stanica inkubiranih s goveđim fetalnim serumom. Ova interakcija posljedica je smanjenog proliferativnoga odgovora mononuklearnih stanica krava 5. dana nakon teljenja, hranjenih lanenim sjemenom u odnosu na proliferativnu sposobnost mononuklearnih stanica krava hranjenih uz dodatak pripravka Megalac® i mikronizirane soje. Ova razlika nije primijećena između mononuklearnih stanica inkubiranih u autolognom serumu.

Suprotno ovome u sličnom pokusu Lessard i sur. (2004) zamijetili su slabiji proliferativni odgovor perifernih mononuklearnih stanica stimuliranih konkavalinom A kod krava hranjenih mikroniziranom sojom u odnosu na periferne mononuklearne stanice krava hranjenih s cijelim lanenim sjemenom. Ovu razliku eventualno je moguće objasniti zbog činjenice da se krave u prethodnom pokusu lanenim sjemenom počelo hraniti tek nakon teljenja, dok su u ovom pokusu lanenim sjemenom hranjene tijekom cijeloga suhostaja (6 tjedana). Također je zamijećeno da je proliferativni odgovor limfocita značajno veći kod multiparnih krava u odnosu na prvotelke.

4.1. Citotoksični T-limfociti

Aktivnost citotoksičnih T-limfocita bila je niža kod miševa hranjenih ribljim uljem (100 g/kg hrane) kroz 10 tjedana, u odnosu na one hranjene lanenim uljem (100g/kg hrane) (Fritsche i Johnston, 1990). Kod pilića hranjenih uz dodatak ribljega ili lanenoga ulja (70 g/kg), zamijećena je smanjena aktivnost citotoksičnih T-limfocita slezene u odnosu na piliće hranjene s dodatkom (70 g/kg) kukuruznog ulja ili životinjske masnoće (Fritsche i Cassity, 1992).

4.2. NK stanice

Berger i sur. (1993) hranili su ženke miševa tijekom 5 mjeseci hranom s dodatkom maslinovog, šafranikovog, lanenog ulja i ribljeg ulja (100g/kg hrane). U potomaka čije su majke hranjene s dodatkom ribljega ulja, zamijećena je smanjena aktivnost NK stanica slezene. U istraživanju Yaqooba i sur. (1994) pokazalo se da je bez obzira na vrstu ulja aktivnost NK stanica slezene uvijek niža u skupini koja je hranjena s visokim udjelom ulja u hrani u odnosu na skupinu koja je hranjena s malim udjelom ulja u hrani. Od svih vrsta ulja (kokosovo, maslinovo, šafranikovo i riblje) aktivnost NK stanica je ipak bila najniža u skupini hranjenoj s ribljim uljem. Dodatak lanenog ulja od 200g/kg smanjio je aktivnost NK stanica slezene kod štakora u odnosu na one hranjene s dodatkom suncokretovog ulja (Jeffery i sur., 1996).

5. Fagocitoza

Fagocitoza je ključni čimbenik u imunosnom odgovoru domaćina. S obzirom da podrazumijeva hvatanje i proždiranje invadirajućih patogena, ona je prvi korak u eliminaciji inih. Nakon akta proždiranja slijedi uništavanje patogena u istoj stanici i prikazivanje nastalih peptida u suradnji sa MHC-om T-limfocitima. Fagocitoza uključuje direktno vezanje protutijelima ili kompleksom obloženog patogena, za receptore na fagocitu. Nakon toga dolazi do invaginacije stanične membrane oko patogena i stvaranja vakuole. U vakuoli se patogen probavlja, a nastali peptidi se prikazuju T-limfocitima te se na taj način aktivira stečena komponenta imunog odgovora (Calder, 2007).

