



Središnja medicinska knjižnica

Trtica-Majnarić, Ljiljana (2010) *Uzroci smanjenja imunosne reaktivnosti na cjepivo protiv influence u osoba starijih od pedeset godina. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.*

<http://medlib.mef.hr/757>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ljiljana Trtica–Majnarić

**Uzroci smanjenja imunosne reaktivnosti
na cjepivo protiv influence
u osoba starijih od pedeset godina**

DISERTACIJA

Zagreb, 2010.

Disertacija je izrađena u ambulanti opće/obiteljske medicine autorice studije, dr Ljiljane Trtica-Majnarić, Dom zdravlja Osijek.

Voditelj rada : prof. dr. sc. Branko Vitale

Svrha ovoga rada je ukazati na nove mogućnosti za istraživanje u općoj/obiteljskoj medicini, temeljene na korištenju elektroničkog zapisa medicinskih podataka i konceptu problemski orijentirane medicine. Krajnji rezultat rada, predikcijski matematički model, može u skoroj budućnosti služiti kao pomoć, prije svega liječnicima opće/obiteljske medicine, u izradi planova cijepljenja protiv influence.

Zahvaljujem svima koji su mi omogućili da prikupim i obradim podatke, neophodne za izradu ovoga rada. Posebno zahvaljujem svome voditelju prof.dr.sc.Branku Vitaleu, na dosljednosti i ustrajnoj podršci, kao i svome suprugu Antonu (Draženu), na nesebičnom razumijevanju.

UVOD	1
1. CIJEPLJENJE (VAKCINACIJA)	1
2. TEORIJE STARENJA	8
3. STARENJE IMUNOSNOG SUSTAVA	13
3.1. Promjene u sustavu T-limfocita	13
3.2. Promjene u sustavu B-limfocita	16
3.3. Promjene u sustavu nespecifične imunosti	18
HIPOTEZA I CILJEVI	19
1. Formuliranje hipoteze	19
2. Hipoteza	19
3. Specifični ciljevi	20
ISPITANICI I METODE	21
1. Ispitanici	21
2. Cijepljenje	22
3. Ispitivani parametri zdravstvenog stanja - baza podataka	22
3.1. Dijagnoze najčešćih skupina kroničnih bolesti	23
3.2. Antropometrijske mjere	24
3.3. Hematološke i biokemijske pretrage	24
4. Protokol ispitivanja	26
5. Laboratorijske metode	28
5.1. Serološka testiranja - metoda za dokazivanje specifičnih protutijela na površinske antigene virusa influence	28
5.2. Hematološke i biokemijske pretrage	28
6. Metode analize podataka	29
6.1. Mjere učinkovitosti cijepljenja protiv influence	29
6.2. Analiza podataka klasičnim statističkim metodama	30
6.3. Metode strojnog (induktivnog) učenja	30
6.4. Algoritmi ILLM sustava	31
6.5. Identifikacija značajnih parametara zdravstvenog stanja primjenom algoritama ILLM sustava na bazu podataka	31
6.6. Opis kriterija za podjelu ispitanika u klase	32
6.7. Dodatni klasifikacijski postupci - definiranje patogenetskih poremećaja i kliničkih stanja	33
6.8. Početna baza znanja	34

REZULTATI	36
I. UTJECAJ ANTIGENSKOG ISKUSTVA I DOBI NA UČINKOVITOST CIJEPLJENJA	36
1. Utjecaj antigenskog iskustva (broja prethodnih cijepljenja i visine ostatnog titra protutijela) na učinkovitost cijepljenja	36
2. Utjecaj (starije) dobi na učinkovitost cijepljenja	40
II. UTJECAJ KRONIČNIH BOLESTI I PATOGENETSKIH POREMEĆAJA NA UČINKOVITOST CIJEPLJENJA	42
1. Parametri zdravstvenog stanja dobiveni iz baze podataka metodom induktivnog učenja	42
2. Definiranje patogenetskih poremećaja i kliničkih stanja pomoću dodatnih klasifikacijskih postupaka, primijenjenih za pojedine od selekcioniranih parametara	47
III. ZAJEDNIČKI UTJECAJ DOBI, PRETHODNOG ANTIGENSKOG ISKUSTVA I POREMEĆAJA ZDRAVSTVENOG STANJA NA UČINKOVITOST CIJEPLJENJA	57
RASPRAVA	60
I. UVOD	60
II. UTJECAJ ANTIGENSKOG ISKUSTVA I DOBI NA UČINKOVITOST CIJEPLJENJA	61
1. Utjecaj antigenskog iskustva (broja prethodnih cijepljenja i visine ostatnog titra protutijela) na učinkovitost cijepljenja	61
2. Utjecaj (starije) dobi na učinkovitost cijepljenja protiv influence	65
III. UTJECAJ KRONIČNIH BOLESTI I PATOGENETSKIH POREMEĆAJA NA UČINKOVITOST CIJEPLJENJA	67
1. Dobiveni značajni parametri zdravstvenog stanja	67
2. Klinička stanja i patogenetski poremećaji koji mogu utjecati na serološki odgovor nakon cijepljenja	68
2.1. Pomicanje ravnoteže imunosnog odgovora	68
2.2. Deficit vitamina B ₁₂ , hiperhomocisteinemija	69
2.2.1. Uvod	69
2.2.2. Utjecaj deficita vitamina B ₁₂ i hiperhomocisteinemije na funkciju imunosnog sustava	70
2.3. Blaga kronična upala, proteinska malnutricija, kronična imunizacija	73
2.3.1. Blaga kronična upala	73
2.3.2. Proteinska malnutricija	74
2.3.3. Kronična imunizacija	75
2.4. Hipofunkcija hormona štitne žlijezde (hipotireoza)	75
2.4.1. Disfunkcija neuroendokrine osovine hipotalamus – hipofiza – štitna žlijezda	77
2.5. Kronična bubrežna insuficijencija	78
2.5.1. Uvod	78

2.5.2. Sindrom upale, malnutricije i inzulinske rezistencije, u osoba s kroničnom bubrežnom insuficijencijom	78
2.5.3. Neuroendokrine promjene koje prate kroničnu bubrežnu insuficijenciju	79
2.6. Kronični gastritis uzrokovan infekcijom bakterijom <i>Helicobacter pylori</i>	80
2.6.1. Uvod	80
2.6.2. Mehanizam utjecaja na imunosnu reaktivnost : deficit vitamina B ₁₂ i folne kiseline , proteinska malnutricija	81
2.6.3. Mehanizam utjecaja na imunosnu reaktivnost: upala, kronična imunizacija, autoimuna reakcija, limfopenija	81
2.6.4. Mehanizam utjecaja na imunosnu reaktivnost: neravnoteža imunosne reakcije s oslabljenim imunosnim odgovorom humoralnog tipa	82
2.6.5. Mehanizam utjecaja na imunosnu reaktivnost: povezanost kroničnog gastritisa s primarnom hipotireozom	83
2.7. Mentalni i neurodegenerativni poremećaji praćeni hiperprolaktinemijom	83
2.7.1. Uvod	83
2.7.2. Povezanost neuropsihijatrijskih i neurodegenerativnih bolesti u osoba starije dobi	85
2.7.3. Povezanost kronične bubrežne insuficijencije s hiperprolaktinemijom i neuropsihijatrijskim bolestima	86
2.7.4. Povezanost neuropsihijatrijskih bolesti s kroničnim gastritisom uzrokovanim infekcijom bakterijom <i>Helicobacter pylori</i>	87
2.8. Starija dob	87
IV. ZAJEDNIČKI UTJECAJ DOBI, PRETHODNOG ANTIGENSKOG ISKUSTVA I POREMEĆAJA ZDRAVSTVENOG STANJA NA UČINKOVITOST CIJEPLJENJA	89
ZAKLJUČCI	93
SAŽETAK	96
ABSTRACT	100
POPIS LITERATURE	104

UVOD

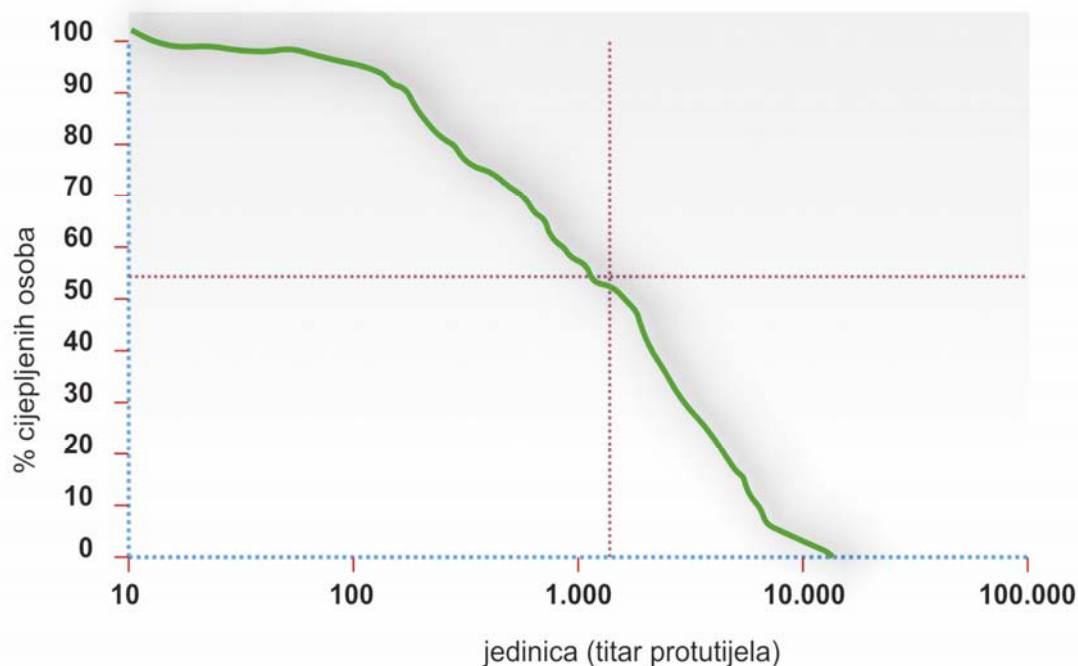
1. CIJEPLJENJE (VAKCINACIJA)

Cijepljenje je medicinski postupak kojim se indukcijom modificiranog specifičnog imunskog odgovora na unijete mikrobnne antigene u cjepivu može spriječiti pojava neke infektivne bolesti (1,2,3). Zaštitni učinak cijepljenja se zasniva na sposobnosti mikrobnih antigena u cjepivu da induciraju ekspanziju specifičnog klona T i/ili B limfocita i tako, oponašanjem primarnog imunskog odgovora, razviju imunsku memoriju, a time i otpornost cijepljene osobe pri ponovnom susretu s istim antigenom (1,4).

Naziv toga postupka potiče od naziva virusa vakcinije (virus kravljih boginja), uzročnika bolesti kravljih boginja. Naime, prije više od 200 godina, Edward Jenner je na temelju povijesnog iskustva prvi uspio zaštititi ljude od infekcije virusom velikih boginja i to skarifikacijom sadržaja pustula bolesnih krava (1). Utemeljiteljem znanstvene primjene vakcinacije u medicinskoj praksi se međutim smatra Louis Pasteur koji je u 19. stoljeću pokazao da se cjepivom koje sadrži modificirani oblik mikroorganizma, uzročnika zarazne bolesti u ljudi, može potaknuti imunosna reakcija na nativni, virulentni soj toga mikroorganizma, a time postići i zaštita od infekcije (1).

Temelj učinkovitosti cjepiva (*efficacy*) je produkcija specifičnih protutijela u serumu na antigenske komponente cjepiva u koncentraciji koja u slučaju infekcije može neutralizirati virulentni soj toga mikroorganizma (5) (slika 1).

Naime, pri izradi cjepiva je potrebno zadovoljiti dva oprečna zahtijeva - smanjiti virulenciju specifičnog mikroorganizma u cjepivu i time onemogućiti nastanak klinički manifestne bolesti, s tim da modificirani mikroorganizam zadrži svoja antigenska svojstva kako bi u primaocu mogao inducirati specifični imunosni odgovor (2,3).



Slika 1. "Korelat zaštite" - mjera učinkovitosti cijepljenja

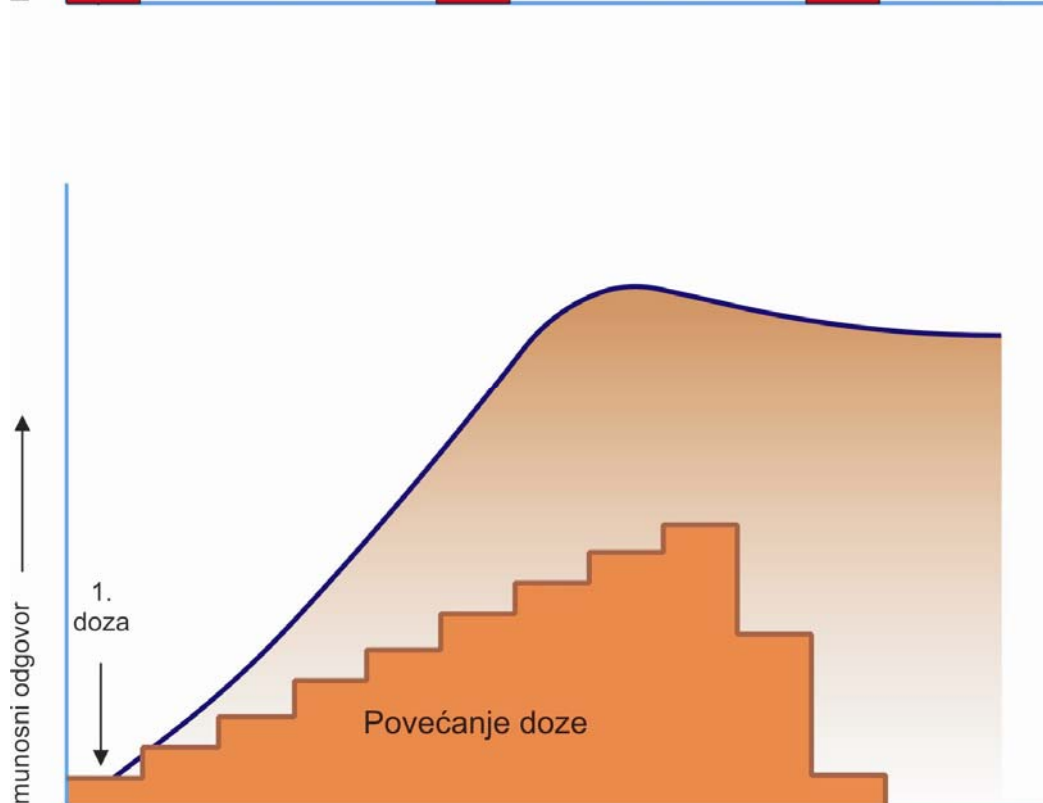
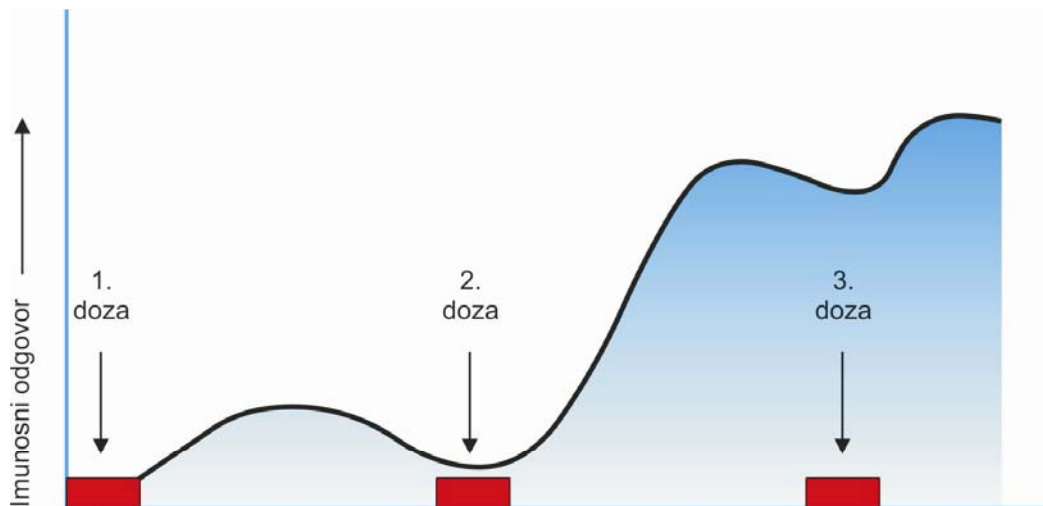
Modificirano prema časopisu "Pediatric Infectious Disease Journal", Vol.20, 2001.

Više od 50% cijepjenjih osoba ima zaštitni titar >1200 jedinica (enzimski imuno-esej) unutar jedne godine od cijepljenja.

Iz tih razloga, sva suvremena cjepiva su koncipirana tako da sadrže ili žive atenuirane mikroorganizme (infektivni replikativni oblik), ili mrtve inaktivirane mikroorganizme (neinfektivni oblik), ili sastavne dijelove razloženog mikroorganizma, ili samo neke antigenske determinante molekule antigena (2,3).

Živa atenuirana cjepiva su općenito učinkovitija od mrtvih inaktiviranih, posebno u indukciji stanične i mukozne imunosti. Ta cjepiva se primjenjuju lokalno u sluznicama, gdje se i patogeni mikroorganizmi repliciraju, te na taj način oponašaju prirodni put infekcije. Za razliku od tih cjepiva, mrtva inaktivirana cjepiva se primjenjuju sustavno, a prihvatljiv stupanj zaštite se obično postiže tek višekratnim ubrizgavanjem cjepiva (1,2,3) (slika 2).

Zahvaljujući brzom napretku tehnologije proizvodnje cjepiva, cijepljenje je danas postalo jedan od najuspješnijih načina kontrole širenja mnogih zaraznih bolesti. Masovna primjena cjepiva protiv različitih zaraznih bolesti je spasila milijune života u cijelom svijetu i omogućila eradicaciju nekih teških zaraznih bolesti (1,2,3).



Slika 2 Primarna i sekundarna humoralna imunostna reakcija

Modificirano prema knjizi "MIMS' pathogenesis of Infectious disease", ed. Academic Press, San Diego, SAD, 2001.

(Gore) na topljive antigene, ili cjeviva s mrtvim mikroorganizmima
 (Dolje) U slučaju prirodne infekcije, ili cjeviva s živim atenuiranim mikroorganizmima.

Zbog kompleksne organizacije i redundancije homeostatskih regulacijskih mehanizama u imunom sustavu, uključujući i brojne efektorske mehanizme, očekivalo bi se da se cijepljenjem mogu inducirati različiti oblici zaštite koji djeluju sinergistički. Međutim, produkcija serumskih protutijela je za većinu danas komercijalno dostupnih cjepiva jedini mjerljivi oblik imunskog odgovora.

Za to postoje dva razloga. Prvi je taj što su ta cjepiva usmjerena na zaštitu od onih infektivnih bolesti u čijoj patogenezi je ključna intravaskularna faza infekcije. Drugi razlog je oblik cjepiva koji se najčešće primijenjuje, a to su inaktivirana, fragmentirana cjepiva koja sadrže samo površinske antigenske determinante uzročnog mikroorganizma (5).

Zbog takvog oblika imunskog odgovora na cjepiva, serumska koncentracija (titar) protutijela nakon cijepljenja se smatra i mjerom ostvarenog stupnja zaštite (*correlate of protection*) (5). Poznavanje i definiranje imunskih korelata zaštite je potrebno, ne samo zbog boljeg razumijevanja prirodnog tijeka neke infektivne bolesti, nego i zbog toga što to omogućuje razvoj i primjenu cjepiva u praksi. Naime, pojam „korelat zaštite“ je usko povezan s pojmom učinkovitosti cjepiva, a definiran je kao ona koncentracija protutijela iznad koje je većina cijepljene populacije zaštićena od pojave neke infektivne bolesti (5) (slika 1).

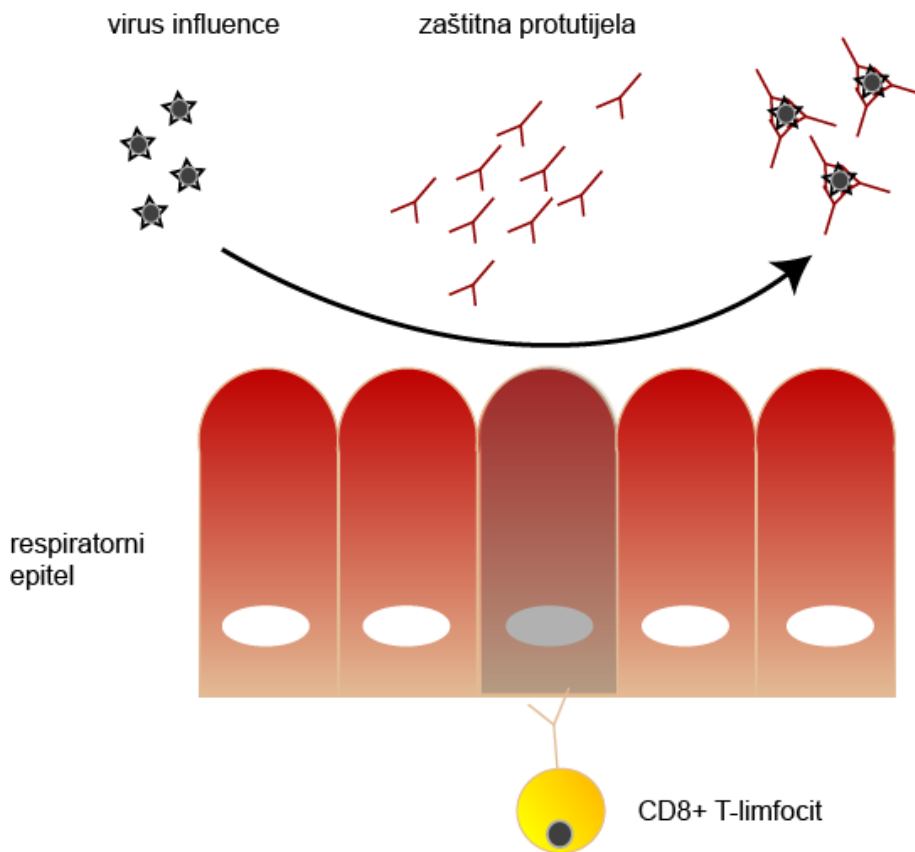
Preduvjet za definiranje seroloških korelata zaštite je postojanje laboratorijskog testa kojim se serumska koncentracija zaštitnih protutijela može i egzaktno mjeriti (5).

Uzročnik influence je segmentirani RNA virus, jedinstven po svojoj sposobnosti da se kontinuirano preobražava u nove antigenske varijante virusa tipa A i B. Do toga dolazi zbog čestih točkastih mutacija u genima za površinske glikoproteine virusa - hemaglutinin i neuraminidazu. Time virusi influence izbjegavaju zaštitne mehanizme domaćina, čime se ostvaruju osnovni preduvjeti za njihovo preživljavanje u domaćinu, a time i za izbijanje sezonskih epidemija influence (*antigenic drift*) (6).