Istraživanja *in vitro* jasno su dokazala da se promjene sastava masnih kiselina stanične membrane fagocita očituju u njihovoj sposobnosti fagocitoze. Uzrok ovome mogla bi biti promjena ekspresije receptora koji sudjeluju u fagocitozi, no vjerojatnije je da je uzrok promjena fizikalnih svojstava membrane, što sugerira i istraživanje na makrofagima miševa (Calder i sur., 1990). Ta istraživanja sugeriraju da PUFA povećava količinu materijala kojeg fagociti mogu unijeti. Istraživanja glede utjecaja povećanog unosa n-3 PUFA od strane laboratorijskih životinja su kontradiktorna (Calder, 1998). Razlog ovome vjerojatno su različite metodologije i načini praćenja fagocitoze. U istraživanjima u kojima se prati broj i udio fagocita koji sudjeluju u proždiranju ciljnoga materijala teško se može zamijetiti utjecaj PUFA-e s obzirom da je malo vjerojatno da će takva manipulacija u potpunosti zaustaviti fagocitoznu sposobnost stanica ili da će aktivirati one stanice koje su prethodno bile potpuno neaktivne. Ono na što PUFA može djelovati je količina materijala koju su aktivne stanice u stanju fagocitirati. Protočnom citometrijom moguće je istovremeno usporediti fagocitoznu aktivnost, odnosno kapacitet fagocitoze te udio aktivnih stanica. Praćenjem bakterija roda *E. coli* označenih fluorescentnim tvarima pomoću protočnog citometra utvrđena je negativna korelacija udjela zasićenih masnih kiselina i sposobnosti fagocitoze (Kew i sur., 2003). Istovremeno je utvrđena pozitivna korelacija udjela ukupnih PUFA, ukupnih n-6 PUFA i ukupnih n-3 PUFA te sposobnosti fagocitoze neutrofila i monocita. Zanimljivo je da je sposobnost fagocitoze negativno korelirala s povećanjem odnosa n-6 PUFA : n-3 PUFA, sugerirajući na taj način da n-3 PUFA značajnije utječe na povećanje sposobnosti fagocitoze. Sličan pokus proveli su Pisani i sur. (2009) na kozjim neutrofilima inkubiranim u različitim koncentracijama (0-200 μ M) EPA i DHA. Dokazali su značajno veću sposobnost fagocitoze fluorescentno označenih bakterija *E. coli* od strane neutrofila inkubiranih u mediju s dodatkom EPA i DHA u odnosu na neutrofile

inkubirane u mediju bez dodatka spomenutih kiselina. Sposobnost fagocitoze se nije povećavala s povećanjem koncentracije kiseline. Prema tome za pretpostaviti je da će obogaćivanje membrane fagocita sa n-3 PUFA-om povećati njihovu sposobnost fagocitoze.

6. Prikazivanje antigena

Utjecaj PUFA na ekspresiju MHC slabo je istraživan (Calder, 2007b). Dodatkom n-3 PUFA u hranu miševa i štakora smanjio se postotak stanica u eksudatu peritoneuma koje na svojoj površini nose MHC II proteine (Sherrington i sur., 1995). Istraživanja sugeriraju da hrana s većim udjelom n-3 PUFA rezultira smanjenom prikazivanju antigena. Hranidba miševa etilnim esterom eikozapentaenske kiseline tijekom perioda od 5 tjedana rezultirala je smanjenim prikazivanjem antigena stanica slezene (Fujikawa i sur. 1992). Dendritične stanice ključne su stanice za prikazivanje antigena. Hranjenje štakora s ribljim uljem u količini od 200 g/kg u odnosu na hranjenje s obrocima s niskim udjelom masti ili šafranikovim uljem u dozi od 200 g/kg, znatno reducira ekspresiju MHC II na dendritičnim stanicama (Sanderson i sur., 1997).

Novija *in vitro* istraživanja na B-limfocitima obrađenih arahidonskom i dokozaheksaenskom kiselinom pokazuju smanjenje ekspresije MHC I proteina (Shaikh i Edidin, 2007). Smanjena ekspresija MHC I na površini stanica posljedica je slabijeg protoka novih molekula klase I od endoplazmatskog retikuluma do Golgijejevog tijela. Spoznaja da arahidonska i dokozaheksaenska kiselina usporavaju protok molekula klase I, otkriva novi mehanizam pomoću kojega masne kiseline utječu na prikazivanje antigena.

7. Utjecaj n-3PUFA na staničnu komunikaciju imunskog sustava i proizvodnju eikozanoida

Međustanična komunikacija stanica imunskog sustava odvija se putem kemijskih medijatora (eikozanoida, citokina, NO) i direktnim staničnim kontaktom pomoću adhezijskih molekula, dok n-3 PUFA utječe na sve ove komunikacijske puteve.

Eikozanoidi su skupina oksigeniranih produkata dihomo- γ -linolenske, arahidonske i eikozapentaenske kiseline. U eikozanoide spadaju prostaglandini (PG), tromboksani, leukotrieni (LT), lipoksini, hidroksieikozatetraenska kiselina, hidroperoksieikozatetraenska kiselina te novootkrivena skupina lipidnih medijatora nazvanih resolvini i dokozanoidi. PUFA prekursor za

eikozanoide otpušta se od membranskog fosfatidilkolina djelovanjem fosfolipaze A₂ ili od membranskog fosfatidilinozitol-4,5-bifosfata djelovanjem fosfolipaze C i diacilglicerol (DAG) lipaze. Put sinteze eikozanoida započinje ili ciklooksigenazama (COX 1 i COX 2) iz koje nastaju prostaglandini i tromboksani ili sa 5-, 12- ili 15-lipooksigenazama (LOX) iz kojih nastaju leukotrieni, hidroperoksiiekozatetraenska kiselina, hidroksiekozatetraenska kiselina, lipoksini i resolvini. S obzirom da membrane većine stanica sadrže velike količine arahidonske kiseline u odnosu na dihomo- γ -linolensku i eikozapentaensku kiselinu, arahidonska kiselina je uobičajeni prekursor za sintezu eikozanoida i nastanak prostaglandina i tromboksana serije 2 te leukotriena serije 4. Količine i vrste sintetiziranih eikozanoida ovise o dostupnosti arahidonske kiseline, aktivnosti fosfolipaze A₂ i fosfolipaze C, aktivnosti ciklooksigenazene i lipooksigenaza, vrsti stanica i vrsti stimulansa (Elizabeth i sur., 1998).