Virus influence tipa A ima i tu osobinu da se može iznenada potpuno genetski promijeniti (*antigenic shift*). Zbog toga u slučaju kada većina osoba u nekoj populaciji nema specifičnih zaštitnih protutijela za tu novu varijantu virusa, može doći do izbijanja epidemija influence svjetskih razmjera (pandemija) (6).

Zbog svega toga, razvijanje i/ili očuvanje otpornosti na virus influence predstavlja stalni izazov, kako za imunski sustav čovjeka, tako i za službe javnog zdravstva.

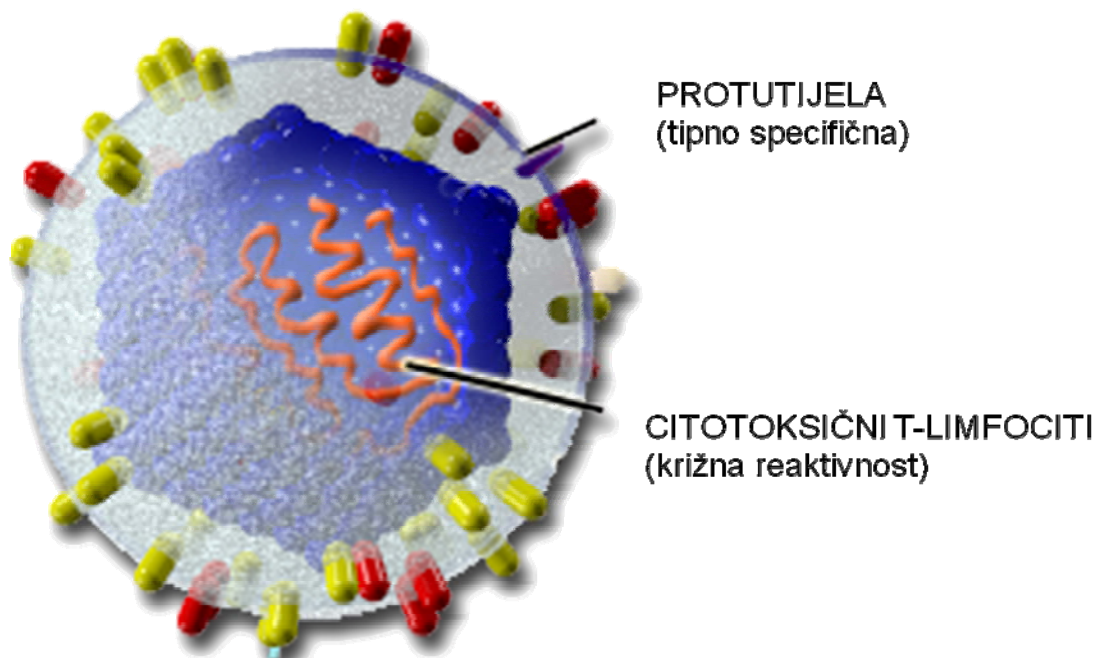
Imunosna zaštita od infekcije virusom influence se odvija najvećim dijelom neutralizacijom slobodnog virusa specifičnim protutijelima, usmjerenim na njegove površinske antigene hemaglutinin i neuraminidazu. Pri tome su u zaštiti sluznice respiratornog trakta važna IgA protutijela, dok u fazi viremije ključnu zaštitnu ulogu imaju serumska IgG protutijela (6,7).



Slika 3. Imunosna reakcija na infekciju virusom influence
Humoralni i stanični specifični imunosni odgovor

Makrofagi, NK stanice i citotoksični T-limfociti također sudjeluju u obrani od infekcije i to eliminacijom virusom zaraženih epitelnih stanica respiratornog trakta (6,7,8) (slika 3). Važnu ulogu u tome imaju i interferoni tipa I. i II. koji nespecifično inhibiraju intracelularnu replikaciju virusa, a utječu i na tijek specifične imunosne reakcije (9).

Za razliku od protuvirusnih protutijela, citotoksični T-limfociti prepoznaju konzervirane antigenske determinante peptida unutar virusne čestice, zaštićene od vanjskog okoliša i koje ne podliježu mutacijama. Zbog toga će primarna infekcija bilo kojom varijantom virusa influence tipa A omogućiti zaštitu posredovanu citotoksičnim T-limfocitima (stanični tip specifične imunosti) u slučaju svake naredne infekcije, bez obzira na genetsku varijantu virusa, uzročnika neke buduće infekcije (križna reaktivnost). Iz istih razloga, za vrijeme pandemije influence, širenje infekcije, kao i težina kliničke slike bolesti u pojedinim osoba, ovisit će najviše o njihovim mehanizmima stanične imunosti (6,7) (slika 4).



Slika 4. Ciljni antigeni u humoralnoj i staničnoj specifičnoj imunskoj reakciji na virus influence. Specifična protutijela su usmjerena na površinske, promjenljive antigenske determinante virusa influence. Citotoksični T-limfociti su usmjereni na unutrašnje, konzervirane antigenske determinante virusa influence.

Trenutno se najboljim načinom prevencije influence smatra cijepljenje mrtvim inaktiviranim trokomponentnim cjepivom koje sadrži podtipove H₁N₁ i H₃N₂ virusa influence tipa A i virus influence tipa B (6,10). Taj postupak zahtijeva da se svake

godine prije izbijanja epidemije influence korigira sastav cjepiva, ovisno o očekivanim promjenama cirkulirajućeg virusa influence. Naime, cijepljenje je učinkovito samo kada su komponente cjepiva antigenski vrlo slične epidemijskom tipu virusa (*matching*) (10,11,12). Međutim, to je i razlog zbog kojega u kronično imuniziranih osoba može doći do smanjenja učinkovitosti cijepjenja i to u slučaju kada je komponenta primijenjenog cjepiva antigenski vrlo slična komponenti iz nekog od prethodnih sastava cjepiva (heterologna reakcija) (11,12).

Naime, brojne serološke studije ukazuju da je porast titra protutijela nakon cijepjenja manji u osoba koje su prethodno cijepljene, nego u osoba koje se cijepi prvi put. To se tumači većim ostatnim titrom protutijela i njegovim inhibicijskim učinkom na produkciju novih protutijela. Zbog toga je porast titra protutijela poslije cijepjenja u pravilu obrnuto (linearno) proporcionalan s visinom titra protutijela prije cijepjenja (ostatnog titra) (13,14). Nadalje, pokazalo se da je važan i broj cijepjenja (imunizacija), jer je pri istoj visini ostatnog titra protutijela porast titra nakon ponovljenih cijepjenja manji, nego nakon prvog cijepjenja (14). Naime, ostatni titar nakon ponovljenih cijepjenja sadrži mješavinu protutijela različite specifičnosti i afiniteta od kojih neka mogu križno reagirati na virusne antigene u cjepivu i tako umanjiti njihov antigenski potencijal, a time i indukciju imunosnog odgovora na cjepivo (14).

Na visinu titra protutijela nakon cijepjenja mogu utjecati i drugi čimbenici i to: antigeničnost komponenti cjepiva, antigensko iskustvo primarne imunosne reakcije, stečeno infekcijama virusom influence u djetinjstvu (*original antigenic sin*), te dob i zdravstveno stanje cijepljenih osoba (6,12,15,16,17).

Samo 30-50% starijih osoba, u odnosu na 65-80% mlađih, je cijepljenjem zaštićeno od pojave influence, što je posljedica smanjene sposobnosti starijih osoba da produciraju specifična protutijela (15,18,19,20). Naime, analize su pokazale da se zaštitna visina titra protutijela nakon cijepjenja protiv influence može naći u svega 40-60% starijih osoba, dok je u mlađih osoba taj postotak znantno veći i iznosi 70-90% (21,22).

Međutim, do razvoja influence u starijih osoba može doći i pri vrlo visokim vrijednostima titra protutijela, što se objašnjava slabijim afinitetom produciranih protutijela za površinske antigene virusa influence (6,15,23).

Iz tih razloga se razmišlja da se u starijih osoba, osim standardnih seroloških, uvedu i stanični korelati zaštite. Naime, pokazalo se da *in vitro* stanični imunosni odgovor na virus influence (mjeren stupnjem proliferacije ili citotoksične aktivnosti limfocita) dobro korelira sa zaštitom koja se postiže cijepljenjem (6,7,24).

Pošto je uloga citotoksičnih T-limfocita eliminacija virusom zaraženih epitelnih stanica sluznice respiratornog trakta, taj oblik imunosti je posebno značajan u sprečavanju nastanka upale pluća i drugih komplikacija od influence kojima su starije osobe sklone (22). Međutim, cjepiva protiv influence koja se danas najčešće koriste (mrtva, cjelostanična ili fragmentirana) slabo induciraju stanični specifični imunosni odgovor (25). Zbog toga protektivni učinak cijepljenja u starijih osoba, kao i njihova prognoza pri obolijevanju od influence, u velikoj mjeri ovise o tome kakva im je stanična specifična imunosna memorija (7).

Naime, u mlađih osoba, produkciju specifičnih protutijela prati i odgovarajući razvoj stanične specifične imunosti pa je samo serološko testiranje dovoljno da se zaključi i o jačini staničnog imunosnog odgovora. Suprotno tome, zbog poremećaja u regulaciji imunosne reakcije, humoralni imunosni odgovor u starijih osoba ne mora biti proporcionalan jačini staničnog imunosnog odgovora (7). Zbog toga se, s obzirom na način imunosnog reagiranja, u populaciji starijih osoba može očekivati izvjesna heterogenost. To znači da se nakon cijepljenja mogu identificirati osobe s dobrim humoralnim imunosnim odgovorom, ali bez istovremenog povećanja aktivnosti T-limfocita. I obrnuto, osobe s dobrim staničnim imunosnim odgovorom, ne moraju razviti i optimalan humoralni imunosni odgovor (7,24,26).

Kojim će dominantnim tipom imunosnog odgovora nakon cijepljenja protiv influence neka starija osoba reagirati, osim o tipu virusa influence sadržanog u cjepivu - ovisi i o njenom zdravstvenom stanju, kao i prethodnom antigenskom iskustvu (24).

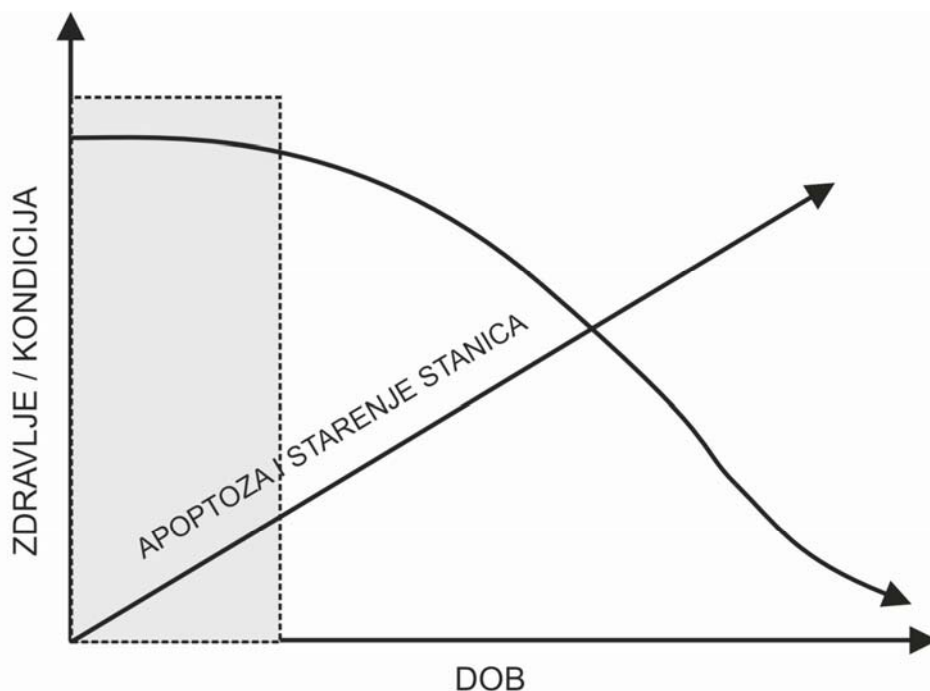
2. TEORIJE STARENJA

Starenje u ljudi započinje završetkom reproduktivne faze života, a opisuje se kao progresivno slabljenje fizioloških funkcija i fizičke izdržljivosti tijela (27). Starenje podrazumijeva promjene organizma na svim njegovim razinama, u širokom rasponu od molekularne i stanične pa do fenotipskih značajki tijela (28,29).

Osim učestalije pojave brojnih kroničnih bolesti, starije osobe i slabije reagiraju na cjepiva, te češće dobivaju infekcije koje su i težeg tijeka, nego u mlađih osoba (27).

Prema programskim (razvojno - genetskim) teorijama, starenje je pasivna posljedica realizacije genetskog programa, zadanog u genima zametne loze (27,30,31). Te teorije pretpostavljaju da je dužina životnog vijeka genetski kontrolirana, što se međutim ne poklapa s brojnim zapažanjima o utjecaju čimbenika okoliša i stila života na proces starenja i pojavu bolesti starenja (27,28,29).

Glavna idejna postavka stohastičkih (fenomenoloških) teorija starenja je da su promjene u organizmu tijekom starenja posljedica nakupljanja slučajno nastalih pogrešaka u somatskim stanicama. Radi se o brojnim strukturnim i funkcionalnim promjenama na genetskoj i epigenetskoj razini do kojih dolazi - jednostavno rečeno - uslijed „trošenja“ organskog materijala tijekom vremena (*wear and tear*) (27,28,29). Sve te promjene mogu dovesti do poremećaja u temeljnim mehanizmima održavanja homeostaze stanica, kao što su apoptoza (programirana smrt stanica) i proliferacija (32) (slika 5).



Slika 5. Apoptoza i starenje stanica

Modificirano prema časopisu "Experimental Gerontology", Vol. 38, 2003.

U mladosti je to pozitivan homeostatski mehanizam kojim se odstranjuju oštećene i disfunkcionalne stanice.

Kako ti procesi, sa starenjem, napreduju, prelaze granicu iznad koje postaju štetni i dovode do smanjenja funkcionalne sposobnosti tkiva.

Starenje bi prema tome bilo posljedica stohastičkih procesa koji se odvijaju unutar stanica i tkiva, a malo je vjerojatno da bi za to mogli biti odgovorni geni zametne loze (27,28,29,32).

Danas najpopularnija teorija starenja je teorija slobodnih radikala ili oksidacijskog stresa prema kojoj reaktivni kisikovi spojevi, normalni produkti aerobnog metabolizma, putem oksidacijske modifikacije makromolekula, osobito proteina i lipoproteina, dovode do sve većeg slabljenja funkcionalne sposobnosti tkiva. Osim toga, pojačan oksidacijski stres može uzrokovati i aktivaciju nekih važnih gena uključenih u patogenezu bolesti starenja, kao što su geni odgovorni za odvijanje staničnog ciklusa i nastanak upale (27,33,34).

U skladu s novijim spoznajama da su manifestacije starenja odraz interakcije brojnih gena, čimbenika okoliša i životnih navika, novije teorije starenja, kao što su „teorija mreže“, te iz nje proizašla „teorija remodeliranja“ - ističu kompleksnu i visoko integriranu strukturu ljudskog organizma (35,36).

Prema tim teorijama, brojne manifestacije starenja, kao i razlike u dužini trajanja života između pojedinih osoba, mogu se objasniti razlikama u efikasnosti homeostatske mreže obrambenih mehanizama. To bi bili svi mehanizmi - od onih na molekularnoj i staničnoj razini, kao što su popravak oštećenja molekula DNA, neutralizacija slobodnih radikala, ili apoptoza - pa sve do glavnih kontrolnih sustava tijela, kao što su imunosni i neuroendokrini, te metabolizam ovisan o inzulinu (36).

Promjene imunosnih parametara koje se mogu zapaziti u osoba starije dobi, uz metaboličke promjene u obliku inzulinske rezistencije (otpornosti perifernih tkiva na metaboličko djelovanje inzulina), te brojne hormonalne promjene, bile bi, prema toj skupini teorija, posljedica nedovoljne adaptacije glavnih kontrolnih sustava na nepovoljne uvijete okoliša tijekom života (36,37,38,39).

Ti sustavi i utječu jedan na drugoga putem brojnih interaktivnih veza, što također doprinosi njihovom adaptacijskom remodeliranju (36). Odraslih svih tih promjena je kronična upala slabog inteziteta koja se ujedno smatra i osnovnim pokretačem razvoja bolesti starenja, kao što su arterioskleroza, rak, dijabetes, demencija, depresija, osteoporoza i osteoartritis (40,41).

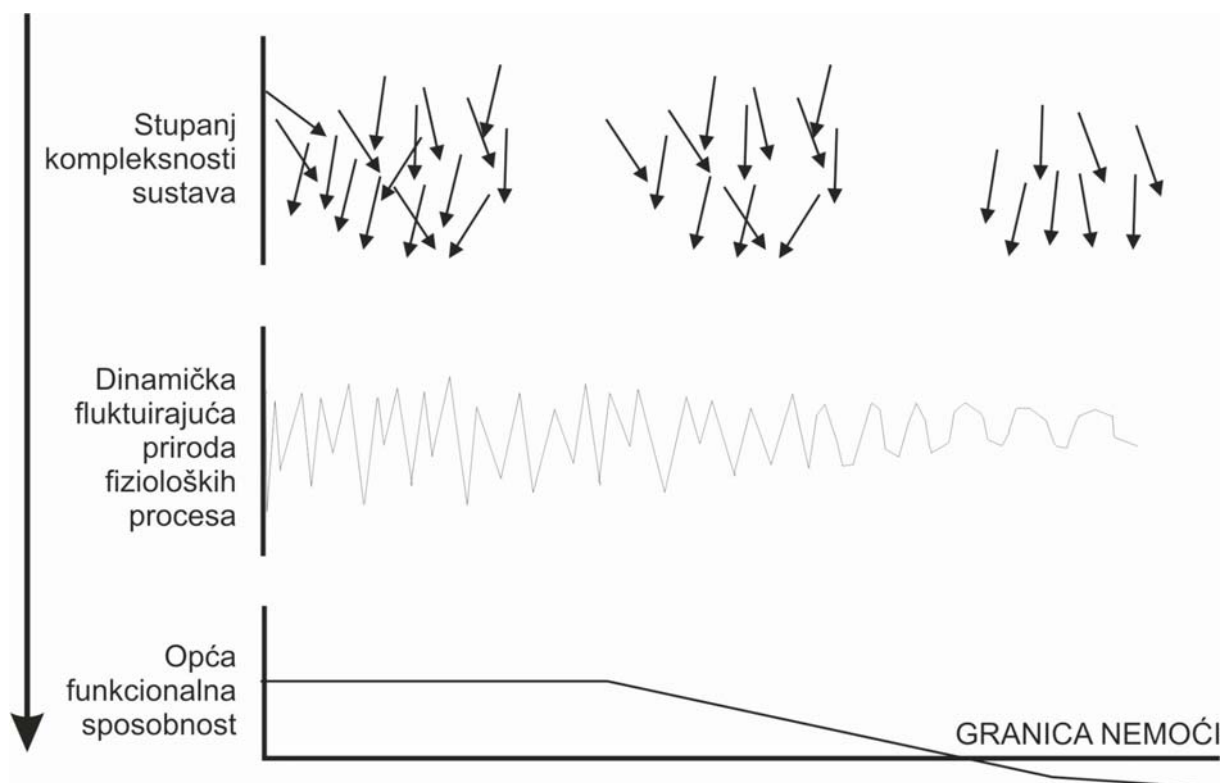
Te teorije starenja su pomogle da se promovira danas opće prihvaćena ideja da je ekspresija gena u somatskim stanicama ključni mehanizam pomoću kojega se

podražaji iz okoliša integriraju s onima iz unutrašnjosti organizma. To pokreće lanac događaja koji u krajnjoj liniji može dovesti do pojave raka i drugih bolesti starenja (33, 42,43).

Biološki entiteti se danas sve više proučavaju kao kompleksni multikomponentni sustavi čije komponente uzajamno utječu jedna na drugu u mreži interakcija, što sustavu daje visoko integriranu strukturu (44,45). Značajke sustava se razlikuju od značajki njegovih pojedinačnih komponenti, jer su nastale kao rezultat interakcija tih komponenti. Zbog toga, da bi se razumjelo ponašanje sustava, sustav se ne može proučavati na način da se proučavaju njegove pojedinačne komponente. Sustav se, drugim riječima, ne može reducirati (46).

Takav način organizacije sustava podrazumijeva nelinearnost interakcija. To je razlog zbog kojega se biološki sustavi, za razliku od inertnih (fizikalnih, neživih) kompleksnih sustava, kontinuirano mijenjaju. Na to ih potiču unutrašnji (stohastički) procesi. Osim negativnih *feed-back* interakcija koje pomažu vraćanje sustava u prvobitno stanje, postoje i pozitivne, samopojačavajuće reakcije. Takve reakcije mogu od neznatnih, nevidljivih promjena ravnoteže sustava, lančanim putem dovesti do velikih, vidljivih promjena ponašanja sustava u cjelini. To sustavu daje posebnu značajku - ovisnost o početnom stanju. To drugim riječima znači da je za procjenu ponašanja nekog sustava važno u obzir uzeti i stupanj već nastalih promjena u fiziološkim procesima, kao što je na primjer trenutno zdravstveno stanje čovjeka (46,47).

Kompleksni biološki sustavi imaju još jednu važnu značajku. To je pojava da patogenetski procesi koji se odvijaju lokalno, u tkivima, kao što su upala i produkcija oksidacijskih radikala, čine ujedno i mehanizme samoregulacije, odgovorne za kontrolu ekspresije gena i sintezu proteina u somatskim stanicama (42,46). Ti mehanizmi se smatraju odgovornim za slijed događaja koji s vremenom može dovesti do razvoja raka i drugih bolesti starenja (42,46,48).



Slika 6. Proces starenja u kontekstu teorije kompleksnih sustava

Modificirano prema časopisu "Journal of Gerontology", Vol.57, 2002.

Kako se smanjuje broj interakcija između komponenti sustava (stupanj kompleksnosti) - fiziološki procesi gube svoju fluktuirajuću iregularnu dinamiku i postaju periodični.

Paralelno s tim, smanjuje se opća funkcionalna sposobnost tijela, sve do granice nemoći.

S aspekta teorije kompleksnih sustava, bolest ili starenje nekog biološkog sustava se smatra posljedicom smanjenja stupnja kompleksnosti toga sustava, a time i odrazom dinamike cijelog tijela (46,47).

Radi se o postepenom smanjenju kompleksnosti interaktivne mreže bioloških procesa, uslijed čega nastaju pojednostavljeni, manje kompleksni oblici fiziološkog reagiranja. To rezultira smanjenjenim stupnjem ukupnog adaptacijskog kapaciteta, slabljenjem opće funkcionalne sposobnosti, te progresivnim razvojem nemoći tijela (46) (slika 6).