Stanice imunskog sustava važan su izvor eikozanoida, a istovremeno su podložne njihovom regulatornom utjecaju. Prostaglandini su zaduženi za regulaciju intenziteta i trajanja upalnih i imunih odgovora. PGE₂ ima niz proupalnih učinaka, uključujući poticanje vrućice i crvenila, povećanja vaskularne permeabilnosti i vazodilatacije, te uvećavanja boli i edema kojima su uzrok druge tvari poput bradikinina i histamina. Kod kroničnih upalnih stanja i infekcija zamjećuje se povećana proizvodnja PGE₂. PGE₂ inhibira proliferaciju limfocita, aktivnost NK-stanica i proizvodnju citokina (IL-2, IFN- γ) od strane Th 1 limfocita, te proizvodnju TNF- α i IL-1 β od strane monocita i makrofaga. Suprotno tome leukotrieni imaju sposobnost kemotaksije, a također sudjeluju u regulaciji upalnih i imunskih procesa, te proizvodnji citokina.

Eikozapentaenska i dokozaheksaenska kiselina kompetitivno inhibiraju oksigenaciju arahidonske kiseline putem ciklooksigenaze. Uz to eikozapentaenska kiselina (ali ne i dokozaheksaenska kiselina) može djelovati i kao supstrat za ciklooksigenazu i 5-lipooksigenazu. Hranidba n-3 PUFA-om rezultira smanjenjem količine arahidonske kiseline u staničnim membranama, a time i smanjenim kapacitetom sinteze eikozanoida iz arahidonske kiseline (Yaquob i Calder, 1995b). Iz eikozapentaenske kiseline nastaju prostaglandini i tromboksani serije 3, te leukotrieni serije 5, koji nemaju ista biološka svojstva kao njihovi analozi koji nastaju iz arahidonske kiseline. Eikozanoidi nastali iz EPA-e često su manje biološki aktivni u odnosu na one nastale iz arahidonske kiseline (Bagga i sur., 2002), no postoje i suprotni podaci (Miles i sur., 2002).

Thanasak i sur. (2005) u pokusu na kravljim limfocitima inkubiranim u mediju s različitim koncentracijama linolne i linolenske kiseline utvrdili su

značajno veću koncentraciju PGE_2 u supernatantu stanica stimuliranih konkavalinom A u odnosu na one koje nisu bile stimulirane. Proizvodnja PGE_2 od strane limfocita stimuliranih konkavalinom A bila je značajno manja jedino kod limfocita inkubiranih u mediju s najvećom ($250\mu\text{M}$) koncentracijom linolne kiseline, dok inkubacija u mediju s linolenskom kiselinom nije imala utjecaja na proizvodnju PGE_2 . U istom pokusu koncentracija LTB_4 u supernatantu limfocita stimuliranih konkavalinom A i nestimuliranih nije se značajno razlikovala. Supernatanti limfocita stimuliranih konkavalinom A i nestimuliranih, ali inkubiranih u medijima s većim ($125, 250\mu\text{M}$) koncentracijama linolenske kiseline sadržavali su značajno manje količine LTB_4 u odnosu na supernatante limfocita inkubiranih u medijima s manjim ($1, 5, 25\mu\text{M}$) koncentracijama linolenske kiseline i u odnosu na one inkubirane u medijima s dodatkom linolne kiseline.

U pokusu s trima skupinama krava hranjenih različitim vrstama dodataka obroku: pripremkom Megalac® (kalcijevim solima palminog ulja), cjelovitim lanenim sjemenom i mikroniziranom sojom, koncentracija prostaglandina E_2 u serumu krava 5 dana nakon telenja bila je gotovo podjednaka bez obzira na hranidbu, a nije se značajno promijenila ni do 21. dana poslije teljenja. U vremenu umjetnog osjemenjivanja i 21 dan poslije koncentracija prostaglandina E_2 u serumu krava hranjenih lanenim sjemenom bila je značajno manja $p=0,04$ u odnosu na serum krava hranjenih uz dodatak pripravka Megalac® i sojine sačme (Lessard i sur., 2003).

Lessard i sur. (2004) nisu uočili učinak hranidbe na proizvodnju prostaglandina E_2 što je u suprotnosti s gore navedenim da n-3 PUFA smanjuje proizvodnju E_2 u mononuklearnim stanicama.