S druge strane, zbog postojanja interaktivnih veza, moguće je da se jedna oslabljena funkcija, alternativnim putevima odvijanja bioloških procesa - kompenzira jačanjem drugih funkcija (46). Na razini populacije, te nastale promjene unutar bioloških

sustava se manifestiraju disperzijom fenotipova, tj. sve većom raznolikošću oblika reagiranja, što je povezano s češćom pojavom bolesti starenja (47).

Takvo shvaćanje nastanka bolesti i starenja, skupa s naglim razvojem molekularne biologije i informacijskih tehnologija, je omogućilo i razvoj novog znanstveno-metodološkog pristupa u biomedicini, nazvanog sustavno-biološki pristup (48). Predmet interesa takvog pristupa je proučavanje kompleksnih interakcija u biološkim sustavima. Zbog toga u analizu ulaze sve, a ne samo neke komponente sustava (49,50). Sustav se opisuje velikim brojem podataka (bazama podataka) koje je moguće analizirati jedino sofisticiranim metodama strojnog učenja (51,52).

Jednostavno rečeno, dok teorija kompleksnih sustava konstatira da svojstva sustava proizlaze iz ukupnosti interakcija njegovih komponenti, sustavno-biološkim metodološkim pristupom se nastoji kvantitativnim mjerenjima obuhvatiti sve komponente sustava i integracijom podataka pomoću matematičkih modela formirati zaključke o ponašanju sustava kao cjeline (50).

3. STARENJE IMUNOSNOG SUSTAVA

Starenje imunosnog sustava (*immunosenescence*) se ranije opisivalo kao slabljenje imunskih funkcija u starijih osoba. Međutim, pod utjecajem novijih teorija starenja, sada se smatra da to nije jednostavno smanjenje imunskih reaktivnosti, već se radi o kompleksnom procesu restrukturiranja imunosnog sustava. To uključuje, kako strukturne promjene limfatičnog tkiva i promjene u veličini pojedinih limfocitnih populacija, tako i kvalitativne promjene imunskih funkcija, te kompenzacijske mehanizme kojima je cilj očuvanje homeostaze imunosnog sustava (53). Sve te promjene nastaju kao zbirna posljedica čestih i dugotrajnih reakcija na antigene iz okoliša, starenja imunskih stanica, te interakcija imunskih stanica s mikrookolišem (37,54,55,56).

3.1. Promjene u sustavu T-limfocita

Posebno su značajne promjene koje nastaju u sustavu T-limfocita, zbog toga što se te promjene ne odražavaju samo na poremećaje stanične, već i humoralne imunosti, kao i na funkcioniranje nespecifičnog imunosnog sustava (54,55,57).

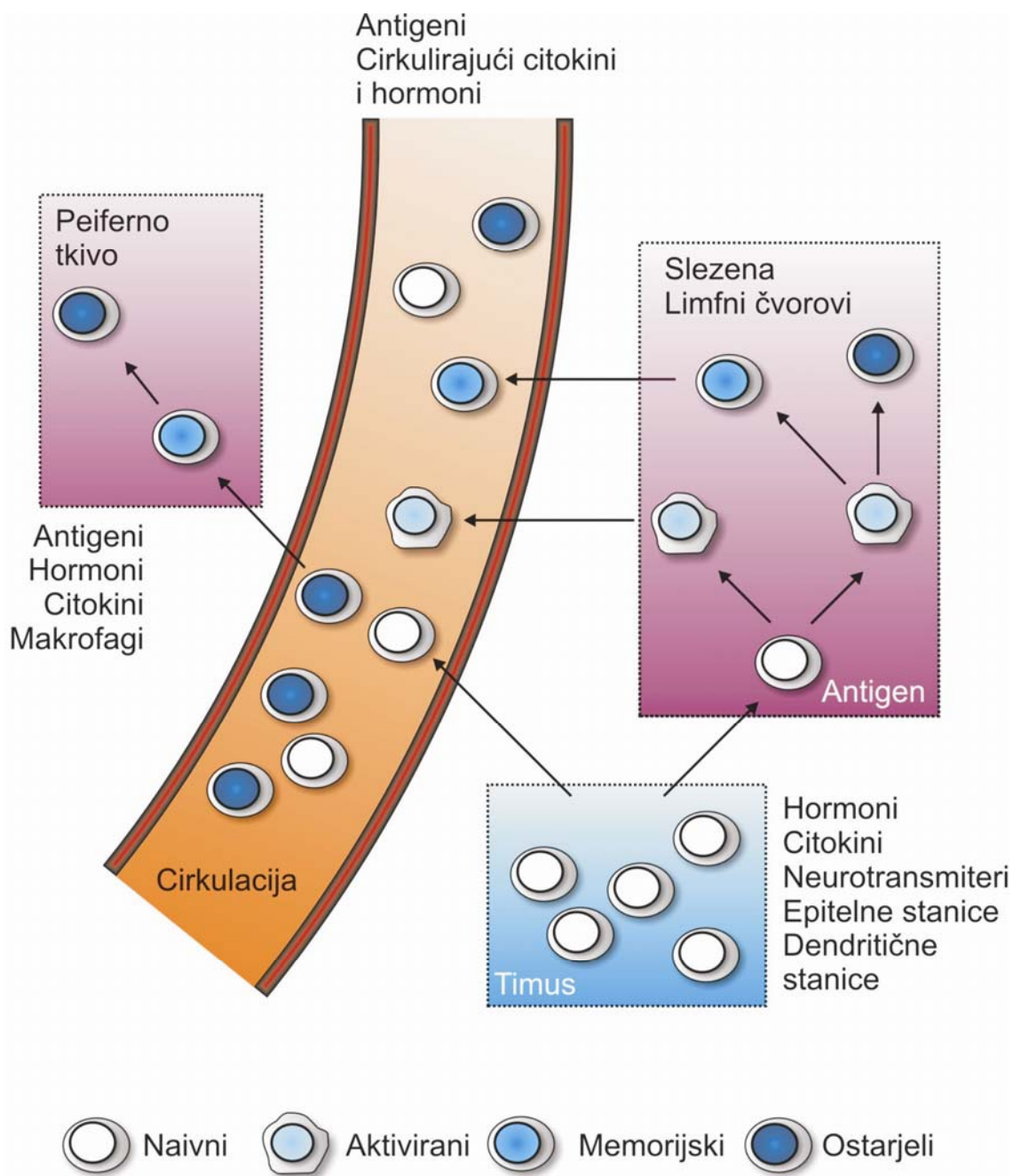
Do promjena u sustavu T-limfocita dolazi prije svega zbog smanjene produkcije novih klonova naivnih T-limfocita iz involutivno promijenjenog timusa. Ne manje važan

razlog je i iscrpljenje proliferacijske sposobnosti pojedinih klonova T-limfocita kroničnom antigenskom stimulacijom (*replicative senescence*), te starenje imunskih stanica koje nemaju sposobnost diobe (*cell senescence*), a to su u glavnom naivni T-limfociti (55,56,57,58) (slika 7).

Svim tim mehanizmima se progresivno sužava i modificira repertoar specifičnosti receptora T-limfocita, što se odražava i u obliku promjena imunskih parametara u starijih osoba (55,59,60,61).

Glavne promjene u sustavu T-limfocita su smanjenje broja efektorskih CD8⁺ T-limfocita, te povećanje udijela memorijskih T-limfocita, što je praćeno i promjenama u produkciji citokina (37,60,61,62). Naime, poznato je da stimulirani naivni T-limfociti dominantno produciraju citokin IL-2, dok memorijski T-limfociti koji slabo produciraju taj citokin, dobro produciraju citokine IL-4 i IFN- γ (56,63). Unatoč tim poznatim pravilima, nije se utvrdio jedinstven obrazac lučenja limfocitinih citokina, niti bilo koji drugi specifični imunski parametar, po kojemu bi se starije osobe mogle općenito razlikovati od mlađih osoba (64,65,66).

Od svih imunskih parametara, najkonzistentnije promjene su zabilježene u obliku povećanja udijela, u populaciji memorijskih T-limfocita, stanica koje na svojoj površini nemaju eksprimiranu kostimulacijsku molekulu CD28 (55,56,57,67). Ekspresija te molekule je znak proliferacijske sposobnosti T-limfocita, a time i njihove funkcionalne sposobnosti da učestvuju u specifičnoj imunskoj reakciji. Pretpostavlja se da je manjak te molekule posljedica klonalnog iscrpljenja T-limfocita, što je u skladu s nalazom da je taj manjak izraženiji u citotoksičnoj (efektorskoj) CD8⁺, nego u pomoćničkoj (helperskoj) CD4⁺ populaciji T-limfocita (58,68,69) (slika 8).



Slika 7. Promjene u sustavu T-limfocita sa starenjem

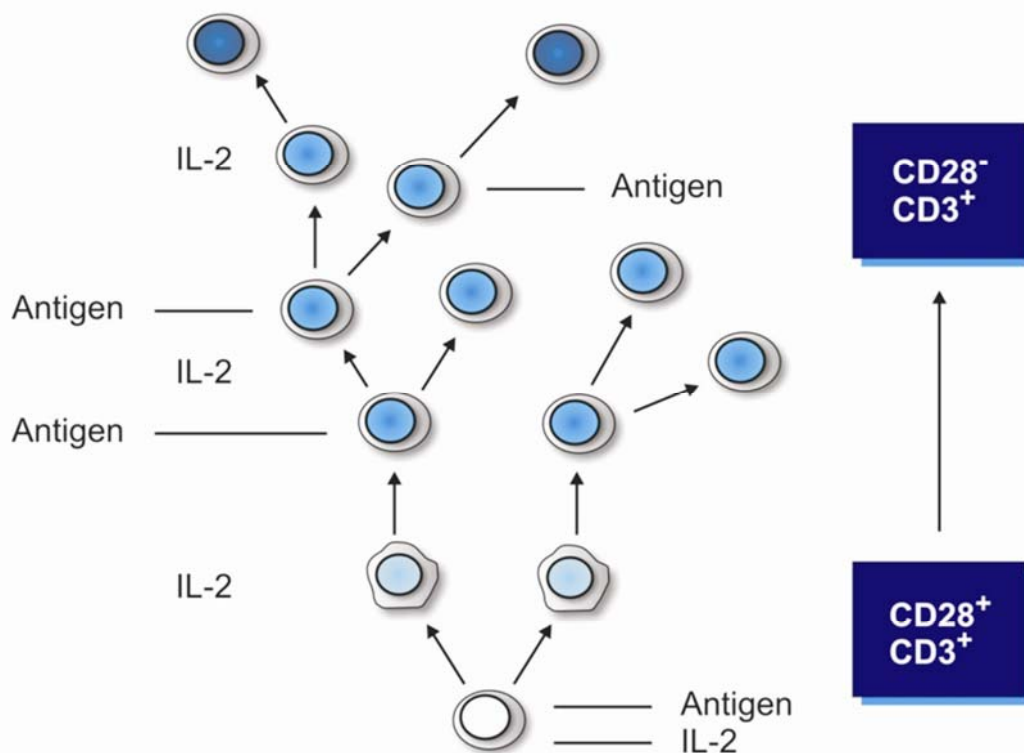
Modificirano prema časopisu "Immunology Today", listopad, 2000.

Promjene koje u sustavu T-limfocita nastaju sa starenjem su rezultat tri glavna čimbenika i to:

- smanjene produkcije naivnih T-limfocita (Timus)
- ponovljene antigenske stimulacije (sekundarni limfatični organi-limfni čvorovi, slezena)
- starenja mirujućih, neproliferirajućih T-limfocita, neovisno o antigenskoj stimulaciji

Zauzimanjem neproporcionalno većeg prostora imunskog sustava, ekspanzirana CD8+CD28- subpopulacija T-limfocita bi mogla dovesti do smanjenja veličine i aktivnosti drugih subpopulacija T-limfocita i tako utjecati na funkciju imunskog sustava (55,56,70,71,72).

Kao rezultat neprimjerene ekspanzije te subpopulacije T-limfocita, mogu nastati teški poremećaji funkcije imunskog sustava, kao što su gubitak pojedinih klonova T-limfocita uslijed anergije, te nemogućnost kooperacije s B-limfocitima (71).



Slika 8. Promjene u sustavu T-limfocita sa starenjem

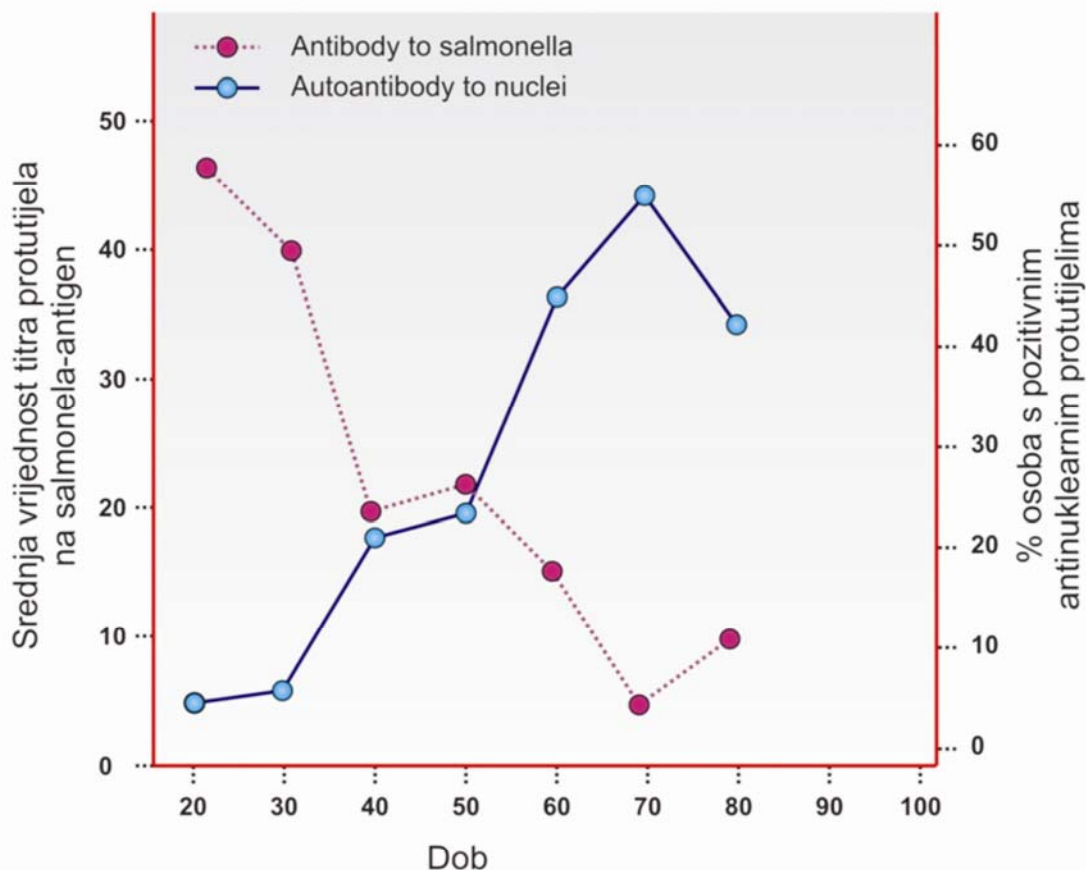
Modificirano prema časopisu "Immunology Today", listopad, 2000.

Dugotrajna antigenska stimulacija dovodi do iscrpljenja proliferativne sposobnosti klonova T-limfocita (CD3+) ("replicative senescence")

3.2. Promjene u sustavu B-limfocita

Najbolji dokaz nastalih promjena u B-limfocitnom sustavu, u starijih osoba, je njihova smanjena sposobnost produkcije protutijela na cjepiva i druge strane antigene, a novostvorena protutijela su obično i slabijeg afiniteta (7). S druge strane, povećava

se serumska koncentracija autoantitijela, uz učestaliji nalaz monoklonskih imunoglobulina (73). To je, uz kroničnu imunizaciju, tijekom života, razlogom što u konačnici koncentracija ukupnih serumskih imunoglobulina nije smanjena, već može naprotiv biti i povećana (74). Sve to ukazuje na suženje repertoara specifičnosti B-limfocita, te na pomak specifičnosti reagiranja - od stranih, prema vlastitim antigenima (74,75) (slika 9).



Slika 9. Porast produkcije autoantitijela sa starenjem

Modificirano prema časopisu "Journal of Clinical Immunology", Vol.20, 2000.

Produkcija protutijela na salmonela-antigen, ubikvitarni vanjski antigen, sa starenjem se smanjuje, a povećava se udio osoba koje produciraju antinuklearna protutijela.

Promjene u B-limfocitnom sustavu u starosti nastaju dijelom kao posljedica poremećenog sazrijevanja B-limfocita u koštanoj srži, a dijelom kao posljedica smanjene reakcije germinativnog centra u folikulima perifernih limfatičkih organa (23,76). Reakcija germinativnog centra je složen slijed reakcija koji ima za cilj povećanje specifičnosti imunoglobulinskih receptora B-limfocita, u skladu s konformacijskim značajkama antigena kojega treba prepoznati (73,77). Taj se proces odvija uz pomoć CD4+ T-limfocita i podrazumijeva intenzivnu proliferaciju B-limfocita, praćenu hipermutacijama varijabilnog dijela molekule imunoglobulina, te selekciju imunoglobulinskih receptora s potencijalno najvećim afinitetom za strane antigene (4,77,78,79).

Uslijed općeg procesa starenja stanica u tijelu, reakcija germinativnog centra u starijih osoba je često poremećena, zbog čega je i sposobnost generiranja repertoara specifičnosti B-limfocita - također smanjena (23,76).

3.3. Promjene u sustavu nespecifične imunosti

Pomak od specifične prema nespecifičnoj i staničnoj imunosti, zapažen u osoba starije dobi, bi mogao biti odgovor na povećane zahtjeve organizma za prepoznavanjem ciljnih stanica, kao što su stanice inficirane virusima, ili neoplastički transformirane stanice. Pošto je ekspresija molekula MHC klase I. na tim stanicama, u osoba starije dobi, često smanjena, ili je uopće nema, to otežava njihovo prepoznavanje specifičnim receptorima T-limfocita pa se, kao kompenzacijski mehanizam, povećava broj citotoksičnih stanica nespecifičnog imunostnog sustava (70,80,81,82,83,84).

Osim tih promjena, značajno je povećan, u ukupnom broju leukocita periferne krvi, udio mononuklearnih leukocita s fenotipskim obilježjima aktiviranog stanja. To je praćeno spontanom produkcijom upalnih citokina IL-1, TNF- α i IL-6, te porastom njihove koncentracije u serumu (85,86,87). Povećan je i broj neutrofilnih leukocita. Zbog sposobnosti tih stanica da produciraju oksidacijske radikale, to je i razlog povećanja ukupnog stupnja oksidacijskog stresa (84).

HIPOTEZA I CILJEVI

1. Formuliranje hipoteze

Iako je nedvojbeno dokazano da je zaštitni učinak cijepljenja protiv influence u starijih osoba značajno slabiji nego u mlađih osoba, ne zna se točno koji bi sve čimbenici mogli utjecati na slabiju produkciju zaštitnih specifičnih protutijela u tih osoba (6,10,15,19,21,88).

Jedna od mogućnosti je općenito oslabljena imunosna reaktivnost starijih osoba do koje dolazi tijekom biološkog procesa starenja (37,54,55).

Pri tome je teško razlučiti do koje mjere bi na to mogao utjecati sam proces starenja, a u kojoj mjeri bi to mogla biti posljedica pridruženih kroničnih bolesti i patogenetskih poremećaja koji prate starenje.

Naime, imunosni sustav nije izolirani sustav čija bi jedina funkcija bila zaštita od infekcije, već se radi o multicelularnom umreženom sustavu uključenom u patogenezu gotovo svih bolesti.

Kronične bolesti, putem trajne aktivacije imunosnog sustava, mogu dovesti i do promjena u tome sustavu (89,90). Osim na taj način, kronične bolesti mogu i pomoću drugih mehanizama, kao što su: povećana produkcija citokina i drugih medijatora, povećan stupanj oksidacijskog stresa, te hormonalne i metaboličke promjene, dovesti do promjena u stupnju apoptoze i proliferacije stanica, što se sve može negativno odražavati i na funkciju imunosnog sustava (91,92,93,94).

Rezultati brojnih seroloških studija ukazuju da bi razlike u učinkovitosti cijepljenja protiv influence između starijih i mlađih osoba mogle biti i posljedica prijašnjih interakcija imunosnog sustava sa specifičnim virusnim antigenima (prijašnje, ili povijesno antigensko iskustvo), kao što je: iskustvo primarne imunizacije (*original antigenic sin*), visina prethodnog (ostatnog) titra protutijela, te broj prethodnih cijepljenja (15,95).

2. Hipoteza

Utvrđiti da li starija dob bitno utječe na učinkovitost cijepljenja protiv influence sama, ili u kombinaciji s prethodnim antigenskim iskustvom i/ili kroničnim bolestima i poremećajima općeg zdravstvenog stanja.

3. Specifični ciljevi

Cilj ovoga rada je utvrditi koje kronične bolesti i patogenetski poremećaji koji prate starenje mogu uzrokovati smanjeni serološki odgovor na cjepivo protiv influence.

U tu svrhu će se na učinkovitost cijepljenja protiv influence analizirati utjecaj čimbenika, kao što su:

prethodno antigensko iskustvo

(broj prethodnih cijepljenja, visina ostatnog titra protutijela, te komponente cjepiva),

dob i

parametri zdravstvenog stanja

i to u skupini ambulantnih pacijenata starih 50 i više godina, s kroničnim bolestima, kakvi se najčešće i cijepuju protiv influence.

Na tako formulirane ciljeve, očekivani rezultat je pokazati kako pojedini od tih čimbenika utječu na učinkovitost cijepljenja protiv influence.

ISPITANICI I METODE

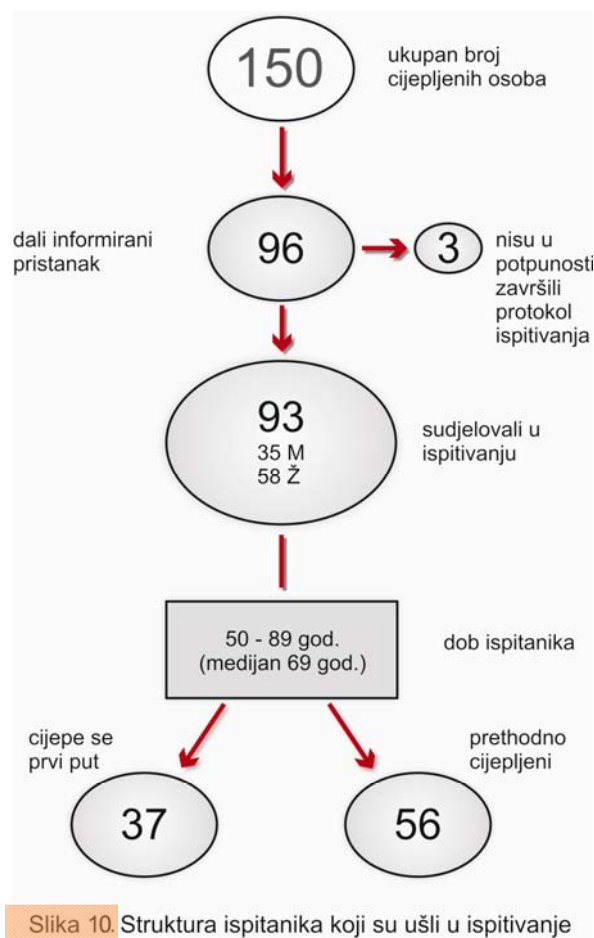
1. Ispitanici

Ispitanici su bili pacijenti u ambulanti autorice studije, doktorice Ljiljane Majnarić, koji su u sezoni 2003/2004 godine cijepljeni protiv influence.