8. Djelovanje n-3 PUFA na proizvodnju citokina

S obzirom da lipidi u hrani utječu na proizvodnju eikozanoida, a eikozanoidi reguliraju proizvodnju citokina za pretpostaviti je da masti u hrani, a osobito one koje sadržavaju n-3 PUFA utječu na proizvodnju citokina. Postoji niz radova koji su se bavili utjecajem n-3 PUFA na proizvodnju masnih kiselina kod laboratorijskih životinja.

Brojna istraživanja pokazala su da hranidba glodavaca s povećanim udjelom n-3 PUFA u hrani rezultira povećanom proizvodnjom TNF od strane makrofaga *ex vivo* (Hubbart i sur., 1994; Calder, 1997). S druge strane, postoje istraživanja u kojima se pokazao suprotni učinak n-3 PUFA, odnosno smanjenje proizvodnje TNF-a (Yaqoob i Calder, 1994; Wallace i sur., 1998), ili pak nikakvog učinka na razinu TNF-a nije bilo (Tappia i

Grimble, 1994). Čini se da razlike među istraživanjima nisu posljedica različitih vrsta životinja, trajanja hranidbe, vrste ili količine n-3 PUFA u hrani. Vjerojatnije je da su različiti rezultati posljedica različitih načina ili sredstava za aktivaciju makrofaga (tioglikolat, kazein, kompletni Freundsov adjuvant), uporabe makrofaga iz različitih vrsta tkiva (peritonealni makrofagi, alveolarni makrofagi, Kupfferove stanice). Usporedba ovakvih istraživanja je komplicirana jer se za kulturu stanica uzetih *ex vivo* koriste različite procedure. Važni su i najmanji detalji, što pokazuje istraživanje Somersa i Ericksona (1994), koji su utvrdili da na proizvodnju TNF-a u makrofagima hranidba nije utjecala ukoliko su stimulirani 8 sati s lipopolisaharidima, ali ako su stimulirani 24 sata, makrofagi miševa hranjenih ribljim uljem proizveli su više TNF-a.

Utjecaj povišene razine masti u hrani na razinu TNF-a u cirkulaciji, a time i proizvodnju TNF-a *in vivo* istraživao je manji broj znanstvenika. Razina TNF-a bila je značajno veća u plazmi miševa hranjenih s dodatkom (100g/kg) ulja od perille (*perilla teres*) bogatog α -linolenskom kiselinom u odnosu na one hranjene uz dodatak (100g/kg) šafranikovog ulja bogatog linolnom kiselinom (Watanabe i sur., 1991). Slično tome više razine TNF-a zabilježene su u serumu miševa hranjenih s dodatkom ribljega ulja u odnosu na one hranjene s dodatkom kokosovog ili kukuruznog ulja, 5 sati nakon intraperitonealne injekcije lipopolisaharida (Chang i sur., 1992).

Većina istraživanja na peritonealnim makrofagima stimuliranima tioglikolatom, pokazala je smanjenje razine stvaranja interleukina (IL)-1 *ex vivo* (Tappia i Grimble, 1994; Yaqoob i Calder, 1995b; Wallace i sur., 1998). I ovdje kao i u slučaju TNF-a određena istraživanja pokazuju suprotan učinak odnosno smanjenje razine IL-1 (Blok i sur., 1992) ili nepromijenjenu razinu (Ertel i sur., 1993).

Peritonealni makrofagi iz miševa hranjenih s dodatkom ribljega ulja, stimulirani tioglikolatom pokazali su smanjenu proizvodnju IL-6 (Yaqoob i Calder, 1995b).

Hranjenje ribljim uljem rezultira značajnim smanjenjem proizvodnje PGE₂ (Yaqoob i Calder, 1995b), a s obzirom da PGE₂ inhibira proizvodnju TNF- α , IL-1 i IL-6 (Endres i sur., 1991) za pretpostaviti je da mehanizam djelovanja n-3 PUFA ide putem smanjenja proizvodnje PGE₂ čime se povećava proizvodnja citokina. Međutim dodavanje PGE₂ kulturi peritonealnih makrofaga iz miševa hranjenih dodatkom ribljeg ulja nije smanjilo proizvodnju TNF- α do razine TNF- α makrofaga iz miševa hranjenih s dodatkom drugih ulja (Hardardottir i Kinsella, 1992). Sve ovo sugerira manje izravno rješenje, pogotovo stoga što leukotrieni -4-serije povećavaju proizvodnju TNF-a, IL-1 i IL-6 (Poubelle i sur. 1991), a hranjenje ribljim uljem smanjuje proizvodnju

leukotriena -4-serije, pa će hranjenje n-3 PUFA-om smanjiti proizvodnju i stimulirajućih i inhibirajućih faktora. Stoga će konačni učinak hranjenja s n-3 PUFA na proizvodnju citokina od strane makrofaga ovisiti o balansu proizvodnje PGE₂ i leukotriena -4-serije i balansa u proizvodnji tih medijatora i analoga proizvedenih iz eikozapentaenske kiseline. Moguće je da su kontradiktorni podaci u literaturi nastali upravo zbog promjena u balansu proizvodnje PGE₂, LTB₄ i LTB₄, te PG i LT nastalih iz eikozapentaenske kiseline. U obzir treba uzeti i pojedine makrofage koji eventualno naginju na jednu ili drugu stranu balansa.