Ambulanta je smještena u gradskom području (grad Osijek, oko 90. 000 stanovnika) Osječko-Baranjske županije. To je županija u kojoj od 1995. godine raste trend kretanja najvažnijih kroničnih bolesti, kao što su dijabetes, kardiovaskularne i maligne bolesti, veći od prosijeka za RH (96,97).

Ambulantu u kojoj je provedeno ispitivanje čine pretežno starije osobe i umirovljenici. Od ukupno oko 1600 pacijenata registriranih u toj ambulanti, njih 60% se nalazi u dobi od 50 godina i više, a oko 35% u dobi od 65 godina i više.

Ispitanici u ovoj studiji su bili pokretni ambulantni pacijenti, stari 50 i više godina, s kroničnim bolestima, kakvi se najčešće i cijepu protiv influence (slika 10). Od ukupno 93 ispitanika, njih 59 je bilo starije od 65 godina.



Redovito godišnje cijepljenje protiv influence se najviše preporučuje za osobe stare 65 godina i više, kao i za osobe mlađe od te dobi ako boluju od hipertenzije, dijabetesa, kardiovaskularnih i kroničnih plućnih bolesti, te za osobe na trajnom programu hemodijalize, transplantirane i druge imunosuprimirane osobe, jer su to sve osobe s povećanim rizikom za razvoj komplikacija od strane respiratornog i kardiovaskularnog sustava (98).

2. Cijepljenje

Ispitanici su cijepljeni inaktiviranim fragmentiranim (*split*) cjepivom protiv influence komercijalnog naziva „*Influvac*“, proizvođača „*Solway*“, Nizozemska. Cjepivo je te sezone, prema preporuci SZO-a, sadržavalo slijedeće antigene:

A/ H₁N₁/ New-Caledonia/20/99-like,

A/ H₃N₂/ Moscow/10/99-like i

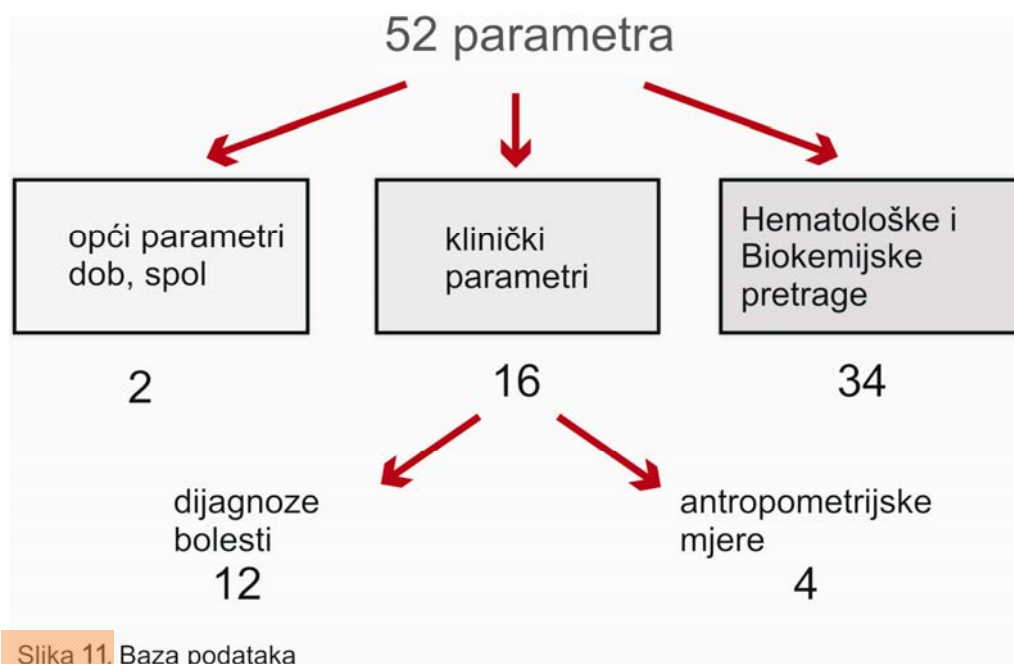
B/ Hong Kong - 330/2001-like.

Ispitanici su cijepljeni standardnim postupkom, tj. dozom od 0.5 ml cjepiva, primijenjenog *i.m.* u lijevu nadlakticu. Cjepivo je sadržavalo jednaku standardnu koncentraciju od 15 µg antigena (hemaglutinina) za svaku komponentu cjepiva. Imunosni odgovor na cjepivo protiv influence je određen na osnovi dinamike titra tzv. parnog seruma (razlike u visini titra protutijela između prvog seruma, uzetog prije cijepljenja, i drugog, kontrolnog seruma, uzetog 4 tjedna nakon cijepljenja).

3. Ispitivani parametri zdravstvenog stanja - baza podataka

Osim općih identifikacijskih parametara, kao što su dob i spol, prikupljeni su i klinički i laboratorijski podaci, ukupno 52 parametra po ispitaniku (tablice 1-3). Ti parametri su činili bazu podataka (kompleksni medicinski zapis za svakog pojedinog pacijenta) (slika 11).

Na izbor parametara su utjecala dva kriterija. Prvi je bio oskudno postojeće znanje o tome kako zdravstveno stanje utječe na rezultat cijepljenja protiv influence. Zato su za opis zdravstvenog stanja ispitanika kao parametri uzete dijagnoze svih najčešćih skupina kroničnih bolesti, a učinjen je i veći broj hematoloških i biokemijskih pretraga da bi se opisali pojedini patogenetski poremećaji. Drugi kriterij je bio da ti parametri budu dostupni liječnicima u primarnoj zdravstvenoj zaštiti.



3.1. Dijagnoze najčešćih skupina kroničnih bolesti

Tablica 1. Dijagnoze kroničnih bolesti kao parametri zdravstvenog stanja i kriteriji za njihovo postavljanje

Dijagnoze	Pozitivni (od 93 ispitanika)	Pozitivni (od 93 ispitanika)	kriteriji za dijagnozu/ probir ispitanika
	broj	%	
hipertenzija	77	82,80	već postavljena dijagnoza. višekratno mjerenje krvnog tlaka
dijabetes mellitus tip 2	23	24,73	već postavljena dijagnoza, u slučaju graničnih vrijednosti glukoze u krvi OGTT •
kardiovaskularne bolesti	24	25,81	na osnovu nalaza specijalista: dijagnoza koronarne bolesti srca (angina pectoris, infarkt miokarda, revaskularizacija srca) dijagnoza cerebrovaskularne bolesti (prolazna ishemija, inzult) dijagnoza periferne vaskularne bolesti
bolesti gastro- duodenuma	32	34,41	dijagnoza potvrđena endoskopskom pretragom
bolesti donjeg dijela urinarnog trakta	51	55,43	kronični cistitis u žena (klinički kriteriji) i hipertrofija prostate u muškaraca (potvrđena UZV pretragom)
kronična opstruktivna plućna bolest	13	13,98	dijagnoza potvrđena spirometrijom i/ili uzimanje bronhodilatatora
alergijske bolesti (rinitis/astma)	9	9,68	klinički simptomi, alergološki testovi, astma (spirometrija i antiinflamatorni lijekovi)

Jači osteoartritis	23	25,00	Jači simptomi, uz učestalo uzimanje nesteroidnih antireumatika
kožne bolesti	51	54,84	dermatomikoze, kronični dermatitisi (klinički)
maligne bolesti	14	15,05	potvrđena dijagnoza maligne bolesti, trenutno bez radikalne terapije i bez znakova progresije bolesti
osteoporoza +	30	40,00	dijagnoza potvrđena denzitometrijom (DEXA-metodom) ✕
neuropsihijatrijske bolesti	40	43,01	(anksioznost/depresija, Parkinsonova bolest, kronični psihoorganski sindrom) nalaz psihijatra (neurologa) i/ili uzimanje psihotropnih lijekova

- OGTT (*Oral Glucose Tolerance test*), oralni test opterećenja glukozom
- † za parametar osteoporoze, za 18 od ukupno 93 pacijenta nije postojao podatak
- ✕ DEXA-metoda (*Dual-Energy-X-ray-Absorptiometry*), Dvoenergetska apsorpciometrija X-zraka - „zlatni standard“ za dijagnozu osteoporoze

3.2. Antropometrijske mjere

Tablica 2. Antropometrijske mjere kao parametri zdravstvenog stanja

Parametar	min vrijednost	max vrijednost	referentne vrijednosti	metode
Indeks tjelesne mase (BMI) *	20,24	43,10	<20 mršavi 20-25 normalni 26-30 povećane težine 31-40 pretili >40 izrazito pretili	kg/m ²
obujam struk / bokovi	0,76	1,11	M do 1.0 Ž do 0.8	centimetrom
debljina kožnog nabora iznad tricepsa	16	50	Za osobe 50-65 godina M 8-23 mm Ž 10-35 mm	kaliperom
obujam srednjeg dijela nadlaktice	24	39	M 54 ± 11 Ž 30 ± 7	centimetrom

* BMI (*Body mass index*)

3.3. Hematološke i biokemijske pretrage

pokazatelji upalnog stanja

ukupan broj leukocita u perifernoj krvi, diferencijalna krvna slika (postotak limfocita, mononuklearnih, neutrofilnih i eozinofilnih leukocita), C-reaktivni protein, elektroforeza proteina seruma (α_1 , α_2 , β - i γ -globulini)

pokazatelji latentnih infekcija

IgA i IgG specifična protutijela na mikroorganizam *Helicobacter pylori*, IgG specifična protutijela na citomegalovirus

pokazatelji imunosne reakcije humoralnog tipa

antinuklearna autoantitijela (ANA), IgE protutijela

pokazatelji nutritivnog statusa

broj eritrocita, hemoglobin, prosječni volumen eritrocita (MCV),
serumsko željezo, serumski albumin,
folna kiselina, vitamin B₁₂, aminokiselina homocistein

pokazatelji smanjene funkcije bubrega

klirens kreatinina

pokazatelji metaboličkih poremećaja

glukoza u krvi na tašte, glikolizirani hemoglobin HbA_{1c} (pokazatelj prosječne koncentracije glukoze u krvi u posljednja 3 mjeseca)

ukupni kolesterol, HDL (*high density*) kolesterol, trigliceridi

pokazatelji endokrinog statusa

hormoni štitne žlijezde: slobodne frakcije hormona trijodtironina (fT₃) i tiroksina (fT₄)

hormoni prednjeg režnja hipofize: tireoidni stimulirajući hormon (TSH) i prolaktin

neuroendokrini stresni odgovor: kortizol

Tablica 3. Hematološke i biokemijske pretrage kao parametri zdravstvenog stanja

Parametar	min vrijednost	max vrijednost	referentne vrijednosti
glukoza u krvi na tašte	4,6	13,9	4,4 - 6,4 mmol/L
glikolizirani hemoglobin HbA _{1c}	2,89	10,06	4,0 – 6,4 %
ukupni kolesterol	3	8,9	3.5-5.2 mmol/L
trigliceridi	0,5	9,3	0.5-1.8 mmol/L
HDL-kolesterol	0,87	2,53	0.9-1.4 mmol/L
IgG protutijela na citomegalovirus	0,06	17,8	do 0.4 IU/ml
IgG protutijela na <i>Helicobacter pylori</i>	3	150	> 11 IU/ ml
IgA protutijela na <i>Helicobacter pylori</i>	2,3	200	> 11 IU/ ml
ukupan broj leukocita u perifernoj krvi	4,06	9,93	3.4-10.0 × 10 ⁹ /L
% neutrofilnih leukocita	28	73,3	44.0-72.0 %
% eozinofilnih leukocita	0,3	14,3	1.0-7.0%
% mononuklearnih leukocita	3,6	15,7	2-12 %
% limfocita	18,4	57,7	20 - 46 %

C-reaktivni protein	0,8	24,5	do 5.0 mg/L
broj eritrocita	2,63	5,37	4.34-5.72 × 10 ¹² /L
hemoglobin	91	167	138-175 g/L
MCV *	66,5	106,1	83.0-97.2 fL
serumsko željezo	5	40	11.0-32.0 μmol/L
albumin u serumu	33,1	53	35-52 g/L
klirens kreatinina	0,72	3,21	1.6-2.94 ml/s/1.73m ²
Homocistein	5	25,9	5,0 – 15,0 μmol/L
α ₁ -globulini	1,5	2,8	1.0-2.9 g/L
α ₂ -globulini	3,8	8,8	3.0-7.1 g/L
β-globulini	5,8	10,3	4.5-9.2 g/L
γ-globulini	7,9	21,3	7.6-16.5 g/L
vitamin B ₁₂	97,8	885,6	128 - 648 pmol/L
folna kiselina	6,5	43,9	6-39 mM/L
kortizol	180,3	812,1	154-638 nmol/L
prolaktin	14,57	838,18	M 65.7-439.8, F 76.3-400.7 mIU/L
TSH °	0,024	22,7	0,46 – 4,68 UI/ml
fT ₃ ×	4,35	7,96	4.26-8.10 pmol/L
fT ₄ +	8,92	18,9	10-28.2 pmol/L
antinuklearna protutijela (ANA)	7	300	do 23 μIU/ml
IgE protutijela	2	1782	<114 kIU/L

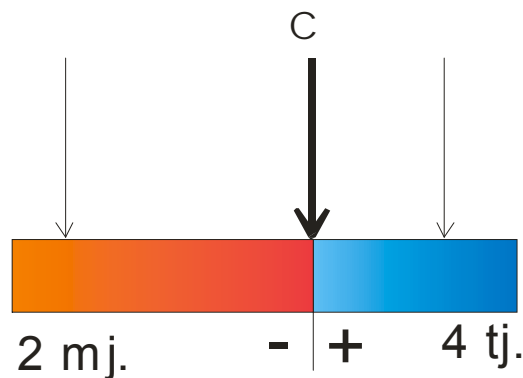
- * MCV (*Mean cell volume*) - prosječna veličina eritrocita
- ° TSH - Tireoidni stimulirajući hormon
- × fT₃ - slobodna (*free*) serumska frakcija hormona trijodtironina
- + fT₄ - slobodna (*free*) serumska frakcija hormona tiroksina

4. Protokol ispitivanja

Ispitivanje je provedeno u sklopu rutinskog postupka cijepljenja (oznaka „C“ na grafikonu) protiv influence (slika 12).

Od cijepljenih osoba su uzeta dva uzorka krvi i to jedan prije cijepljenja i drugi 4 tjedna nakon cijepljenja. Ti uzorci krvi su služili za dobivanje parnog seruma i mjerenje porasta titra specifičnih protutijela. Za to je bilo potrebno po 5 ml krvi za svaki uzorak. Serum za serološka testiranja je odvojen iz tih uzoraka krvi

centrifugiranjem, te pohranjen na -40° . Po završetku ispitivanja, zamrznuti uzorci parnog seruma su propisno transportirani u Zagreb gdje su na Odjelu za virologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo obavljena serološka testiranja. Pri tom odjelu djeluje Nacionalni influenza centar, uključen u mrežu od 110 laboratorija SZO-e čiji je zadatak praćenje i dijagnostika influence.



Slika 12. Protokol studije

Pri prvom vađenju krvi (prije cijepljenja) su uzeti i uzorci krvi za hematološke i biokemijske pretrage, predviđene planom istraživanja. Ispitanici su u manjim skupinama i po unaprijed utvrđenom rasporedu, tijekom 2 mjeseca prije cijepljenja, odlazili u Centralni biokemijski laboratorij Kliničke bolnice Osijek gdje su im uzeti uzorci krvi, a tu su napravljene i sve planirane krvne pretrage (grafikon). Za hematološke pretrage je bila potrebna jedna epruveta od 5 ml krvi, a za biokemijske pretrage tri epruvete od 5 ml krvi. Uzorci krvi za hematološke pretrage su obrađeni neposredno nakon vađenja krvi. Uzorci krvi za biokemijske pretrage su centrifugirani, pohranjeni, te analizirani po završetku ispitivanja. Za vađenje krvi su korištene vakuum epruvete (vacutaineri) i odgovarajući jednokratni pribor za vađenje krvi.

Podaci o dijagnozama bolesti su uzeti iz zdravstvenih kartona pacijenata. Po potrebi, dodatne informacije su dobivene putem intervjua s ispitanicima, te putem dodatnog fizikalnog pregleda. Antropometrijska mjerenja su obavljena u ambulanti, neposredno prije postupka cijepljenja.

5. Laboratorijske metode

5.1. Serološka testiranja - metoda za dokazivanje specifičnih protutijela na površinske antigene virusa influence

Titar protutijela je mjereno testom „inhibicije hemaglutinacije“ (HI-test) koji predstavlja „zlatni standard“ za određivanje titra protektivnih protutijela na virus influence (99). Test je jednostavan, jeftin i pogodan za primjenu na velikom broju uzoraka seruma, a zasniva se na sposobnosti virusa influence da aglutinira eritrocite čovjeka i nekih životinjskih vrsta (hemaglutinacija). Izvodi se tako da se određena poznata doza virusnog antigena hemaglutinina dodaje serijskim razrijeđenjima uzorka seruma koji se testira, pripremljenim u *microplate* posudi. Nakon inkubacije reaktanata, dodaju se i eritrociti, čime reakcija postaje vidljiva (indikatorski sustav).

Titar (koncentracija) hemaglutininskih protutijela od 1:40 i veći, određen testom inhibicije hemaglutinacije, predstavlja korelat zaštite za učinkovitost cijepljenja protiv influence.

Osim na antigene virusa influence sadržane u cjepivu, serološko testiranje je izvršeno i na antigen B/ Sicuan 379/99 koji se nalazio u sastavu cjepiva dvije godine ranije, tj. prije zadnje promjene sastava cjepiva. Takav postupak se rutinski primijenjuje za antigene čiji se sastav u cjepivu često mijenja, da bi se ispitao utjecaj heterologne reakcije na produkciju specifičnih protutijela na komponente primijenjenog cjepiva.

5.2. Hematološke i biokemijske pretrage

Korištene su standardne laboratorijske metode (100).

- glukoza u krvi na tašte - fotometrija UV s heksokinazom
- glikolizirani hemoglobin HBA_{1C} - imunoturbidimetrijska metoda
- ukupni kolesterol - fotometrija s kolesterol-oksidadom (CHOD-PAP metoda)
- trigliceridi - fotometrija s glicerofosfat-oksidadom (GPO-PAP metoda)
- HDL-kolesterol - direktno određivanje s modificiranim polietilenglikolom i α -ciklodekstran-sulfatom
- IgG protutijela na citomegalovirus - ELISA-test (*Enzyme Immunoassay*)
- IgG protutijela na *Helicobacter pylori* - ELISA-test (*Enzyme Immunoassay*)
- IgA protutijela na *Helicobacter pylori* - ELISA-test (*Enzyme Immunoassay*)
- ukupan broj leukocita u perifernoj krvi - elektronski brojač krvnih stanica
- postotak (%) neutrofilnih leukocita u diferencijalnoj krvnoj slici - svjetlosna mikroskopija
- bojanje po Pappenheimu
- postotak (%) eozinofilnih leukocita u diferencijalnoj krvnoj slici - svjetlosna mikroskopija,
- bojanje po Pappenheimu

- postotak (%) mononuklearnih leukocita u diferencijalnoj krvnoj slici - svjetlosna mikroskopija, bojanje po Pappenheimu
- postotak (%) limfocita u diferencijalnoj krvnoj slici - svjetlosna mikroskopija, bojanje po Pappenheimu
- C-reaktivni protein - imunoturbidimetrijska metoda
- broj eritrocita - elektronski brojač krvnih stanica
- hemoglobin - elektronski brojač krvnih stanica
- MCV - elektronski brojač krvnih stanica
- serumsko željezo - fotometrija s ferozinom
- albumin u serumu - fotometrija s bromkrezol-zelenilom
- klirens kreatinina - računski iz kreatinina u serumu i 24^h urinu enzimatskom metodom
- Homocistein ELISA-test - (*Enzyme Immunoassay*)
- α_1 -globulini - elektroforeza proteina seruma elektroforeza na agarozima
- α_2 -globulini - elektroforeza proteina seruma elektroforeza na agarozima
- β -globulini - elektroforeza proteina seruma elektroforeza na agarozima
- γ -globulini - elektroforeza proteina seruma elektroforeza na agarozima
- vitamin B₁₂ - ELISA-test (*Enzyme Immunoassay*)
- folna kiselina - ELISA-test (*Enzyme Immunoassay*)
- kortizol - ELISA-test (*Enzyme Immunoassay*)
- prolaktin - ELISA-test (*Enzyme Immunoassay*)
- TSH - ELISA-test (*Enzyme Immunoassay*)
- fT3 - ELISA-test (*Enzyme Immunoassay*)
- fT4 - ELISA-test (*Enzyme Immunoassay*)
- antinuklearna protutijela (ANA) - svjetlosna mikroskopija, indirektna imunofluorescencija
- IgE protutijela - imuno-nefelometrijska metoda

6. Metode analize podataka

6.1. Mjere učinkovitosti cijepljenja protiv influence

- Prosječni porast titra protutijela poslije cijepljenja, izražen kao srednji geometrijski niz (*Meanfold increase of Geometric Mean Titre, GMT*)

Formula za izračunavanje srednjeg geometrijskog niza

antilog ($\sum \log 2 T / n$), T=recipročna vrijednost titra protutijela, n=broj ispitanika

Za titar 0 je uzeta vrijednost 5.

- Seroprotekcija (*Protection rate*) postotak osoba koje su cijepljenjem postigle zaštitnu visinu titra protutijela (1:40)
- Serokonverzija (*Response rate*) postotak osoba koje su cijepljenjem postigle značajan ($\geq 4x$) porast titra protutijela

6.2. Analiza podataka klasičnim statističkim metodama

Utjecaj **broja prethodnih cijepljenja i visine ostatnog titra protutijela** na učinkovitost cijepljenja protiv influence, s posebnim osvrtom na odnos tih čimbenika s obzirom na stariju dob, je analiziran standardnim statističkim metodama (101).

Za računanje razlika u vrijednostima titrova protutijela između podskupina ispitanika koje su se međusobno razlikovale po broju prethodnih cijepljenja, ili po dobi, je korišten neparametrijski Kruskal-Wallis test, zbog toga što vrijednosti titrova protutijela ne slijede normalnu distribuciju. Hi-kvadrat test je korišten za računanje razlika u proporcijama osoba sa zaštitnim ($\geq 1:40$) titrom protutijela, ili sa značajnim ($\geq 4x$) porastom titra protutijela.

Za testiranje razlika u broju cijepljenja (izraženom u kategorijama cijepnog statusa), ovisno o dobnim skupinama ispitanika, je korišten Fisher`s Exact test, pogodan za analizu kategoričkih varijabli na malim skupovima.

Razlike u dobi između skupina ispitanika, razvrstanih prema kategorijama cijepnog statusa (broju prethodnih cijepljenja), je prikazan pomoću *boxplot* dijagrama.

Za analizu **zajedničkog utjecaja dobi, prethodnog antigenskog iskustva i kroničnih bolesti i poremećaja zdravstvenog stanja** na učinkovitost cijepljenja protiv influence je primijenjena logistička regresija (102). Kao kriterijska varijabla, loša reakcija na cijepljenje se smatrala ako do $\geq 4x$ porasta titra protutijela nije došlo ni na jednu, ili je došlo samo na jednu komponentu cjepiva, dok se dobra reakcija smatrala ako je do $\geq 4x$ porasta titra došlo na dvije ili sve tri komponente cjepiva. Kao prediktori su uzeti dob, broj prethodnih cijepljenja i ostatni titrovi protutijela za 4 testirana antigena virusa influence, a za prediktore kroničnih bolesti i poremećaja zdravstvenog stanja su uzeti oni atributi koji su dobiveni prethodnom primjenom metoda strojnog učenja na bazu podataka.

Za analizu podataka je korišten software StatSoft, Inc. (2008). STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.

6.3. Metode strojnog (induktivnog) učenja

Da bi odgovorili na pitanje **koje kronične bolesti i patogenetski poremećaji** koji prate starenje mogu smanjiti serološki odgovor na cjepivo protiv influence, a to je problem o kojemu se vrlo malo zna, primijenili smo metodu strojnog učenja (*Machine*

Learning) na prikupljenu veliku bazu podataka i iz nje selekcionirali potencijalno najznačajnije parametre zdravstvenog stanja (51,103,104).

Radi se o procesu inteligentne obrade podataka koji uključuje više postupaka - od definiranja problema i početne baze znanja, preko prikupljanja i obrade podataka, do interpretacije dobivenih rezultata pomoću postojećeg znanja, te generiranja novog znanja (52,105,106,107,108).

Ključni korak u tom procesu je obrada podataka (**Data Mining**). Taj postupak se sastoji od primjene specifičnih algoritama na bazu podataka, u svrhu nalaženja novih, korisnih i razumljivih struktura i pravila (modela) u podacima. U algoritmima se koriste sofisticirane tehnike kao što su stabla odlučivanja, logička pravila i neuralne mreže (51,105,106,107).

6.4. Algoritmi ILLM sustava

U ovom radu su korišteni algoritmi ILLM (*Inductive Learning by Logic Minimization*) sustava za indukciju pravila, razvijeni u Laboratoriju za informacijske sustave Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu (106,109,110).

Analiza podataka pomoću algoritama ILLM sustava zahtijeva definiranje jednog parametra koji služi kao objekt te analize (**ciljnog atributa**), dok su svi ostali parametri ulazni parametri, tj. koriste se za generiranje pravila koja opisuju primijere u ciljnoj klasi, a mogu služiti i za predviđanje njihovog ponašanja.

Naime, na osnovi vrijednosti ciljnog atributa se definiraju **kriteriji** po kojima se primijeri (pacijenti, osobe) u ispitivanom uzorku klasificiraju u dvije klase (podskupine) na taj način da ili pripadaju **ciljnoj klasi** (ako zadovoljavaju definirane kriterije), ili joj ne pripadaju (**kontrolna skupina**).

Za statističku evaluaciju klasifikacijskih postupaka su korištene mjere „osjetljivost“ (mjeri točnost u pozitivnim primijerima) i „specifičnost“ (mjeri točnost u negativnim primijerima).

6.5. Identifikacija značajnih parametara zdravstvenog stanja primjenom algoritama ILLM sustava na bazu podataka

Klasifikacijskim postupcima, primjenom algoritama ILLM sustava, iz baze podataka je određeno 6 najznačajnijih atributa po kriteriju korisnosti za klasifikaciju osoba koje slabo reagiraju na cjepivo protiv influence. Dobiveni atributi su poredani po redu značajnosti, s tim da je prvi na listi i najznačajniji (110, [osobna komunikacija s

autorom algoritama putem e-mail-a, šalje:Dragan.Gamberger@irb.hr>Datum:2. studenoga 2009.14:08]).

Pošto je cjepivo protiv influence višekomponentno, te pošto na produkciju protutijela nakon cijepljenja bitno utječe i visina prethodnog (ostatnog) titra protutijela, nije moguće jednoznačno definirati što znači slabo reagiranje na cjepivo protiv influence. Zbog toga su kriteriji za klasifikaciju ispitanika definirani na 4 načina.

Kriteriji za podjelu ispitanika u klase su definirani na osnovi rezultata seroloških testova za sva 4 testirana antigena virusa influence (3 komponente cjepiva i antigen B/Sicuan 379/99). Osim pozitivnog ($\geq 4x$ porast titra) i negativnog ($< 4x$ porast titra) rezultata, serološki test je mogao imati i neodređen rezultat ($< 4x$ porast tira, s tim da je ostatni titar $\geq 1:40$). Naime, u tom slučaju se ne zna kako bi ispitanik reagirao da mu je ostatni titar protutijela bio manji od zaštitnog. Definiranjem te dodatne kategorije rezultata serološkog testiranja je eliminiran utjecaj visokog ostatnog titra protutijela na učinkovitost cijepljenja.

6.6. Opis kriterija za podjelu ispitanika u klase

Kriteriji za klasifikaciju ispitanika br. 1

Ispitanik je klasificiran da slabo reagira na cjepivo protiv influence (ciljna klasa) ako je imao 3 ili 4 negativna rezultata HI-testa (3,4 N). Te kriterije je zadovoljilo 10 ispitanika. Ispitanik je klasificiran da dobro reagira na cjepivo protiv influence (kontrolna skupina) ako je imao 3 ili 4 pozitivna rezultata HI-testa (3,4 P). Te kriterije je zadovoljilo 24 ispitanika. Preostalih 59 ispitanika koji nisu zadovoljili ove kriterije su isključeni iz analize.

Klasifikacijski postupak br. 1 opisuje osobe s najslabijim rezultatom cijepljenja, jer je od ukupno 10 ispitanika klasificiranih da slabo serološki reagiraju, njih 9 imalo negativan rezultat serološkog testa na sve 3 komponente cjepiva.

Kriteriji za klasifikaciju ispitanika br. 2

Ispitanik je klasificiran da slabo reagira na cjepivo protiv influence (ciljna klasa) ako je imao 2 i više negativnih rezultata HI-testa, s tim da nije imao ni jedan pozitivan rezultat (≥ 2 N, 0 P). Te kriterije je zadovoljilo 14 ispitanika. Ispitanik je klasificiran da dobro reagira na cjepivo protiv influence (kontrolna skupina) ako je imao 2 i više pozitivnih rezultata HI-testa, a ni jedan negativan rezultat (≥ 2 P, 0 N). Taj kriterij je

zadovoljilo 19 ispitanika. Preostalih 60 ispitanika koji nisu zadovoljili navedene kriterije su isključeni iz analize.

Kriteriji za klasifikaciju ispitanika br. 3

Od ukupno 93 ispitanika koji su sudjelovali u ispitivanju, njih 17 je isključeno iz analize, jer su imali:

- sva 4 testa s neodređenim rezultatom, ili
- 2 testa s neodređenim rezultatom i 1 pozitivni i 1 negativni rezultat, ili
- 2 pozitivna i 2 negativna rezultata testa.

U ovim slučajevima nije bilo moguće donijeti odluku o tome da li je ispitanik na cjepivo protiv influence reagirao slabo ili dobro. Preostalih 76 ispitanika je ušlo u analizu. Pojedini ispitanik je klasificiran da slabo reagira na cjepivo protiv influence, tj. da pripada ciljnoj klasi (32 ispitanika), ako je imao više negativnih, nego pozitivnih rezultata HI-testa. Preostala 44 ispitanika su činila kontrolnu skupinu.

Kriteriji za klasifikaciju ispitanika br. 4

Ispitanik je klasificiran da slabo reagira na cjepivo protiv influence (ciljna klasa) ako je imao barem 1 negativni HI-test ($\geq 1N$). Te kriterije je zadovoljilo 67 ispitanika. Ispitanik je klasificiran da dobro reagira na cjepivo protiv influence (kontrolna skupina) ako je imao 2 i više pozitivnih, a ni 1 negativan HI-test ($\geq 2P, 0N$). Te kriterije je zadovoljilo 19 ispitanika. Preostalih 7 ispitanika koji nisu zadovoljili navedene kriterije su isključeni iz analize.

6.7. Dodatni klasifikacijski postupci - definiranje patogenetskih poremećaja i kliničkih stanja

S ciljem razumijevanja šireg kliničkog konteksta najznačajnijih atributa dobivenih primjenom ILLM algoritama u klasifikaciji osoba koje slabije reagiraju na cjepivo protiv influence, učinjene su dodatne analize. Pri tome su ti najznačajniji atributi, definirani njihovim graničnim vrijednostima, predstavljali ciljnu, odnosno klasifikacijsku, kriterijsku varijablu. Pomoću ILLM algoritma se došlo do 6 novih najznačajnijih atributa za klasifikaciju prethodno dobivenih atributa, odnosno prediktora slabije reakcije na cjepivo protiv influence (110), [osobna komunikacija s autorom algoritama putem e-mail-a, šalje: Dragan.Gamberger@irb.hr>Datum: 2. studenoga 2009. 14:08].

6.8. Početna baza znanja

Početna baza znanja za odabir parametara koji će ući u bazu podataka se zasnivala na okvirnoj pretpostavci da se interakcijom između neuroendokrinog, imunskog i metaboličkog sustava odvija dinamika procesa starenja, praćena brojnim kliničkim manifestacijama vezanim uz starenje (36). To početno pretraživanje baza znanja je pokazalo da bi mnoge bolesti i patogenetski poremećaji vezani uz starenje mogli imati imunomodulirajuće djelovanje.

Latentne infekcije

Latentne infekcije koje uzrokuje bakterija *Helicobacter pylori* ili citomegalovirus, nemaju jasne, klinički vidljive manifestacije, ali predstavljaju stalni podražaj za imunski sustav i potiču razvoj upale (111,112).

Neuroendokrine promjene

Brojne neuroendokrine promjene redovito prate starenje, što može utjecati na promjene imunskog reaktivnosti. Naime, živčani, endokrini i imunski sustav su glavni regulacijski sustavi u tijelu, odgovorni za održavanje opće tjelesne homeostaze. Ti sustavi su povezani u zajedničku komunikacijsku cjelinu brojnim interaktivnim vezama i dijele zajedničke topljive signalne molekule u obliku hormona, citokina, neurotransmitera i neuropeptida, te njihovih receptora (*soluble connection*), a isprepleteni su i nitima autonomnog živčanog sustava (*wiring system link*) (113,114,115,116,117).

Malnutricija

Starenje je povezano sa smanjenjem količine mišićnog i povećanjem količine masnog tkiva, što se odražava na promjene antropometrijskih mjera. Antropometrijske mjere, neki parametri upale, anemija, te deficit vitamina i minerala, mogu ukazivati na malnutriciju koju uvijek prate i neki oblici imunodeficijencije (91,118).

Za procjenu malnutricije se koriste brojni parametri, što pokazuje da se ne radi o jedinstvenom poremećaju, nego o preklapanju više kliničkih stanja i patogenetskih poremećaja. Ti parametri su: antropometrijske mjere (BMI, obujam srednjeg dijela nadlaktice i debljina kožnog nabora iznad tricepsa), hematološki parametri (broj eritrocita, hematokrit i hemoglobin), serumska koncentracija proteina kratkog poluživota (prealbumin, albumin i transferin), vitamini (folna kiselina, vitamini B-grupe,

vitamini C i D), minerali i mikronutritijenti (željezo, kalcij, magnezij, cink, beta-karoten, retinol i alfa-tokoferol), kao i imunosni parametri (absolutni broj limfocita periferne krvi i kožni testovi kasne preosjetljivosti) (119,120,121).

Metabolički poremećaji

Poremećaji, kao što su: smanjena tolerancija glukoze, hipertenzija, dijabetes i poremećaji metabolizma lipida, su sve fenotipska obilježja jedinstvenog metaboličkog sindroma inzulinske rezistencije (otpornosti perifernih tkiva na metaboličko djelovanje inzulina) čija se prevalencija povećava sa starenjem (30,39).

Ti poremećaji mogu utjecati na aktivnost cirkulirajućih limfocita promjenom staničnih puteva prijenosa signala, smanjenjem aktivnosti površinskih receptora i smanjenjem proliferacije (92,93). Osim toga, povećana produkcija reaktivnih kisikovih spojeva, posljedica metaboličkih poremećaja, može izazvati oštećenja staničnih struktura, te mijenjati aktivnost gena, od kojih su neki uključeni u regulaciju upalnog i imunosnog odgovora, te staničnog ciklusa (33,39,43,94).

Kronična upala

Kronična upala subkliničkog stupnja se može naći u velikog dijela osoba starije dobi i smatra se posljedicom kroničnih bolesti, kronične antigenske stimulacije i povećane aktivnosti nespecifičnog imunosnog sustava. Povećan stupanj upale čini predispoziciju za razvoj mnogih bolesti starenja, te povećava rizik mortaliteta (122,123,124).

Promjene u funkciji imunosnog sustava

U starijih osoba su opisane brojne promjene imunosnih parametara. Od pokazatelja funkcije humoralne imunosti, to su na primijer promjene u serumskoj koncentraciji γ -globulina, protutijela IgE, antinuklearnih (ANA) i drugih autoreaktivnih protutijela (74,125).

REZULTATI

I. UTJECAJ ANTIGENSKOG ISKUSTVA I DOBI NA UČINKOVITOST CIJEPLJENJA

1. Utjecaj antigeniskog iskustva (broja prethodnih cijepljenja i visine ostatnog titra protutijela) na učinkovitost cijepljenja

Tablica 5. Utjecaj broja prethodnih cijepljenja (cijepnog statusa) na učinkovitost cijepljenja mjerenu prosječnom visinom titra protutijela i postotkom osoba s 4-strukim ili većim porastom titra, za antigen **A/H₁N₁**

CIJEPNI STATUS	N	TITAR			
		GEOMETRIJSKI NIZ		≥ 4 x PORAST	
		OSTATNI	NOVI	N	%
Nisu cijepljeni	37	8	29	15	40,54
Cijepljeni	56	10	31	22	39,29

Iz tablice 5. je vidljivo da za komponentu cjepiva A/H₁N₁ nema značajne razlike u prosječnoj visini ostatnog titra protutijela između skupine osoba koje su prethodno cijepljene i skupine osoba koje se cijepu prvi put. Ni nakon cijepljenja se prosječna visina titra protutijela, kao ni postotak cijepljenih osoba s 4-strukim ili većim porastom titra, između te dvije skupine osoba, značajno ne razlikuje.

Tablica 6. Utjecaj broja prethodnih cijepljenja (cijepnog statusa) na učinkovitost cijepljenja mjerenu postotkom osoba sa zaštitnim titrom protutijela (≥1:40), za antigen **A/H₁N₁**

CIJEPNI STATUS	N	TITAR ≥ 1 : 40			
		PRIJE CIJEPLJENJA		POSLIJE CIJEPLJENJA	
		N	%	N	%
Nisu cijepljeni	37	3	8,1	20	54,1
Cijepljeni	56	5	8,9	28	50,0

Iz tablice 6. je vidljivo da za komponentu cjepiva A/H₁N₁ nema značajne razlike u postotku osoba koje prije cijepljenja imaju zaštitnu visinu titra protutijela (≥1:40) između skupine prethodno cijepljenih osoba i skupine osoba koje se cijepu prvi put. Poslije cijepljenja je podjednak postotak osoba postigao zaštitnu visinu titra protutijela, bez obzira na prethodni cijepni status.

Tablica 7. Utjecaj broja prethodnih cijepljenja (cijepnog statusa) na učinkovitost cijepljenja mjerenu prosječnom visinom titra protutijela i postotkom osoba s 4-strukim ili većim porastom titra, za antigen **A/H₃N₂**

CIJEPNI STATUS	N	TITAR			
		GEOMETRIJSKI NIZ		≥ 4 x PORAST	
		OSTATNI *	NOVI	N	% °
Nisu cijepljeni	37	42	123	20	54,05
Cijepljeni	56	59	128	11	19,64

Iz tablice 7. je vidljivo da je za komponentu cjepiva A/H₃N₂ prosječna visina ostatnog titra protutijela značajno veća u skupini osoba koje su prethodno cijepljene, nego u skupini osoba koje se cijepu prvi put (* Kruskal-Wallis-test, p=0,038). Međutim, prosječna visina titra protutijela nakon cijepljenja se između te dvije skupine osoba značajno ne razlikuje.

Suprotno tome, do 4-strukog i većeg porasta titra u značajno većem postotku osoba je došlo u skupini osoba koje se cijepu prvi put, nego u skupini osoba koje su prethodno cijepljene (° Hi² - test, p=0,0006).

Tablica 8. Utjecaj broja prethodnih cijepljenja (cijepnog statusa) na učinkovitost cijepljenja mjerenu postotkom osoba sa zaštitnim titrom protutijela (≥1:40), za antigen **A/H₃N₂**

CIJEPNI STATUS	N	TITAR ≥ 1 : 40			
		PRIJE CIJEPLJENJA		POSLIJE CIJEPLJENJA	
		N	% °	N	%
Nisu cijepljeni	37	25	67,6	36	97,3
Cijepljeni	56	51	91,1	55	98,2

Iz tablice 8. je vidljivo da se za komponentu cjepiva A/H₃N₂ značajno veći postotak osoba sa zaštitnim titrom protutijela (≥1:40) prije cijepljenja nalazi u skupini osoba koje su prethodno cijepljene, nego u skupini osoba koje se cijepu prvi put (° Hi²-test, p=0,0041). Poslije cijepljenja je većina cijepljenih osoba postigla zaštitnu visinu titra protutijela, bez obzira na svoj cijepni status.

Tablica 9. Utjecaj broja prethodnih cijepljenja (cijepnog statusa) na učinkovitost cijepljenja mjerenu prosječnom visinom titra protutijela i postotkom osoba s 4-strukim ili većim porastom titra, za antigen **B/Hong Kong**

CIJEPNI STATUS	N	TITAR			
		GEOMETRIJSKI NIZ		≥ 4 x PORAST	
		OSTATNI *	NOVI	N	% °
Nisu cijepljeni	37	14	86	26	70,27
Cijepljeni	56	25	63	20	35,71

Iz tablice 9. je vidljivo da je za antigen B/Hong Kong prosječna visina ostatnog titra protutijela značajno veća u skupini osoba koje su prethodno cijepljene, nego u skupini osoba koje se cijepu prvi put (* Kruskal-Wallis-test, $p=0,010$).

Međutim, u visini titra protutijela nakon cijepljenja, između te dvije skupine osoba, nema značajne razlike.

Suprotno tome, do 4-strukog i većeg porasta titra u značajno većem postotku osoba je došlo u skupini osoba koje se cijepu prvi put, nego u skupini prethodno cijepljenih osoba (° Hi^2 - test, $p=0,0011$).

Tablica 10. Utjecaj broja prethodnih cijepljenja (cijepnog statusa) na učinkovitost cijepljenja mjerenu postotkom osoba sa zaštitnim titrom protutijela ($\geq 1:40$), za antigen **B/Hong Kong**

CIJEPNI STATUS	N	TITAR $\geq 1 : 40$			
		PRIJE CIJEPLJENJA		POSLIJE CIJEPLJENJA	
		N	% °	N	%
Nisu cijepljeni	37	7	18,9	32	86,5
Cijepljeni	56	21	37,5	47	83,9

Iz tablice 10. je vidljivo da se za komponentu cjepiva B/Hong Kong značajno veći postotak osoba sa zaštitnom visinom ostatnog titra protutijela ($\geq 1:40$) nalazi u skupini prethodno cijepljenih osoba, nego u skupini osoba koja se cijepu prvi put (° Hi^2 -test, $p=0,0456$). Te dvije skupine osoba se međutim ne razlikuju značajno u postotku osoba koje su nakon cijepljenja postigle zaštitnu visinu titra protutijela.

Tablica 11. Odnos visine ostatnog titra protutijela (prije cijepljenja) i novog titra (poslije cijepljenja), ovisno o broju prethodnih cijepljenja, za 4 testirana antigena virusa influence

ANTIGEN	CIJEPNI STATUS	TITAR (geometrijski niz)		N
		OSTATNI	NOVI	
A/H1N1	Nisu cijepljeni	8	29	37
	1 x	9	40	19
	2-3 x	11	40	13
	4-10 x	10	22	24
A/H3N2	Nisu cijepljeni	42	123	37
	1 x	58	154	19
	2-3 x	58	144	13
	4-10 x	62	104	24
B/Hong Kong	Nisu cijepljeni	14	86	37
	1 x	33*	93	19
	2-3 x	22	65	13
	4-10 x	21	46 ⁺	24
B/Sicuan	Nisu cijepljeni	15	43	37
	1 x	15	30	19
	2-3 x	28*	65 [°]	13
	4-10 x	25	49	24

Iz tablice 11. je vidljivo da antigen A/H₁N₁ karakteriziraju niski titrovi protutijela, dok najveće titrove protutijela, od tri komponente cjepiva, ima antigen A/H₃N₂.

Ostatni titar protutijela je općenito veći u osoba koje su jedanput prethodno cijepljene, nego u osoba koje se cijepu prvi put, ali je to povećanje značajno samo za komponentu cjepiva B/Hong Kong (• Kruskal-Wallis test, H=6,720, p=0,010). Ostatni titar protutijela se međutim čak ni za tu komponentu cjepiva ne povećava značajno s daljnjim povećanjem broja prethodnih cijepljenja.

Antigen B/Sicuan, sličan komponenti cjepiva B/Hong Kong, se nalazio u sastavu cijepiva primijenjenih prije 2 i više godina. Značajno veći ostatni titar i titar protutijela poslije cijepljenja, za taj antigen, u odnosu na osobe koje se cijepu prvi put, je imala skupina osoba prethodno cijepljena 2-3 puta (*Kruskal-Wallis test, H=9,263, p=0,002, za ostatni titar) i (° Kruskal-Wallis test, H=5,254, p=0,022, za titar protutijela poslije cijepljenja).

Konačno, za sve tri komponente cjepiva, A/H₁N₁, A/H₃N₂ i B/Hong Kong, vidljiva je tendencija porasta prosječnog titra protutijela poslije dva uzastopna cijepljenja, u odnosu na prvo cijepljenje (novi titar), te tendencija njegovog smanjenja nakon 5-tog i većeg broja uzastopnih cijepljenja. Međutim, jedino je za komponentu B/Hong Kong to smanjenje i statistički značajno (+ Kruskal-Wallis test, H=5,487, p=0,019).