Suprotno velikom broju istraživanja u kojima su se koristili makrofagi, broj radova u kojima je proučavana proizvodnja citokina iz limfocita značajno je manji. Turek i sur. (1994) uočili su da alveolarni limfociti svinja smanjuju proizvodnju IL-2 ako su životinje hranjene uz dodatak (105g/kg) ribljeg i lanenog ulja. Dodatak α -linolenske kiseline ili eikozapentaenske i dokozaheksaenske kiseline u hranu majmuna, rezultirao je povećanom *ex vivo* proizvodnjom IL-2 (Wu i sur., 1996). Yaqoob i Calder (1995a) tijekom 8 tjedana hranili su kontrolnu skupinu miševa s malom količinom masti, te pokusne skupine s dodatkom (200 g/kg) različitih ulja (hidrogeniziranim kokosovim, maslinovim, šafranikovim i ribljim), nakon čega su limfociti slezene stimulirani konkavalinom A. Koncentracija IL-2 bila je veća u mediju iz limfocita slezene miševa hranjenih maslinovim ili šafranikovim uljem u odnosu na onu miševa hranjenih uz dodatak hidrogeniziranog kokosovog ulja ili hranom s malo masnoća, dok hranidba ribljim uljem nije imala utjecaja na koncentraciju IL-2. Hranjenje miševa uz dodatak (10 g/kg) etilnih estera eikozapentaenske ili dokozaheksaenske kiseline značajno smanjuje *ex vivo* proizvodnju IL-2 iz limfocita slezene stimuliranih konkavalinom A (Jolly i sur., 1997).

Osim IL-2 malobrojna su istraživanja na životinjskim modelima koja su pratila utjecaj masnih kiselina na druge citokine koje proizvode limfociti. Istraživanja pokazuju minimalni utjecaj na proizvodnju IL-4, IL-10 i interferona- γ (Fernandes i sur., 1994; Yaqoob i Calder, 1995a).

Lessard i sur. (2004) u pokusu na kravama dokazali su značajno veću proizvodnju IFN- γ iz mononuklearnih stanica stimuliranih konkavalinom A i inkubiranih u autolognom serumu, multiparnih krava hranjenih cjelovitim lanenim sjemenom u odnosu na prvotelke hranjene istim obrokom. Također proizvodnja IFN- γ je bila značajno smanjena prvi tjedan nakon teljenja u odnosu na tri tjedna prije teljenja te tri i šest tjedana nakon teljenja. Hranidbeni utjecaj (laneno sjeme, Megalac® ili mikronizirana soja) nije djelovao na

proizvodnju TNF- α iz monocita stimuliranih lipopolisaharidom i inkubiranih bilo u govedem fetalnom serumu, bilo u autolognom serumu.

Caroprese i sur. (2009) istraživali su utjecaj masnih kiselina na izlučivanje citokina na trima skupinama krava, od kojih je prva hranjena uz dodatak lanenog sjemena, druga uz dodatak inkapsuliranog ribljeg ulja, a treća je bila kontrolna. Krave su držane u uvjetima visoke ambijentalne temperature. Nakon uzorkovanja krvi, u serumu su određene koncentracije IL-1 β , IL-6 i IL-10. Koncentracije IL-1 β i IL-6 nisu se značajno razlikovale među skupinama, dok je koncentracija IL-10 bila značajno manja u serumu krava hranjenih uz dodatak lanenog sjemena u odnosu na kontrolnu skupinu (25.56 : 36.93 bU/mL). S obzirom da IL-10 djeluje supresivno, smanjujući sintezu proupalnih citokina iz makrofaga i dendritičkih stanica, možemo zaključiti da je u ovome slučaju laneno sjeme djelovalo imunostimulirajuće. Za razliku od lanenog sjemena, riblje ulje nije imalo utjecaja na imunološki odgovor krava u uvjetima visoke ambijentalne temperature.