2. Utjecaj (starije) dobi na učinkovitost cijepljenja

Tablica 12. Utjecaj dobi na učinkovitost cijepljenja protiv influence mjerenu postotkom osoba sa zaštitim titrom protutijela ($\geq 1:40$) i značajnim ($\geq 4x$) porastom titra

DOB god.	N tercile	A/H1N1				A/H3N2				B/Hong Kong			
		$\geq 1 : 40$		4 x porast		$\geq 1 : 40$		4 x porast		$\geq 1 : 40$		4 x porast ^o	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
≤ 65	33	17	51,51	18	54,54	33	100,0	12	36,36	30	90,9	25	75,75
66-70	30	14	46,66	11	36,66	28	93,33	10	33,33	26	86,66	15	50,0 ¹
>70	30	16	53,33	15	50,0	30	100,0	9	30,0	23	76,66	8	* 26,66 ²

Iz tablice 12. je vidljivo da je dobno ovisno smanjenje učinkovitosti cijepljenja statistički značajno samo za komponentu cjepiva B/Hong Kong i to ako je učinkovitost cijepljenja izražena mjerom "postotak osoba s četverostrukim ili većim ($\geq 4x$) porastom titra protutijela" (^o Hi²-test, ¹p=0,01, ²p=0,02). Ipak, krajnji zaštitni učinak cijepljenja, tj. postotak osoba sa zaštitnim ($\geq 1:40$) titrom protutijela, se ne smanjuje s dobi za tu, kao ni za jednu drugu komponentu cjepiva.

Da bi se utvrdilo da li je to dobno ovisno smanjenje učinkovitosti cijepljenja za komponentu cjepiva B/Hong Kong posljedica sve većeg broja cijepljenja s dobi, testirana je razlika u broju cijepljenja, izražena u kategorijama cijepnog statusa (cijepe se prvi put N=37, 1 x cijepljeni N=19, 2-3 x cijepljeni N=13, 4-10 x cijepljeni N=24), prema tako definiranim dobnim skupinama. Značajna razlika je nađena za dobnu skupinu >70 godina, u odnosu na dobnu skupinu ≤ 65 godina (* Fisher`s Exact test, p=0,001).

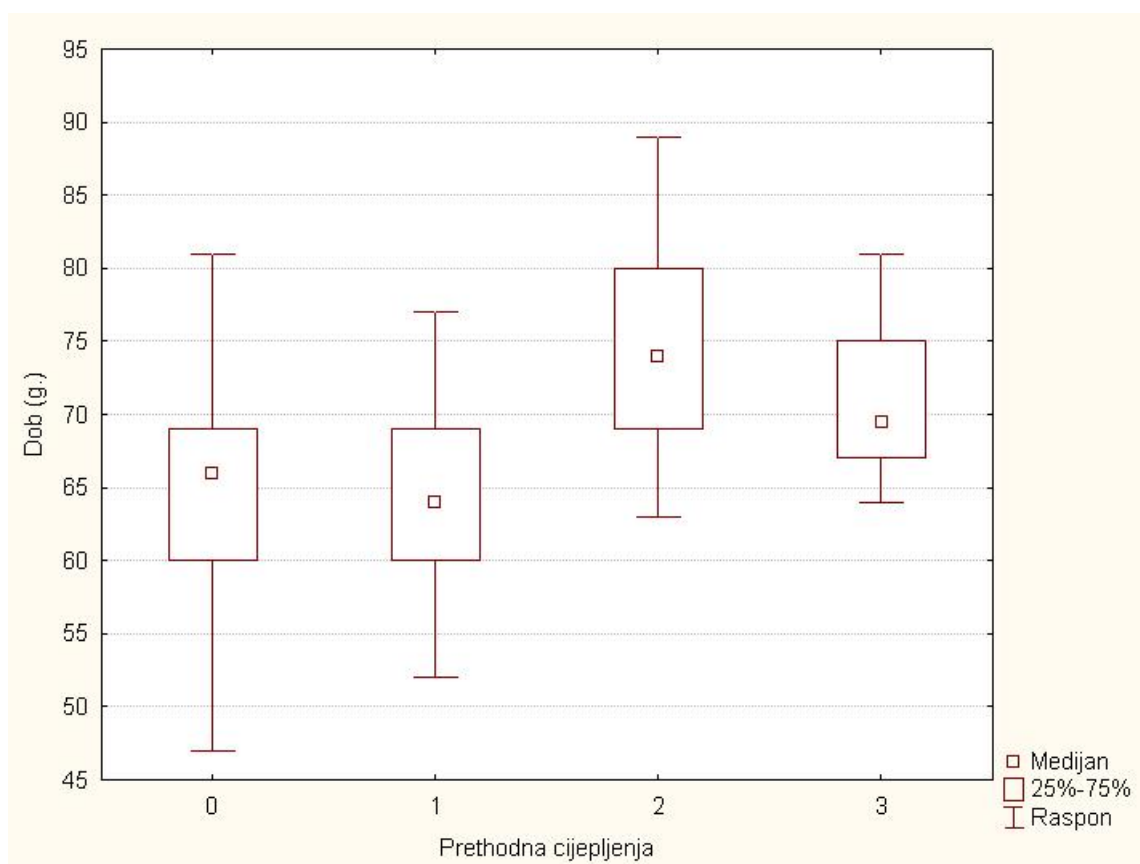
Tablica 13. Utjecaj dobi na visinu ostatnog titra i titra protutijela nakon cijepljenja

DOB ° god.	N	TITAR (geometrijski niz)					
		A/H ₁ N ₁		A/H ₃ N ₂		B/Hong Kong	
		OSTATNI	NOVI	OSTATNI	NOVI	OSTATNI	NOVI
≤ 60	13	15	28	57	160	20	99
61 - 65	20	16	48	54	113	18	104
66 - 70	30	17	36	57	138	23	66
71 - 75	16	15	42	64	153	37 ⁺	80
>75	14	12	25	40	93	26	46

° Dobne skupine su definirane kao: ≤60 godina i dalje po razredima od po 5 godina sve do 75 godina, te >75 godina

Iz tablice 13. je vidljivo da se visina ostatnog titra protutijela značajno povećava s dobi samo za komponentu cjepiva B/Hong Kong. Ta značajna razlika je nađena za dobnu skupinu 71-75 godina, u odnosu na mlađe dobne skupine (+ Kruskal-Wallis-test za grupu, $H=12,181$, $p=0,016$).

Titar protutijela poslije cijepljenja (učinak cijepljenja) se međutim ne smanjuje s povećanjem dobi ni za jednu komponentu cjepiva.

**Slika 13.** Odnos broja cijepljenja (kategorije cijepnog statusa) i dobi (medijan i raspon 25%-75%)

Iz slike 13. je vidljivo da je najstarija (medijan 74 godina) skupina ispitanika ona koja je prethodno cijepljena 2-3 puta (kategorija 2, N=13), s tim da se 50% ispitanika nalazi u dobi od 69-80 godina, a da je skupina ispitanika koja je prethodno najviše (4-10) puta cijepljena (kategorija 3, N=24), od nje nešto mlađa (medijan 69,5 godina), s tim da se 50% ispitanika nalazi u dobnim granicama od 67-75 godina.

Osobe koje se cijepu prvi put (kategorija 0, N=37), kao i osobe koje su samo jedanput prethodno cijepljene (kategorija 1, N=19), su približno iste dobi (medijan 66, odnosno 64 godina), s 50% osoba u dobnim granicama od 60-69 godina, a prosječno su značajno mlađe od osoba koje su više puta cijepljene (Kruskal Wallis test, $p=0,00001$).

II. UTJECAJ KRONIČNIH BOLESTI I PATOGENETSKIH POREMEĆAJA NA UČINKOVITOST CIJEPLJENJA

1. Parametri zdravstvenog stanja dobiveni iz baze podataka primjenom metoda induktivnog učenja

Tablica 14. Lista najznačajnijih atributa dobivenih klasifikacijom ispitanika metodama induktivnog učenja prema kriteriju br. 1

REDNI BROJ ATRIBUTA	ATRIBUT	GRANIČNE VRIJEDNOSTI	KLASIFIKACIJSKA SPOSOBNOST	
			Osjetljivost %	Specifičnost %
1.	monociti	> 8,0 %	90,0	70,8
2.	vitamin B ₁₂	≤ 212,0 pmol/L	80,0	75,0
3.	homocistein	>12,7 μmol/L	80,0	75,0
4.	fT ₄	≤13,65 pmol/L	70,0	79,1
5.	klirens kreatinina	≤1,55 ml/s/1.73m ²	70,0	75,0
6.	debljina kožnog nabora	≥ 32,50 mm	80,0	62,5

Tablica 14. pokazuje 6 najznačajnijih parametara zdravstvenog stanja (atributa) koji najbolje opisuju zdravstveni status cijepljenih osoba koje prema kriteriju za klasifikaciju ispitanika br.1 slabo reagiraju na cjepivo protiv influence. Broj ispitanika u ciljnoj klasi je 10, a u negativnoj klasi 24.

Ti parametri, po redu značajnosti, su: 1.povećan postotak mononuklearnih leukocita u diferencijalnoj krvnoj slici, 2.smanjena serumska koncentracija (deficit) vitamina B₁₂, uključujući i subklinički deficit, 3.povećana serumska koncentracija aminokiseline homocistein (hiperhomocisteinemija), počevši od subklinički povećanih vrijednosti, 4.smanjena serumska koncentracija hormona tiroksina (fT₄), znak hipofunkcije štitne žlijezde, uključujući i njen subklinički oblik, 5.smanjen klirens kreatinina, ispod granica referentnih vrijednosti, znak smanjene bubrežne funkcije, te 6.povećana debljina kožnog nabora iznad nadlaktice, znak proteinske malnutricije.

Osjetljivost tih parametara se kreće od 70-90%, a specifičnost od 62,5-79,1%, s tim da su dobiveni selekcijom na malom broju od 10 ispitanika u ciljnoj klasi. Prvih pet atributa na listi općenito pokazuje dobar odnos osjetljivosti i specifičnosti.

Najbolji prediktor slabog reagiranja na cjepivo protiv influence, prema pravilima primjene ILLM algoritama, je prvi atribut na listi, a to je povećan postotak mononuklearnih leukocita u diferencijalnoj krvnoj slici. Dobiveni rezultati ukazuju da bi to mogli biti i atributi vitamin B₁₂ i homocistein (br. 2 i 3) koji imaju najbolji odnos osjetljivosti i specifičnosti što znači da se pomoću njih može prepoznati najveći broj osoba koje će vjerojatno slabo serološki reagirati, a da se pri tome ne uzmu i osobe koje će reagirati dobro.

Tablica 15. Lista najznačajnijih atributa dobivenih klasifikacijom ispitanika metodama induktivnog učenja prema kriteriju br. 2

REDNI BROJ ATRIBUTA	ATRIBUT	GRANIČNE VRIJEDNOSTI	KLASIFIKACIJSKA SPOSOBNOST	
			Osjetljivost %	Specifičnost %
1.	monociti	> 7,85 %	71,4	73,6
2.	γ-globulini	>13,05 g/L	64,2	78,9
3.	MCV	>90,50 fL	78,5	63,1
4.	Helicobacter pylori IgA	>11,80 IU/ml	78,5	63,1
5.	prolaktin	>90,24 mIU/L	85,7	57,8
6.	β-globulini	>8,50 g/L	64,2	73,6

Tablica 15. pokazuje 6 najznačajnijih parametara zdravstvenog stanja (atributa) koji najbolje opisuju zdravstveni status cijepljenih osoba koje prema kriteriju za klasifikaciju ispitanika br. 2 slabo reagiraju na cjepivo protiv influence. Broj ispitanika u ciljnoj klasi je 14, a u negativnoj klasi 19.

Ti parametri, po redu značajnosti, su: 1.povećan postotak monocita u diferencijalnoj krvnoj slici, 2.blago povećana serumska koncentracija ukupnih γ-globulina, 3.povećan prosječni volumen eritrocita (MCV), znak deficita vitamina B₁₂, 4.povećana serumska koncentracija protutijela IgA specifičnih za mikroorganizam *Helicobacter pylori*, znak gastritisa, 5.povećana serumska koncentracija hormona prolaktina (hiperprolaktinemija), uključujući i subklinički oblik, te 6.blago povećana serumska koncentracija β-globulina, znak blagog stupnja upale.

Osjetljivost tih parametara se kreće od 64,2-85,7%, a specifičnost od 57,8-78,9%.

Prema odnosu osjetljivosti i specifičnosti, najbolji prediktor slabe serološke reaktivnosti je prvi atribut na listi koji ukazuje na povećan postotak mononuklearnih leukocita u diferencijalnoj krvnoj slici. Osobe s povećanom serumskom koncentracijom ukupnih γ-globulina (atribut br.2) će vjerojatno slabo reagirati na cjepivo, s tim da se pomoću toga parametra može identificirati samo manja podskupina tih osoba (bolja specifičnost, nego osjetljivost).

Dobiveni atributi br.3,4i5. zbog male specifičnosti, a atribut br.6 zbog male osjetljivosti, nisu najbolji prediktori slabe serološke reaktivnosti.

Tablica 16. Lista najznačajnijih atributa dobivenih klasifikacijom ispitanika metodama induktivnog učenja prema kriteriju br. 3

REDNI BROJ ATRIBUTA	ATRIBUT	GRANIČNE VRIJEDNOSTI	KLASIFIKACIJSKA SPOSOBNOST	
			Osjetljivost %	Specifičnost %
1.	limfociti	≤ 35,10 %	65,6	63,6
2.	fT ₄	≤13,65 pm/L	59,3	68,1
3.	Glukoza u krvi	≤5,45 mol/L	50,0	77,2
4.	β-globulini	≥8,05 g/L	53,1	72,7
5.	monociti	>7,95 %	65,6	56,8
6.	albumin	<45,35 g/L	75,0	54,54

Tablica 16. pokazuje 6 najznačajnijih parametara zdravstvenog stanja (atributa) koji najbolje opisuju zdravstveni status cijepljenih osoba koje prema kriteriju za klasifikaciju ispitanika br. 3 slabo reagiraju na cjepivo protiv influence. Broj ispitanika u ciljnoj klasi je 32, a u negativnoj klasi 44.

Ti parametri, po redu značajnosti, su: 1.smanjen postotak limfocita u diferencijalnoj krvnoj slici (relativna limfopenija), 2.smanjena serumska koncentracija hormona tiroksina (fT₄), znak hipofunkcije štitne žlijezde, uključujući i njen subklinički oblik, 3.niže vrijednosti koncentracije glukoze u krvi na tašte, 4.blago povećana serumska koncentracija β-globulina, pokazatelj blagog stupanj upale, 5.povećan postotak mononuklearnih leukocita u diferencijalnoj krvnoj slici, te 6.blago smanjena serumska koncentracija albumina, pokazatelj blagog stupanj upale.

Osjetljivost tih parametara se kreće od 50-75%, a specifičnost od 54,54-77,2%.

Prema pravilima primjene ILLM algoritama, prvi atribut na listi, a ovdje je to atribut koji ukazuje na smanjen postotak limfocita u diferencijalnoj krvnoj slici, je najbolji prediktor slabog reagiranja na cjepivo protiv influence. Međutim, rezultati u tablici 16. pokazuju da atributi dobiveni prema kriteriju za klasifikaciju ispitanika br.3 općenito ne pokazuju zadovoljavajući odnos osjetljivosti i specifičnosti da bi bili dobri prediktori.

Dobiveni rezultati ukazuju da se dio osoba sa slabim serološkim odgovorom može prepoznati po tome što imaju normalne ili malo snižene (a ne povećane) vrijednosti koncentracije glukoze u krvi na tašte (atribut br.3), što je suprotno postojećoj paradigmi da se slaba produkcija specifičnih protutijela može očekivati u dijabetičkih bolesnika.

Tablica 17. Lista najznačajnijih atributa dobivenih klasifikacijom ispitanika metodama induktivnog učenja prema kriteriju br. 4

REDNI BROJ ATRIBUTA	ATRIBUT	GRANIČNE VRIJEDNOSTI	KLASIFIKACIJSKA SPOSOBNOST	
			Osjetljivost %	Specifičnost %
1.	limfociti	≤ 35,40 %	56,7	89,4
2.	monociti	>7,95 %	59,7	84,2
3.	debljina kožnog nabora	≤ 34,50 mm	65,6	73,6
4.	fT ₄	≤ 14,5 pmol/L	71,6	63,1
5.	dob	> 65,5 god.	71,6	63,1
6.	TSH	>1,39 UI/ml	59,7	68,4

Tablica 17. pokazuje 6 najznačajnijih parametara zdravstvenog stanja (atributa) koji najbolje opisuju zdravstveni status cijepljenih osoba koje prema kriteriju za klasifikaciju ispitanika br. 4 slabo reagiraju na cjepivo protiv influence. Broj ispitanika u ciljnoj klasi je 67, a u negativnoj klasi 19.

Ti parametri, po redu značajnosti, su: 1.smanjen postotak limfocita i 2.povećan postotak monocita u diferencijalnoj krvnoj slici, 3.povećana debljina kožnog nabora iznad nadlaktice, znak proteinske malnutricije, 4.smanjena serumska koncentracija hormona tiroksina (fT₄), znak hipofunkcije štitne žlijezde, uključujući i njen subklinički oblik, 5.starija dob i 6.povećana serumska koncentracija tireoidnog stimulirajućeg hormona (TSH), znak latentne hipotireoze.

Osjetljivost tih parametara se kreće od 56,7-71,6%, a specifičnost od 63,1-89,4%.

Pomoću prva 2 atributa na listi koji ukazuju na smanjen postotak limfocita, a povećan postotak monocita u diferencijalnoj krvnoj slici, se mogu najpreciznije identificirati osobe koje bi mogle slabo serološki reagirati na cjepivo protiv influence (dobra specifičnost), ali se na taj način može obuhvatiti samo dio takvih osoba (nedovoljna osjetljivost).

Test osjetljivosti i specifičnosti za atribut dob (br. 5) ukazuje da većinu osoba sa slabom serološkom reakcijom na cjepivo protiv influence čine osobe starije dobi (bolja osjetljivost), ali da ima i osoba starije dobi koje reagiraju dobro (slabija specifičnost).

Tablica 18. Zbirni prikaz najznačajnijih parametara zdravstvenog stanja (atributa) dobivenih usporedbom rezultata 4 klasifikacijska postupka

BROJ KLASIFIKACIJSKOG POSTUPKA	ATRIBUTI SPECIFIČNI ZA POJEDINU KLASIFIKACIJU	ATRIBUTI KOJI SE PREKLAPAJU U DVIJE I VIŠE KLASIFIKACIJA
1	klirens kreatinina homocistein	monociti % vitamin B ₁₂ fT ₄ debljina kožnog nabora
2	<i>H. pylori</i> IgA γ-globulini prolaktin	monociti % MCV (vitamin B ₁₂) β-globulini
3	glukoza u krvi albumin	monociti % limfociti % fT ₄ β-globulini
4	dob TSH	monociti % limfociti % fT ₄ debljina kožnog nabora

Iz tablice 18. je vidljivo da je pomoću 4 kriterija za klasifikaciju ispitanika, primjenom metoda induktivnog učenja, iz baze podataka, od ukupno 52 atributa, izdvojeno 16 različitih atributa.

Neki od tih atributa se preklapaju u 2 ili više klasifikacija. To je utvrđeno za 7 atributa, a to su: postotak mononuklearnih leukocita i limfocita u diferencijalnoj krvnoj slici, vitamin B₁₂ (ili njegov ekvivalent - parametar MCV), hormon štitne žlijezde tiroksin (fT₄), β-globulini, te debljina kožnog nabora iznad nadlaktice.

Atributi specifično dobiveni u pojedinoj od klasifikacija ukazuju na specifičnu podskupinu osoba, ili specifično, relativno dobro definirano kliničko stanje. Ti atributi su:

1. klirens kreatinina i aminokiselina homocistein koji opisuju kliničko stanje „**smanjena bubrežna funkcija / hiperhomocisteinemija**“
2. IgA protutijela specifična za mikroorganizam *Helicobacter pylori*, znak gastritisa, γ-globulini, te hormon prednjeg režnja hipofize prolaktin, koji opisuju kliničko stanje „**gastritis/ kronična imunizacija / poremećaji hipotalamusa i prednjeg režnja hipofize**“
3. glukoza u krvi na tašte i albumin u serumu koji opisuju kliničko stanje „**poremećaj metabolizma glukoze / upala / proteinska malnutricija**“
4. starija dob i hormon prednjeg režnja hipofize TSH koji opisuju kliničko stanje „**starenje / poremećaji hipotalamusa i prednjeg režnja hipofize**“.

2. Definiranje patogenetskih poremećaja i kliničkih stanja pomoću dodatnih klasifikacijskih postupaka, primijenjenih za pojedine od selekcioniranih parametara

Tablica 19. Lista najznačajnijih atributa dobivenih klasifikacijom ispitanika metodama induktivnog učenja prema kriteriju **limfociti \leq 35,1 %**

REDNI BROJ ATRIBUTA	ATRIBUT	GRANIČNE VRIJEDNOSTI	KLASIFIKACIJSKA SPOSOBNOST	
			Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)
1.	neutrofilni leukociti	>49,55 %	93,3	83,3
2.	HbA1c	\leq 4,05 %	60,0	75,0
3.	<i>Helicobacter pylori</i> IgA	>10,35 IU/ml	64,4	62,5
4.	klirens kreatinina	\leq 1,55 ml/s/1.73m ²	66,7	60,4
5.	β -globulini	\geq 8,35 g/L	60,0	62,5
6.	monociti	>7,9 %	53,3	68,8

U tablici 19. su prikazani rezultati klasifikacijskog postupka prema kriteriju "limfociti \leq 35,1%". Taj atribut je dobiven iz baze podataka primarnim klasifikacijskim postupkom br. 3 (tablica 16) i ukazuje na smanjen postotak limfocita u diferencijalnoj krvnoj slici (relativnu limfopeniju). Broj ispitanika u ciljnoj klasi je 45, a u negativnoj klasi 48.

Iz tablice 19. je vidljivo da osobe s relativnom limfopenijom često imaju i povećan postotak monocita i neutrofilnih leukocita u diferencijalnoj krvnoj slici (atributi br.1 i 6), a praćen je i povećanim stupnjem upale (atribut br.5) i poremećajem metabolizma glukoze (atribut br.2). Od kliničkih stanja povezanih s limfopenijom, rezultati ukazuju na gastritis uzrokovan infekcijom mikroorganizmom *Helicobacter pylori* (atribut br.3) i smanjenu bubrežnu funkciju (atribut br.4).