9. Utjecaj PUFA na proizvodnju dušičnog oksida (NO) iz makrofaga

Istraživanja u vezi utjecaja PUFA na proizvodnju reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i reaktivnih dušikovih spojeva (RNS) iz fagocitirajućih stanica, pokazuju kontradiktorne rezultate. Dva istraživanja koja su koristila peritonealne makrofage štakora pokazala su značajno smanjenje proizvodnje NO u štakora hranjenih ribljim uljem (Boutard i sur., 1994). Suprotno tome Hubbard i sur., (1994) kod makrofaga miševa hranjenih uz dodatak (100 g/kg) lanenog ili ribljeg ulja, a stimuliranih tioglikolatom, nisu našli povećanje proizvodnje NO. No u istom istraživanju, otkrivena je smanjena citotoksičnost makrofaga prema P815 stanicama osjetljivima na NO, a vjerojatni uzrok je smanjena proizvodnja NO. Yaqoob i Calder (1995b) otkrili su da hranjenje uz dodatak nekoliko vrsta ulja, između ostalih i ribljega (200 g/kg), povećava proizvodnju NO u makrofaga miševa stimuliranih tioglikolatom, u odnosu na one hranjene bez dodatka ulja. Riblje ulje povećava proizvodnju NO u peritonealnih makrofaga miševa (Renier i sur., 1993), i makrofaga pluća svinja (Turek i sur., 1994).

Lessard i sur. (2004) u pokusu s kravama nisu uočili učinak hranidbe s dodatkom n-3 PUFA na proizvodnju dušičnog oksida iz monocita aktiviranih lipopolisaharidom izoliranih iz krvi krava.

10. Zaključak

Brojni pokusi na laboratorijskim životinjama i ljudima dokazali su protuupalni učinak n-3 PUFA. Pokusi na mliječnim kravama pokazuju da n-3 PUFA imaju utjecaj na staničnu komponentu imunosnog sustava. S obzirom na mali broj istraživanja i pojedine kontradiktornosti, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se konkretiziralo shvaćanje tog djelovanja. Ostaje za dokazati i realnu primjenjivost i isplativost dodavanja n-3 PUFA u obrok mliječnih krava kako bi se regulirao imunosni odgovor.

REFERENCES

1. Bagga D., L. Wang, R. Farias-Eisner, J.A. Glaspy, S.T. Reddy (2003): Differential effects of prostaglandin derived from o-6 and o-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 1751–1756.
2. Berger A., J. B. German, B. L. Chiang, A. A. Ansari, C. L. Keen, M. P. Fletcher, M. R. Gershwin (1993): Influence of feeding unsaturated fats on growth and immune status of mice. *Journal of Nutrition*. 123, 225-233.
3. Blok W.L., M. T. Vogels, J. H. Curfs, W. M. Eling, W. A. Buurman, J. W. M. van der Meer (1992): Dietary fish oil supplementation in experimental gram-negative infection and in cerebral malaria in mice. *Journal of Infectious Diseases* 165, 898-903.
4. Boutard V., B. Fouquery, C. Philippe, J. Perez, L. Baud (1994): Fish oil supplementation and essential fatty acid deficiency reduce nitric oxide synthesis by rat macrophages. *Kidney International* 46, 1200-1286.
5. Calder P. C. (1997): n-3 Polyunsaturated fatty acids and cytokine production in health and disease. *Annals of Nutrition and Metabolism* 41, 203-234.
6. Calder P. C. (1998): n-3 fatty acids and mononuclear phagocyte function, u: *Medicinal Fatty Acids*, Birkhauser, Basel 1–27.
7. Calder P. C. (2007a): Immunomodulation by omega-3 fatty acids. *Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids* 77, 327-335.
8. Calder P. C. (2007b): Polyunsaturated fatty acids alter the rules of engagement. *Future Lipidol.* 2, 27–30.
9. Calder P. C., J. A. Bond, D. J. Harvey, S. Cordon, E. A. Newsholme (1990): Uptake of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. *Biochemical Journal* 269, 807-814.
10. Calder P. C., P. Yaqoob, D. J. Harvey, A. Watts, E. A. Newsholme (1994): The incorporation of fatty acids by lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity. *Biochem. J.* 300, 509–518.
11. Calder P. C., P. Yaqoob, F. Thies, F. A. Wallace, E. A. Miles (2002): Fatty acids and lymphocyte functions. *British Journal of Nutrition* 87, 31-48
12. Caroprese, M., A. Marzano, G. Entrican, S. Wattedgedera, M. Albenzio, A. Sevi (2009): Immune response of cows fed polyunsaturated fatty acids under high ambient temperatures. *J. Dairy Sci.* 92:2796–2803.

13. Chang H. R., D. Arsenijevic, J. C. Pechere, P. F. Piguët, N. Mensi, L. Girardier, A. G. Dulloo (1992): Dietary supplementation with fish oil enhances in vivo synthesis of tumor necrosis factor. *Immunology Letters* 34, 13-18.
14. Cook H.W. (1996): Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes. u: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and membranes* 129-152 Ed. Elsvier, Amsterdam.
15. Elizabeth A., M.C. Calder, P.C. Calder (1998): Modulation of immune function by dietary fatty acids. *Proceedings of Nutrition Society* 57, 277-292.
16. Ertel W., M. H. Morrison, A. Ayala, I. H. Chaudry (1993): Modulation of macrophage membrane phospholipids by n-3 polyunsaturated fatty acids increases interleukin 1 release and prevents suppression of cellular immunity following hemorrhagic shock. *Archives of Surgery* 128, 15-21.
17. Fernandes G., C. Bysani, J. T. Venkatraman, V. Tomar, W. Zhao (1994): Increased TGF- β and decreased oncogene expression by w-3 fatty acids in the spleen delays onset of autoimmune disease in B/W mice. *Journal of Immunology* 152, 5979-5987.
18. Fritsche K. L., N. A. Cassity, S. C. Huang (1991): Effect of dietary fat source on antibody production and lymphocyte proliferation in chickens. *Poultry Sci.* 70, 611-617.
19. Fritsche K. L., N. A. Cassity (1992): Dietary n-3 fatty acids reduce antibody-dependent cell cytotoxicity and alter eicosanoid release by chicken immune cells. *Poultry Sci.* 71, 1646-1657
20. Fritsche K. L., P. V. Johnston (1990): Effect of dietary omega-3 fatty acids on cell-mediated cytotoxic activity in BALB/c mice. *Nutrition Research* 10, 577-588.
21. Fujikawa M., N. Yamashita, K. Yamazaki, E. Sugiyama, H. Suzuki, T. Hamazaki (1992): Eicosapentaenoic acid inhibits antigenpresenting cell function of murine splenocytes. *Immunology* 75, 330-335.
22. Hardardottir I., J. E. Kinsella (1992): Increasing the dietary (n-3) to (n-6) polyunsaturated fatty acid ratio increases tumor necrosis factor production by murine resident peritoneal macrophages without an effect on elicited peritoneal macrophages. *Journal of Nutrition* 122, 1942-1951.
23. Hubbard N. E., R. S. Chapkin, K. L. Erickson (1994): Effect of dietary linseed oil on tumoricidal activity and eicosanoid production in murine macrophages. *Lipids* 29, 651-655.
24. Jeffery N. M., P. Sanderson, E. J. Sherrington, E. A. Newsholme, P. C. Calder (1996): The ratio of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat diet alters serum lipid levels and lymphocyte functions. *Lipids* 31, 737-745.
25. Jolly C. A., Y. H. Jiang, R. S. Chapkin, D. N. McMurray (1997): Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids suppress murine lymphoproliferation, interleukin-2 secretion and the formation of diacylglycerol and ceramide. *Journal of Nutrition* 127, 37- 43.
26. Kew S., T. Banerjee, A.M. Minihane, Y.E. Finnegan, C.M. Williams, P.C. Calder (2003): Relation between the fatty acid composition of peripheral blood mononuclear cells and measures of immune cell function in healthy, free-living subjects aged 25–72 yr. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 1278–1286.
27. Lessard M., N. Gagnon, D. L. Godson, H. V. Petit (2003): Immune Response of Postpartum Dairy Cows Fed Flaxseed. *J. Dairy Sci.* 86, 2647-2657.
28. Lessard M., N. Gagnon, D. L. Godson, H. V. Petit (2004): Influence of Parturition and Diets Enriched in n-3 or n-6 Polyunsaturated Fatty Acids on Immune Response of Dairy Cows During the Transition Period. *J. Dairy Sci.* 87, 2197-2210.
29. Mattos R., C.R. Staples, W.W. Thatcher (2000): Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *Reviews of Reproduction* 5, 38-45