Tablica 20. Lista najznačajnijih atributa dobivenih klasifikacijom ispitanika metodama induktivnog učenja prema kriteriju **vitamin B₁₂ \leq 212 pmol/L**

REDNI BROJ ATRIBUTA	ATRIBUT	GRANIČNE VRIJEDNOSTI	KLASIFIKACIJSKA SPOSOBNOST	
			Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)
1.	homocistein	>12,05 μ mol/L	73,0	73,2
2.	dob	> 67,5 god.	73,0	58,9
3.	monociti	>8,35 %	56,8	73,2
4.	debljina kožnog nabora	\geq 31,5 mm	56,8	69,6
5.	klirens kreatinina	\leq 1,55 ml/s/1.73m ² g/L	56,8	66,1
6.	folna kiselina	\leq 17 mM/L	48,6	76,8

U tablici 20. su prikazani rezultati klasifikacijskog postupka prema kriteriju "vitamin B₁₂ ≤ 212 pmol/L". Taj atribut je dobiven iz baze podataka primarnim klasifikacijskim postupkom br.1 (tablica 14) i ukazuje na smanjenu serumsku koncentraciju vitamina B₁₂, znak deficita toga vitamina. Broj ispitanika u ciljnoj klasi je 37, a u negativnoj klasi 56.

Iz tablice 20. je vidljivo da je većina osoba s deficitom vitamina B₁₂ starije dobi (atribut br.2), te da se taj poremećaj javlja skupa s deficitom folne kiseline (atribut br. 6) i hiperhomocisteinemijom (atribut br.1), a praćen je i povećanom aktivnošću monocita i proteinskom malnutricijom (atributi br.3 i 4). Od kliničkih stanja, deficit toga vitamina se često može naći u osoba sa smanjenom bubrežnom funkcijom (atribut br.5).

Tablica 21. Lista najznačajnijih atributa dobivenih klasifikacijom ispitanika metodama induktivnog učenja prema kriteriju **homocistein >12,7 μmol/L**

REDNI BROJ ATRIBUTA	ATRIBUT	GRANIČNE VRIJEDNOSTI	KLASIFIKACIJSKA SPOSOBNOST	
			Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)
1.	folna kiselina	≤ 17,75 mM/L	63,0	80,4
2.	HbA1c	≤ 4,11 %	69,6	73,9
3.	vitamin B ₁₂	≤ 225,5 pmol/L	60,9	80,4
4.	klirens kreatinina	≤1,69 ml/s/1.73m ² g/L	73,9	63,0
5.	glukoza u krvi	≤ 5,65 mmol/L	87,0	52,2
6.	prolaktin	> 90,24 mIU/L	71,7	58,7

U tablici 21. su prikazani rezultati klasifikacijskog postupka prema kriteriju "homocistein >12,7 μmol/L". Taj atribut je dobiven iz baze podataka primarnim klasifikacijskim postupkom br.1 (tablica 14) i ukazuje na povećanu serumsku koncentraciju aminokiseline homocistein (hiperhomocisteinemiju). Broj ispitanika i u ciljnoj i u negativnoj klasi je 46 (jedan ispitanik koji je imao graničnu vrijednost ciljnog atributa je isključen iz analize).

Iz tablice 21. je vidljivo da se taj poremećaj može naći pretežno u osoba sa smanjenom bubrežnom funkcijom (atribut br.4), te da se često pojavljuje skupa s poremećajem metabolizma glukoze (atributi br.2i5) i povećanom serumskom koncentracijom hormona hipofize prolaktina (hiperprolaktinemijom) (atribut br.6).

Iz tablica 20. i 21. je vidljivo da se preklapaju atributi koji ukazuju na deficit vitamina B₁₂ i folne kiseline, te hiperhomocisteinemiju, što znači da su ti poremećaji međusobno povezani, odnosno da se često pojavljuju skupa.

Tablica 22. Lista najznačajnijih atributa dobivenih klasifikacijom ispitanika metodama induktivnog učenja prema kriteriju **β -globulini >8,5 g/L**

REDNI BROJ ATRIBUTA	ATRIBUT	GRANIČNE VRIJEDNOSTI	KLASIFIKACIJSKA SPOSOBNOST	
			Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)
1.	kolesterol	<5,2 mmol/L	93,0	62,5
2.	Helicobacter pylori IgA	>10,35 IU/ml	62,7	87,5
3.	C-reaktivni protein	>4,05 mg/L	76,7	68,7
4.	α_2 -globulini	>6,25 g/L	69,7	75,0
5.	hemoglobin	<129,5 g/L	79,0	62,5
6.	homocistein	>10,15 μ mol/L	76,7	62,5

U tablici 22. su prikazani rezultati klasifikacijskog postupka prema kriteriju “ β -globulini >8,5 g/L”. Taj atribut je dobiven iz baze podataka primarnim klasifikacijskim postupkom br.2 (tablica 15) i ukazuje na blago povećanu serumsku koncentraciju β -globulina, proteina akutne faze upale, što je znak blagog stupnja upale. Broj ispitanika u ciljnoj klasi je 43, a u negativnoj klasi 46 (četiri ispitanika koja su imala granične vrijednosti ciljnog atributa su isključena iz analize).

Iz tablice 22. je vidljivo da osobe s povećanim stupnjem upale često imaju i poremećaje kao što su: smanjena serumska koncentracija kolesterola (atribut br.1), povećana serumska koncentracija drugih proteina akutne faze upale (atributi br.3 i 4), te blaga anemija (atribut br.5). Od kliničkih stanja, razvoju upale najviše doprinosi kronični gastritis (atribut br.2). Od drugih poremećaja, upali doprinosi i hiperhomocisteinemija (atribut br.6).

Tablica 23. Lista najznačajnijih atributa dobivenih klasifikacijom ispitanika metodama induktivnog učenja prema kriteriju **debljina kožnog nabora $\geq 32,5$ mm**

REDNI BROJ ATRIBUTA	ATRIBUT	GRANIČNE VRIJEDNOSTI	KLASIFIKACIJSKA SPOSOBNOST	
			Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)
1.	BMI	$\leq 28,51$ kg/m ²	74,4	80,0
2.	monociti	> 7,95 %	74,4	68,0
3.	obujam nadlaktice	$\leq 32,5$ cm	81,4	62,0
4.	folna kiselina	$\leq 19,65$ mM/L	69,8	64,0
5.	dob	> 67,5 god.	72,1	62,0
6.	vitamin B ₁₂	$\leq 235,5$ pmol/L	60,5	70,0

U tablici 23. su prikazani rezultati klasifikacijskog postupka prema kriteriju “debljina kožnog nabora iznad nadlaktice $\geq 32,5$ mm”. Taj atribut je dobiven iz baze podataka

primarnim klasifikacijskim postupkom br.1 (tablica 14) i pokazatelj je proteinske malnutricije. Broj ispitanika u ciljnoj klasi je 43, a u negativnoj klasi 50.

Iz tablice 23. je vidljivo da je proteinska malnutricija značajka starije dobi (atribut br.5), te da je najbolje opisuju drugi atributi koji su također pokazatelji proteinske malnutricije (atributi br.1 i 3), kao i pokazatelji upale (atribut br.2), te drugih oblika malnutricije, kao što su deficit vitamina B₁₂ i folne kiseline (atributi br.4 i 6).

Tablica 24. Lista najznačajnijih atributa dobivenih klasifikacijom ispitanika metodama induktivnog učenja prema kriteriju $fT_4 \leq 13,6 \text{ pmol/L}$

REDNI BROJ ATRIBUTA	ATRIBUT	GRANIČNE VRIJEDNOSTI	KLASIFIKACIJSKA SPOSOBNOST	
			Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)
1.	Helicobacter pylori IgA	>12,25 IU/ml	60,0	75,5
2.	glukoza u krvi	≤ 5,45 mmol/L	77,5	54,7
3.	kortizol	> 365,1nmol/L	62,5	64,2
4.	eozinofili	≤ 3,15 %	60,0	64,2
5.	β-globulini	≥ 8,35 g/L	65,0	56,6
6.	hemoglobin	<136,5 g/L	62,5	60,4

U tablici 24. su prikazani rezultati klasifikacijskog postupka prema kriteriju „ $fT_4 \leq 13,65 \text{ pmol/L}$ “. Taj atribut je dobiven iz baze podataka primarnim klasifikacijskim postupcima (tablice 14 i 16) i predstavlja smanjenu serumsku koncentraciju hormona tiroksina, kao znak hipofunkcije štitne žlijezde (hipotireoze). Broj ispitanika u ciljnoj klasi je 40, a u negativnoj klasi 53.

Rezultati prikazani u tablici 24. ukazuju da osobe s hipotireozom često imaju i kronični gastritis uzrokovan infekcijom bakterijom *Helicobacter pylori* (atribut br.1), a od drugih poremećaja, to su još i kronična upala (atributi br.5 i 6), smanjena imunosna reakcija humoralnog tipa (atribut br.4), te aktivacija neuroendokrine osovine stresnog odgovora (atribut br.3).

Tablica 25. Lista najznačajnijih atributa dobivenih klasifikacijom ispitanika metodama induktivnog učenja prema kriteriju $\text{klirens kreatinina} \leq 1,55 \text{ ml/s/1.73m}^2$

REDNI BROJ ATRIBUTA	ATRIBUT	GRANIČNE VRIJEDNOSTI	KLASIFIKACIJSKA SPOSOBNOST	
			Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)
1.	homocistein	>12,5 μmol/L	60,8	85,4
2.	prolaktin	> 95,33 mIU/L	72,5	65,9
3.	psihijatrijske bolesti	DA	66,7	78,0
4.	dob	> 67,5 god.	66,7	63,4
5.	glukoza u krvi	≤ 5,45 mmol/L	60,8	65,9
6.	fT_3	≤ 5,36 pmol/L	56,9	73,2

U tablici 25. su prikazani rezultati klasifikacijskog postupka prema kriteriju „klirens kreatinina $\leq 1,55 \text{ ml/s/1.73m}^2$ “. Taj atribut je dobiven iz baze podataka klasifikacijskim postupkom br.1 (tablica14) i pokazatelj je smanjene bubrežne funkcije - kronične bubrežne insuficijencije. Broj ispitanika u ciljnoj klasi je 51, a u negativnoj klasi 42.

Iz tablice 25. je vidljivo da je smanjena bubrežna funkcija značajka osoba starije dobi (atribut br.4) Dio tih osoba ima hiperhomocisteinemiju (osjetljivost za atribut br.1), a taj se poremećaj najčešće i pojavljuje u osoba sa smanjenom bubrežnom funkcijom, a rijetko vezano za druge poremećaje (specifičnost za atribut br.1). Dio osoba sa smanjenom bubrežnom funkcijom ima i poremećaj metabolizma glukoze, tipičan po nižim vrijednostima koncentracije glukoze u krvi (atribut br.5), a od drugih bitnih poremećaja, to su još i neuroendokrini poremećaji u obliku hiperprolaktinemije (atribut br.2) i hipotireoze (atribut br.6), te neuropsihijatrijske bolesti (atribut br.3).

S ciljem da se pobliže upozna klinički kontekst povezan s poremećajem metabolizma glukoze, učinjen je dodatni klasifikacijski postupak za parametar “glukoza $< 5,4 \text{ mmol/L}$ ”, prema atributu dobivenom u prethodnom klasifikacijskom postupku. Rezultati toga postupka su prikazani u tablici 26.

Tablica 26. Lista najznačajnijih atributa dobivenih klasifikacijom ispitanika metodama induktivnog učenja prema kriteriju **glukoza u krvi $< 5,4 \text{ mmol/L}$**

REDNI BROJ ATRIBUTA	ATRIBUT	GRANIČNE VRIJEDNOSTI	KLASIFIKACIJSKA SPOSOBNOST	
			Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)
1.	HbA _{1c}	$\leq 4,38 \%$	93,3	57,4
2.	Diabetes mellitus	NE	100,0	44,6
3.	BMI	$\leq 29,02 \text{ kg/m}^2$	70,0	61,7
4.	homocistein	$> 12,7 \mu\text{mol/L}$	56,6	76,5
5.	Folna kiselina	$\leq 16,8 \text{ mM/L}$	53,3	78,7
6.	γ -globulini	$> 13,05 \text{ g/L}$	56,6	70,2

U ciljnu klasu su uvršteni ispitanici s vrijednostima glukoze u krvi $< 5,4 \text{ mmol/L}$, a u kontrolnu skupinu ispitanici s vrijednostima glukoze u krvi $> 5,5 \text{ mmol/L}$, dok su ostali ispitanici (s vrijednostima glukoze $5,4\text{-}5,5 \text{ mmol/L}$) isključeni iz ove analize. Broj ispitanika u ciljnoj klasi je bio 30, a u negativnoj klasi 47.

Iz tablice 26. je vidljivo da poremećaj metabolizma glukoze nije povezan s dijabetesom (atribut br.2), nego se radi o sklonosti k trajno nižim vrijednostima glukoze u krvi (atribut br.1), često povezanoj s kroničnom upalom (atribut br.6), malnutricijom (atribut br.3), te hiperhomocisteinemijom (atribut br.4).

Iz tablica 25. i 26. je vidljivo da se parametar “homocistein” (atribut br.1, tablica 25. i atribut br.4, tablica 26.) preklapa u oba klasifikacijska postupka, što ukazuje na zajedničko pojavljivanje sva tri poremećaja: smanjene bubrežne funkcije, hiperhomocisteinemije i poremećaja metabolizma glukoze. Parametri koji se odnose na te poremećaje se preklapaju u sva tri klasifikacijska postupka koji opisuju te poremećaje (tablice 21,25 i 26).

Tablica 27. Lista najznačajnijih atributa dobivenih klasifikacijom ispitanika metodama induktivnog učenja prema kriteriju **Helicobacter pylori IgA >11,80 IU/ml**

REDNI BROJ ATRIBUTA	ATRIBUT	GRANIČNE VRIJEDNOSTI	KLASIFIKACIJSKA SPOSOBNOST	
			Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)
1.	Helicobacter pylori IgG	>79,4 IU/ml	76,3	73,5
2.	fT ₄	≤14,1 pmol/L	66,1	67,6
3.	albumin	≤ 46,3 g/L	59,3	70,6
4.	γ-globulini	>12,05 g/L	66,1	58,8
5.	limfociti	≤ 35,1 %	54,2	67,6
6.	eozinofili	≤ 3,15 %	54,2	67,6

U tablici 27. su prikazani rezultati klasifikacijskog postupka prema kriteriju „Helicobacter pylori IgA >11,80 IU/ml“. Taj atribut je dobiven iz baze podataka klasifikacijskim postupkom br.2 (tablica 15) i znak je kroničnog gastritisa uzrokovanog infekcijom bakterijom *Helicobacter pylori*. Broj ispitanika u ciljnoj klasi je 59, a u negativnoj klasi 34.

Rezultati prikazani u tablici 27. ukazuju na mehanizme upale (atribut br.3), kroničnu imunizaciju (atribut br.4), limfopeniju (atribut br.5), te smanjenu humoralnu imunosnu reakciju (atribut br.6), kao poremećaje često povezane s kroničnim gastritisom.

Nadalje, iz tablice 27. je vidljivo da većina osoba s kroničnim gastritisom koje slabo reagiraju na cjepivo protiv influence, osim povećane serumske koncentracije specifičnih IgA protutijela, ima i povećanu koncentraciju specifičnih IgG protutijela, s predominacijom protutijela tipa IgG (atribut br.1). To je, prema kriterijima, dijagnostički znak jače uznapredovalih stupnjeva gastritisa. Da bi se pobliže razotkrile značajke te podskupine osoba, dodatno je učinjen i klasifikacijski postupak za taj atribut. Rezultati toga postupka su prikazani u tablici 28.

Tablica 28. Lista najznačajnijih atributa dobivenih klasifikacijom ispitanika metodama induktivnog učenja prema kriteriju **Helicobacter pylori IgG >79,4 IU/ml**

REDNI BROJ ATRIBUTA	ATRIBUT	GRANIČNE VRIJEDNOSTI	KLASIFIKACIJSKA SPOSOBNOST	
			Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)
1.	Helicobacter pylori IgA	> 11,8 IU/ml	62,3	60,3
2.	fT ₄	≤ 14,1 pmol/L	71,4	56,9
3.	BMI	≤ 29,02 kg/m ²	85,7	44,8
4.	Obujam nadlaktice	≤ 30,5 cm	57,1	63,8
5.	fT ₃	< 5,6pmol/L	51,4	65,5
6.	IgE	≤ 46 kIU/L	54,3	62,1

Broj ispitanika u ciljnoj klasi je 35, a u negativnoj klasi 58.

Iz tablice 28. je vidljivo da je jedna od značajki osoba s jače uznapredovalim stupnjevima gastritisa proteinska malnutricija (atributi br.3 i 4).

Rezultati u tablicama 27. i 28. ukazuju na smanjenu imunost humoralnog tipa (atribut br. 6, tablice 27 i 28.), te veću učestalost hipotireoze (atribut br.2, tablica 27. i atributi br.2 i 5, tablica 28.), u osoba s kroničnim gastritisom.

Tablica 29. Lista najznačajnijih atributa dobivenih klasifikacijom ispitanika metodama induktivnog učenja prema kriteriju **prolaktin >90,24 mIU/L**

REDNI BROJ ATRIBUTA	ATRIBUT	GRANIČNE VRIJEDNOSTI	KLASIFIKACIJSKA SPOSOBNOST	
			Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)
1.	klirens kreatinina	$\leq 1,59$ ml/s/1.73m ²	62,3	77,5
2.	homocistein	$>12,05$ μ mol/L	60,4	75,0
3.	dob	$> 65,5$ god.	75,5	52,5
4.	monociti	$> 7,85$ %	71,7	52,5
5.	neuropsihijatrijske bolesti	DA	52,8	70,0
6.	debljina kožnog nabora	$\geq 35,5$ mm	71,7	52,5

U tablici 29. su prikazani rezultati klasifikacijskog postupka prema kriteriju „prolaktin >90,24 mIU/L“. Taj atribut je dobiven iz baze podataka primarnim klasifikacijskim postupkom br. 2 (tablica 15) i ukazuje na povećanu serumsku koncentraciju hormona prednjeg režnja hipofize prolaktina (hiperprolaktinemiju). Broj ispitanika u ciljnoj klasi je 53, a u negativnoj klasi 40.

Iz tablice 29. je vidljivo da se hiperprolaktinemija često može naći u osoba starije dobi (atribut br.3, osjetljivost 75,5%) i to u onih sa smanjenom bubrežnom funkcijom praćenom hiperhomocisteinemijom, te u onih s neuropsihijatrijskim poremećajima (veća specifičnost za attribute „klirens kreatinina“, „homocistein“ i „neuropsihijatrijske bolesti“, nego za atribut „dob“).

Za atribut „neuropsihijatrijske bolesti“ je učinjen dodatni klasifikacijski postupak, da bi se поближе razotkrile značajke osoba s dijagnozom tih bolesti. Rezultati toga postupka su prikazani u tablici 30.

Tablica 30. Lista najznačajnijih atributa dobivenih klasifikacijom ispitanika metodama induktivnog učenja prema kriteriju **neuropsihijatrijske bolesti**

REDNI BROJ ATRIBUTA	ATRIBUT	GRANIČNE VRIJEDNOSTI	KLASIFIKACIJSKA SPOSOBNOST	
			Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)
1.	klirens kreatinina	$\leq 1,68$ ml/s/1.73m ²	77,5	60,37
2.	homocistein	$> 12,5$ μ mol/L	52,5	71,69
3.	monociti	$> 7,35$ %	57,5	69,81
4.	prolaktin	$> 95,33$ mIU/L	70,0	54,71
5.	Helicobacter pylori IgA	$> 10,1$ IU/ml	65,0	58,49
6.	folna kiselina	$\leq 16,25$ mM/L	45,0	83,0

Broj ispitanika u ciljnoj klasi je 40, a u negativnoj klasi 53.

Iz tablice 30. je vidljivo da se od kliničkih stanja, neuropsihijatrijske bolesti najčešće pojavljuju skupa s kroničnom bubrežnom insuficijencijom (atribut br.1) i kroničnim gastritisom (atribut br.5).

Neuropsihijatrijske bolesti češće imaju one osoba s kroničnom bubrežnom insuficijencijom koje istovremeno imaju i hiperhomocisteinemiju (veća specifičnost za atribut "homocistein", nego atribut "klirens kreatinina").

Povezanost između neuropsihijatrijskih bolesti i hiperprolaktinemije je takva da većina osoba s neuropsihijatrijskim bolestima ima i hiperprolaktinemiju, ali ima i osoba s hiperprolaktinemijom bez neuropsihijatrijskih bolesti (mala specifičnost za atribut prolaktin).

Tablica 31. Lista najznačajnijih atributa dobivenih klasifikacijom ispitanika metodama induktivnog učenja prema kriteriju **dob>65,5 god.**

REDNI BROJ ATRIBUTA	ATRIBUT	GRANIČNE VRIJEDNOSTI	KLASIFIKACIJSKA SPOSOBNOST	
			Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)
1.	debljina kožnog nabora	$\geq 31,5$ mm	62,0	83,7
2.	vitamin B ₁₂	$\leq 252,5$ pmol/L	72,0	67,4
3.	klirens kreatinina	$\leq 1,68$ ml/s/1.73m ²	80,0	60,5
4.	homocistein	$> 12,5$ μ mol/L	58,0	79,1
5.	folna kiselina	$\leq 20,35$ mM/L	70,0	60,5
6.	hemoglobin	$< 129,5$ g/L	60,0	74,4

Broj ispitanika u ciljnoj klasi je 50, a u negativnoj klasi 43.

U tablici 31. su prikazani rezultati klasifikacijskog postupka prema kriteriju "dob>65,5 godina". Taj atribut je dobiven primarnim klasifikacijskim postupkom br. 4 (tablica 17) i predstavlja osobe starije dobi (>65 god).

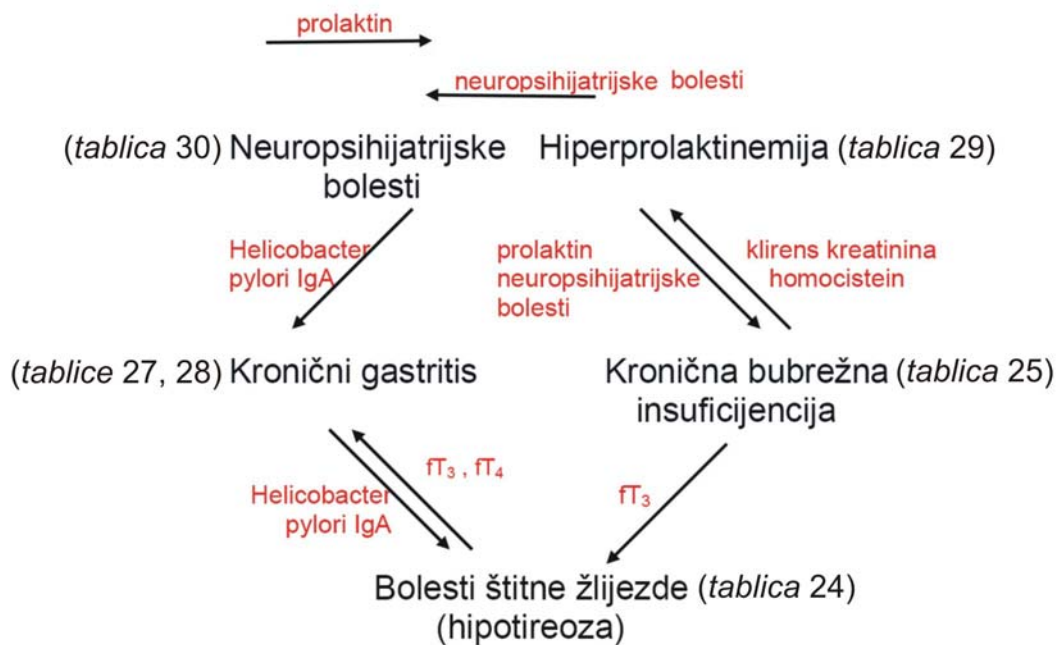
Iz tablice 31. je vidljivo da se, od kliničkih stanja, u osoba starije dobi najčešće nalazi smanjena bubrežna funkcija (atribut br.3) koja je u tih osoba često praćena i hiperhomocisteinijom i proteinskom malnutricijom (veća specifičnost za attribute "homocistein" i "debljina kožnog nabora", nego za atribut "klirens kreatinina").