30. Miles E.A., E. Allen, P.C. Calder, (2002): In vitro effects of eicosanoids derived from different 20-carbon fatty acids on production of monocyte-derived cytokines in human whole blood cultures. *Cytokine* 20 ,215–223.
31. Peterson L. D., N. M. Jeffery, F. Thies, P. Sanderson, E. A. Newsholme, P. C. Calder (1998): Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids alter rat spleen leukocyte fatty acid composition and prostaglandin E2 production but have different effects on lymphocyte functions and cell-mediated immunity. *Lipids* 33, 171–180.
32. Poubelle P., J. Stankova, J. Grassi, M. Rola-Pleszczynski (1991): Leukotriene B4 up-regulates IL-6 rather than IL- 1 synthesis in human monocytes. *Agents and Actions* 34, 42-45.
33. Rees D., E. A. Miles, T. Banerjee, S. J. Wells, C. E. Roynette, K. W. J. W. Wahle, P. C. Calder (2006). Dose-related effects of eicosapentaenoic acid on innate immune function in healthy humans: a comparison of young and older men. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 331-342.
34. Renier G., E. Skamene, J. de Sanctis, D. Radzioch (1993): Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids prevent the development of atherosclerotic lesions in mice: Modulation of macrophage secretory activities. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 13, 1515-1524.
35. Sanderson P., P. Yaqoob, P. C. Calder (1995): Effects of dietary lipid manipulation upon rat spleen lymphocyte functions and the expression of lymphocyte surface molecules. *Journal of Nutritional and Environmental Medicine* 5, 119-132.
36. Sanderson P., G. G. MacPherson, C. H. Jenkins P. C. Calder (1997): Dietary fish oil diminishes antigen presentation activity by rat lymphoid dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology* 62, 771-777.
37. Shaikh S. R. , M. Edidin, (2007): Immunosuppressive effects of polyunsaturated fatty acids on antigen presentation by HLA class I molecules, *J. Lipid Res.* 48,127–138.
38. Sherrington E. J., P. Sanderson P. C. Calder (1995): The effect of dietary lipid manipulation on macrophage cell surface molecule expression. *Biochemical Society Transactions* 23, 27-28.
39. Somers S. D., K. L. Erickson (1994): Alteration of tumor necrosis factor- α production by macrophages from mice fed diets high in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Cellular Immunology* 153, 287-297.
40. Tappia P. S., Grimble R. F. (1994): Complex modulation of cytokine induction by endotoxin and tumour necrosis factor from peritoneal macrophages of rats by diets containing fats of different saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acid composition. *Clinical Science* 87, 173-178.
41. Thanasak, J., K. E. Müller, , S. J. Dieleman, , A. Hoek, , J. P. T. M. Noordhuizen, , V. P. M. G. Ruttend, (2005): Effects of polyunsaturated fatty acids on the proliferation of mitogen stimulated bovine peripheral blood mononuclear cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 104, 289–295.
42. Turek J. J., I. A. Schoenlein, L. K. Clark, W. G. van Alstine (1994): Dietary polyunsaturated fatty acids effects on immune cells of the porcine lung. *Journal of Leukocyte Biology* 56, 599-604.
43. Wallace F. A., S. J. Neely, E. A. Miles, P. C. Calder (1998): Dietary fish oil decreases the production of pro-inflammatory mediators by murine macrophages. *Proceedings of the Nutrition Society* 57, 50.
44. Watanabe S., H. Hayashi, K. Onozaki, H. Okuyama (1991): Effect of dietary α -linolenate/linoleate balance on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in mouse macrophages. *Life Sciences* 48, 2013-2020.

45. Wu D., S. N. Meydani, M. Meydani, M. G. Hayek, R. J. Nicolosi (1996): Immunologic effects of marine- and plant-derived n-3 polyunsaturated fatty acids in nonhuman primates. *American Journal of Clinical Nutrition* 63, 273-280.
46. Yaqoob P., E. A. Newsholme, P. C. Calder (1994): The effect of dietary lipid manipulation on rat lymphocyte subsets and proliferation. *Immunology* 82, 603-610.
47. Yaqoob P., P. C. Calder (1995a): The effects of dietary lipid manipulation on the production of murine T-cell-derived cytokines. *Cytokine* 7, 548-553.
48. Yaqoob P., P. C. Calder (1995b): Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cellular Immunology* 163, 120-128.

POLYUNSATURATED FATTY ACID AND IMMUNITY: CELLULAR RESPONSE IN DAIRY COWS

Summary

Immune system is under influence of several essential nutrients, which have the role in sustaining of optimal immunological response. Overfeeding or restrictive nutrition can have detrimental effect upon immune defense and consequently can reduce the effectiveness of animal organism in fighting against pathological microorganisms. One of the essential nutrients is obviously fatty acids. Function of fatty acids is determined by their structure. Mammals have no ability to synthesize n-3 or n-6 fatty acids, so it is essential to introduce them by feed. Fish oil and linseed are best and least expensive sources of n-3 fatty acids available for the animal feeding. Influence of n-3 fatty acids can be determined by monitoring cell component of immune system. Most appropriate way to do this is to monitor lymphocyte proliferation, phagocytosis and production of chemical mediators for immune cell communication. N-3 fatty acids influence on phagocytes is manifested by increased amount of the phagocytosed material. Experiments on dairy cows show that fatty acids do have influence on cell component of immune system. Lymphocyte proliferation is an ability of lymphocyte to divide post stimulation. Proliferative ability of dairy cows lymphocytes incubated in medium supplemented with linoleic acid is reduced compared to that incubated in linolenic acid. Peripheral blood mononuclear cells of cows feed linseed show reduced abilities of proliferation compared to those of cows feed n-6 fatty acid supplements. Similar experiment showed opposite results. N-3 fatty acids influence chemical mediators like eicosanoids, cytokines and nitric oxide. Dairy cow lymphocytes incubated in medium with linoleic acid showed decreased ability for prostaglandin E2 production, but linolenic acid incubation had no effect upon prostaglandin E2 production, while it decreased production of leukotriene B4. Fatty acid influence eicosanoid production and it is known that eicosanoids regulate cytokines production. It is reasonably to conclude that the n-3 fatty acids will influence cytokines production. Experiments on dairy cows show no influence of feeding linseed on TNF- α , IL-1 β or IL-6 production. Serum concentration of IL-10 was lower in dairy cows feed linseed.

Key words: immune system, fatty acids, n-3 PUFA, linseed.

Primljeno: 05.07.2011.