Tablica 32. Definiranje prepoznatljivih patogenetskih poremećaja i kliničkih stanja uz pomoć rezultata dodatnih klasifikacijskih postupaka

PATOGENETSKI POREMEĆAJI I KLINIČKA STANJA	GRUPIRANI ATRIBUTI
1. pomicanje ravnoteže imunskog odgovora od specifične prema nespecifičnoj i staničnoj imunosti (tablice 16,17i19)	smanjen % limfocita, a povećan % mononuklearnih i neutrofilnih leukocita u diferencijalnoj krvnoj slici
2. deficit vitamina B ₁₂ i folne kiseline, Hiperhomocisteinijom (tablice 14,20i21)	Smanjena serumska koncentracija vitamina B ₁₂ i folne kiseline, a povećana koncentracija aminokiseline homocistein
3. blaga kronična upala, kronična imunizacija, proteinska malnutricija (tablice 14,15,16,17,22i23)	Promjene u koncentraciji serumskih proteina akutne faze upale (albumin, α ₂ -,β - i γ - globulini, C-reaktivni protein), povećana debljina kožnog nabora
4. hipofunkcija hormona štitne žlijezde (hipotireoza) (tablice 14,16,17,27i28))	smanjena serumska koncentracija hormona fT ₄ i fT ₃ povećana serumska koncentracija hormona TSH
5. kronična bubrežna insuficijencija s hiperhomocisteinijom i poremećajem metabolizma glukoze (tablice 14,16,21,25i26)	smanjen klirens kreatinina, hiperhomocisteinijom, snižena koncentracija glukoze u krvi
6. kronični gastritis uzrokovan infekcijom mikroorganizmom <i>Helicobacter pylori</i> (tablice 15,27i28)	povećana serumska koncentracija IgA i IgG protutijela specifičnih za mikroorganizam <i>Helicobacter pylori</i>
7. mentalni i neurodegenerativni poremećaji praćeni hiperprolaktinijom (tablice15,17,29i30)	povećana serumska koncentracija hormona prednjeg režnja hipofize prolaktina (i TSH), neuropsihijatrijske bolesti
8. starija dob (tablice17,20,23,25i29)	dob > 65 godina

U tablici 32. su zbirno prikazani prepoznatljivi patogenetski poremećaji definirani na osnovi grupiranja atributa u primarnim klasifikacijskim postupcima, te njihovog preklapanja u dodatnim klasifikacijskim postupcima, te u skladu s postojećim znanjem (tablice 14-31).

Neki od njih predstavljaju intermedijarne mehanizme (1-3), a neki bolje definirana klinička stanja (4-7, sjenčano).



Slika 14. Shematski prikaz povezanosti četiri identificirana klinička stanja koja mogu utjecati na slabljenje serološke reakcije na cjepivo protiv influence

Na poveznicama (označeno crveno) su navedeni atributi koji se preklapaju između dodatnih klasifikacijskih postupaka koji ukazuju na te kliničke poremećaje.

Preklapanje atributa u tablicama 29 i 30 ukazuje na povezanost između **neuropsihijatrijskih bolesti i hiperprolaktinemije**.

Preklapanje atributa u tablicama 25 i 29 ukazuje na povezanost između **kronične bubrežne insuficijencije praćene hiperhomocisteinemijom i neuropsihijatrijskih bolesti praćenih hiperprolaktinemijom**.

Preklapanje atributa u tablicama 27 i 28 i 30 ukazuje na povezanost između **kroničnog gastritisa i neuropsihijatrijskih bolesti praćenih hiperprolaktinemijom**.

Preklapanje atributa u tablicama 24 i 27 i 28 ukazuje na povezanost između **bolesti štitne žlijezde (hipotireoze) i kroničnog gastritisa**.

Preklapanje atributa u tablicama 24 i 25 ukazuje na povezanost između **kronične bubrežne insuficijencije i hipotireoze**.

III. ZAJEDNIČKI UTJECAJ DOBI, PRETHODNOG ANTIGENSKOG ISKUSTVA I POREMEĆAJA ZDRAVSTVENOG STANJA NA UČINKOVITOST CIJEPLJENJA

Tablica 33. Rezultati logističke regresijske analize, s uključenim svim parametrima, o utjecaju dobi, prethodnog antigenškog iskustva i poremećaja zdravstvenog stanja na učinkovitost cijepljenja protiv influence (odds ratios-OR i 95% confidence interval-CI)

PARAMETAR	OR	95% CI	STUPANJ ZNAČAJNOSTI p-vrijednost
Dob	1,074	0,961 – 1,200	0,207
Glukoza u krvi	0,836	0,594 – 1,176	0,304
Debljina kožnog nabora	1,070	0,950 – 1,205	0,264
Prethodno cijepljeni (nisu)			0,084
Prethodno cijepljeni (1x)	0,306	0,037 – 2,495	0,268
Prethodno cijepljeni (2-3x)	0,062	0,006 – 0,634	0,019
Prethodno cijepljeni (≥4 x)	0,130	0,010 – 1,657	0,116
Helicobacter pylori IgA	1,000	0,985 – 1,015	0,977
Monociti %	1,234	0,848 – 1,795	0,272
Limfociti %	0,961	0,883 – 1,047	0,364
MCV	1,025	0,900 – 1,167	0,711
Albumin	1,292	0,966 – 1,730	0,085
Klirens kreatinina	2,534	0,295 – 21,78	0,397
Homocistein	1,108	0,878 – 1,399	0,388
β-globulini	0,652	0,305 – 1,392	0,269
γ-globulini	1,330	0,939 – 1,885	0,109
Vitamin B ₁₂	0,998	0,992 – 1,003	0,380
Prolaktin	1,003	0,996 – 1,010	0,397
TSH	2,014	0,930 – 4,361	0,076
fT ₄	0,855	0,619 – 1,183	0,345
H ₁ N ₁ -ostatni titar	0,972	0,926 – 1,021	0,256
H ₃ N ₂ -ostatni titar	1,004	0,992 – 1,016	0,494
B/Sicuan-ostatni titar	1,050	1,003 – 1,100	0,038
B/Hong Kong-ostatni titar	1,003	0,996 – 1,011	0,412

U tablici 33. su prikazani rezultati logističke regresijske analize, metode s uključenim svim parametrima, primijenjene za analizu zajedničkog utjecaja dobi, broja prethodnih cijepljenja (izraženog kao kategorije cijepljenog statusa: nisu cijepljeni N=37, 1x cijepljeni N=19, 2-3x cijepljeni N=13 i ≥4x cijepljeni N=24), visine ostatnog titra protutijela za 4 testirana antigena virusa influence, te 16 parametara zdravstvenog stanja, dobivenih kao značajnih iz baze podataka primjenom metoda induktivnog učenja.

Rezultati te analize pokazuju da je cijeplni status (broj prethodnih cijepljenja) najvažniji prediktor učinkovitosti cijepljenja prema kriteriju da se dobrom reaktivnošću smatra ≥4x porast titra protutijela na 2 ili 3 komponente cjepiva, dok se slabom reaktivnošću smatra takav serološki odgovor na samo jednu, ili ni jednu komponentu cjepiva. Pri tome, prethodno cijepljenje od 2-3 puta ima značajan povoljan učinak na učinkovitost cijepljenja (OR 0,062, 95% CI 0,006-0,634).

Osim toga, rezultati te analize ukazuju i na značajan negativan utjecaj heterologne imunostne reakcije na učinkovitost cijepljenja koju u ovom radu predstavlja antigen virusa influence B/Sicuan (OR 1,050, 95% CI 1,003-1,100).

Sposobnost procjene učinkovitosti cijepljenja, prema navedenom kriteriju, pomoću ovoga modela je 76,9%, ($p=0,002$) s ograničenjem da su rezultati dobiveni na malom uzorku ispitanika (slabo reagirali $N=58$, dobro reagirali $N=35$, ukupno $N=93$).

Tablica 34. Rezultati logističke regresijske analize, metode uključivanja (forward), o utjecaju dobi, prethodnog antigenskog iskustva i poremećaja zdravstvenog stanja na učinkovitost cijepljenja protiv influence (odds ratios-OR i 95% confidence interval-CI)

PARAMETAR	OR	95% CI	STUPANJ ZNAČAJNOSTI p-vrijednost
Prethodno cijepljeni (nisu)			0,013
Prethodno cijepljeni (1x)	0,127	0,025 – 0,644	0,013
Prethodno cijepljeni (2-3x)	0,050	0,008 – 0,303	0,001
Prethodno cijepljeni (≥ 4 x)	0,105	0,014 – 0,779	0,028
Limfociti %	0,942	0,889 – 0,998	0,043
Homocistein	1,150	0,998 – 1,326	0,053

U tablici 34. su prikazani rezultati logističke regresijske analize, metode postepenog uključivanja parametara (forward), primijenjene za analizu zajedničkog utjecaja dobi, broja prethodnih cijepljenja (izraženog kao kategorije cijepnog statusa: nisu cijepljeni $N=37$, 1x cijepljeni $N=19$, 2-3x cijepljeni $N=13$ i ≥ 4 x cijepljeni $N=24$), visine ostatnog titra protutijela za 4 testirana antigena virusa influence, te 16 značajnih parametara zdravstvenog stanja, dobivenih prethodnom primjenom metoda induktivnog učenja na bazu podataka.

Analiza je završila u 3. koraku, s postignutom predikcijskom snagom modela od 75,8 % ($p=0,041$), za navedene kriterije učinkovitosti cijepljenja.

Rezultati te analize pokazuju da je cijepni status (broj prethodnih cijepljenja) najznačajniji prediktor učinkovitosti cijepljenja, s tim da prethodno cijepljenje od 1 ili više puta ima povoljan učinak na rezultat sadašnjeg cijepljenja (1x cijepljeni OR 0,127, 95% CI 0,025-0,644), (2-3x cijepljeni OR 0,050, 95% CI 0,008-0,303), (≥ 4 x cijepljeni OR 0,105, 95% CI 0,014-0,779).

Poremećaji zdravstvenog stanja i to smanjen postotak limfocita u diferencijalnoj krvnoj slici i povećana serumska koncentracija aminokiseline homocistein mogu u manjoj mjeri (granična značajnost, $p=0,043$ za limfocite% i $p=0,053$ za homocistein) utjecati na učinkovitost cijepljenja, na taj način da je oslabljuju (za limfocite % OR 0,942, 95% CI 0,889-0,998), (za homocistein OR 1,150, 95% CI 0,998-1,326).

Rezultati ove analize pokazuju da uvođenje parametara zdravstvenog stanja u model (3.korak analize) povećava negativnu prediktivnu vrijednost modela - za slabo reagiranje na cjepivo protiv influence (odnos pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti modela je 68,6/80,4%, srednja vrijednost 75,8%), u odnosu na model koji sadrži samo varijablu koja ukazuje na broj prethodnih cijepljenja (1.korak analize,

odnos pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti modela je 34,3/68,1%, dok je ukupna prediktivna vrijednost modela 68,1%),

Tablica 35. Rezultati logističke regresijske analize, metode isključivanja (backward), o utjecaju dobi, prethodnog antigenskog iskustva i poremećaja zdravstvenog stanja na učinkovitost cijepljenja protiv influence (odds ratios-OR i 95% confidence interval-CI)

PARAMETAR	OR	95% CI	STUPANJ ZNAČAJNOSTI p-vrijednost
Prethodno cijepljeni nisu)			0,023
Prethodno cijepljeni (1x)	0,187	0,035 – 0,997	0,050
Prethodno cijepljeni (2-3x)	0,059	0,009 – 0,367	0,002
Prethodno cijepljeni (≥ 4 x)	0,126	0,017 – 0,917	0,041
Limfociti %	0,939	0,880 – 1,001	0,052
Vitamin B ₁₂	0,998	0,994 – 1,002	0,278
B/Sicuan-ostatni titar	1,021	0,997 – 1,045	0,085

U tablici 35. su prikazani rezultati logističke regresijske analize, metode postepenog isključivanja parametara (backward), primijenjene za analizu zajedničkog utjecaja dobi, broja prethodnih cijepljenja (izraženog kao kategorije cijepnog statusa: nisu cijepljeni N=37, 1x cijepljeni N=19, 2-3x cijepljeni N=13 i ≥ 4 x cijepljeni N=24), visine ostatnog titra protutijela za 4 testirana antigena virusa influence, te 16 parametara zdravstvenog stanja, dobivenih kao značajnih iz baze podataka primjenom metoda induktivnog učenja.

Analiza je završila u 18. koraku, s postignutom snagom predikcije modela od 75,8% ($p=0,003$), za navedene kriterije učinkovitosti cijepljenja.

Rezultati te analize pokazuju da je najznačajniji prediktor učinkovitosti cijepljenja cijepni status, s tim da prethodno cijepljenje, posebno od 2-3 puta, ima povoljan učinak na rezultat sadašnjeg cijepljenja (OR 0,059, 95% CI 0,009-0,367).

Manji i to negativan utjecaj na učinkovitost cijepljenja imaju poremećaji zdravstvenog stanja, smanjen postotak limfocita u diferencijalnoj krvnoj slici (OR 0,939, 95% CI 0,880-1,001) i deficit vitamina B₁₂ (OR 0,998, 95% CI 0,994-1,002), kao i heterologna imunosna reakcija na antigen B/Sicuan (OR 1,021, 95% CI 0,997-1,045).

RASPRAVA

I. UVOD

Influenca (gripa) je visokokontagiozna respiratorna bolest koja se javlja u zimskim mjesecima u obliku epidemija. Za vrijeme epidemija influence može oboliti i do 40% pučanstva što influenci daje velik javnozdravstveni značaj (6). Bolest obično prolazi spontano, bez trajnih posljedica. Jedino u starijih osoba (>65 god) i osoba s kroničnim bolestima, influenza može dovesti do ozbiljnih komplikacija od strane respiratornog i kardiovaskularnog sustava. Zbog toga epidemije influence uvijek prati nagli porast broja bolničkih liječenja, morbiditeta i općeg mortaliteta (10). U preko 90% slučajeva se radi o osobama starije dobi (6). Zbog toga se redovito godišnje cijepljenje protiv influence najviše i preporučuje tim populacijskim skupinama (6,10, 98). Takav postupak se pokazao opravdanim iz zdravstvenih i ekonomskih razloga, jer značajno smanjuje rizik nastanka komplikacija i mortaliteta, a smanjuje i broj bolničkih liječenja, te općenito troškove zdravstvene skrbi (88). Narasla svijest o tome da se influenza može prevenirati je dovela do stvaranja globalnih akcijskih planova i strategija za sprečavanje epidemija influence (98,126). Cilj im je cijepljenjem obuhvatiti što veći dio populacije, prije svega one skupine za koje se smatra da imaju povećan rizik od nastanka komplikacija. Međutim, praktična implementacija takve strategije u velikoj mjeri ovisi o ekonomskoj moći i značajkama stanovništva pojedine zemlje. To znači da je u primjeni pojedinih protokola cijepljenja, ili drugih preventivnih mjera, važno procijeniti odnos koristi i koštanja (126,127).

Naime, nove sofisticirane tehnologije proizvodnje cjepiva nameću pitanje dostupnosti, učinkovitosti i specifičnih indikacija za primjenu pojedinih vrsta cjepiva, kao i opravdanosti dodatnih troškova cijepljenja (127,128,129). Javlja se potreba za izradom nacionalnih programa cijepljenja koji moraju voditi računa o tome da se u okviru planiranih troškova cijepljenjem postigne maksimalni obuhvat populacije i omogućiti zaštita od influence onima kojima je najviše potrebna i to na najučinkovitiji mogući način (98,126).

Takav organizirani pristup bi naročito mogao doći do izražaja u slučaju izbijanja pandemije influence. Tada bi zadatak bio osigurati optimalnu zaštitu pučanstva u situaciji ograničenih količina cjepiva, poteškoća u distribuciji i primjeni cjepiva i drugih organizacijskih poteškoća, kao i naglog rasta troškova zdravstvene skrbi (130,131). Slučajevi prijelaza „ptičje“ i „svinjske“ gripe na ljude posljednjih godina, odnosno

postojanje stalnog animalnog rezervoara virusa influence, podsjećaju na to da pojava pandemije influence u svakom trenutku može postati realna prijetnja za čovječanstvo (132).

Da postoji potreba za preciznijim definiranjem indikacijskih skupina za cijepljenje protiv influence, govore i rezultati novijih kliničkih radova. Pokazalo se npr. da iako je redovito godišnje cijepljenje starijih osoba protiv influence općenito ekonomski opravdano, to se nije moglo dokazati i za podskupinu zdravih starijih osoba (88,133). Slično tome, ima radova koji pokazuju da se učinak cijepljenja, u osoba s kroničnim bolestima za koje se smatra da pripadaju konvencionalno definiranim rizičnim skupinama, ne razlikuje od onoga u mlađih zdravih osoba (134,135). Čak i unutar iste rizične skupine, kao što su npr. stariji dijabetički bolesnici, postoji značajna razlika u rezultatima cijepljenja između pojedinih osoba (136). Misli se da bi, kada su u pitanju kronične bolesti, osim dijagnoze bolesti, mogao biti važan i stupanj uznapređovalosti bolesti, kao i prisustvo pratećih bolesti (komorbiditet). Čak bi i same životne navike, uključujući način prehrane, socijalne činitelje, ili deficit određenih mikronutritijenata, mogli pri tome biti od značaja (137,138).

Sve to nameće potrebu za preciznom identifikacijom čimbenika koji utječu na produkciju specifičnih protutitijela poslije cijepljenja, te za predviđanjem učinkovitosti cijepljenja pomoću matematičkih modela.

II. UTJECAJ ANTIGENSKOG ISKUSTVA I DOBI NA UČINKOVITOST CIJEPLJENJA

1. Utjecaj antigenskog iskustva (broja prethodnih cijepljenja i visine ostatnog titra protutijela) na učinkovitost cijepljenja

Zbog čestih antigenskih promjena virusa influence, cijepljenje protiv influence se provodi svake godine, trovalentnim cjepivom koje sadrži podtipove H_1N_1 i H_3N_2 virusa influence tipa A, te virus influence tipa B, što su sve epidemijski tipovi virusa koji cirkuliraju populacijom posljednjih desetljeća (6,11,139). Tim putem inducirana protektivna imunost je kratkog trajanja pa i zbog toga cijepljenje treba ponavljati svake godine (13). Nekoliko meta-analiza je potvrdilo da ponavljanje cijepljenje daje, ako ne bolji, onda barem jednak stupanj zaštite, kao što je onaj nakon prvog cijepljenja (16).

Naši rezultati pokazuju da se i pri prvom i ponovljenim cijepljenjima, u osoba starijih od 50 godina, s kroničnim bolestima, za komponente cjepiva A/H₃N₂ i B/Hong Kong postiže zaštitna visina titra protutijela u preko 80% cijepljenih osoba (tablice8i10). Lošiji uspijeh cijepljenja, sa zaštitnom visinom titra u 50-55% cijepljenih osoba, postiže se samo za komponentu cjepiva A/H₁N₁, poznatu po niskim titrovima protutijela, te čestim odsustvom ostatnog titra protutijela (tablica6) (13,15,17,140,141).

Naši rezultati, što je u skladu s rezultatima većine drugih studija, općenito pokazuju da serološki odgovor nakon cijepljenja, za sve tri komponente cjepiva, A/H₁N₁, A/H₃N₂ i B/Hong Kong, mjeren prosječnom visinom titra protutijela i postotkom osoba sa zaštitnim ($\geq 1:40$) titrom protutijela, ne ovisi o njihovom cijepnom statusu (tablice5-10) (13,15,141).

Za razliku od tih ranije objavljenih studija, rađenih na uzorku osoba srednje ili starije dobi, uglavnom zdravih i cijepljenih najviše dva do tri puta, u našu studiju su uključene starije osobe s nekoliko kroničnih bolesti i poremećaja zdravstvenog stanja, od kojih su neke cijepljene četiri i više pa sve do deset puta. Naši rezultati pokazuju da čak ni u tih osoba, u kojih bi imunosna reaktivnost mogla biti smanjena, zaštitni učinak cijepljenja nije oslabljen pa čak ni nakon brojnih uzastopnih cijepljenja (tablica11).

U posebnim slučajevima, kao na primjeru komponente cjepiva B/Hong Kong, ipak je moguće da se nakon brojnih uzastopnih cijepljenja, u odnosu na prvo cijepljenje, visina titra protutijela značajno smanji. Uzrok toj pojavi je heterologna (anamnestička) reakcija na antigen B/Sicuan koji se nalazio u sastavu starijih cjepiva. U prilog tome govori značajan porast ostatnog titra protutijela i titra protutijela nakon cijepljenja na antigen B/Sicuan, u skupini ispitanika koja je prethodno cijepljena 2-3 puta, što znači cjepivima koja su u svom sastavu sadržavala taj antigen (tablica11). Do značajnog smanjenja učinka cijepljenja na komponentu cjepiva B/Hong Kong je međutim došlo samo u ispitanika prethodno cijepljenih 4 i više puta, što može biti zbirni učinak heterolognih reakcija potaknutih brojnim varijantama komponente „B“ cjepiva, sadržanim u tim prethodnim cjepivima (tablica11). O inhibitornom učinku heterologne reakcije na učinkovitost cijepljenja svjedoče i rezultati drugih radova (12,14,15).

Rezultati dosadašnjih studija ukazuju da na učinkovitost cijepljenja inhibitorno može djelovati i visina ostatnog titra protutijela, što u našem radu dolazi do izražaja u rezultatima gdje je učinkovitost cijepljenja mjerena „četverostrukim ili većim porastom

titra protutijela“ (tablice 7 i 9) (13,14,141). Naime, za komponente cjepiva A/H₃N₂ i B/Hong Kong, do četverostrukog i većeg porasta titra protutijela nakon cijepljenja je u značajno većem postotku osoba došlo u skupini osoba koje se cijepu prvi put, nego u skupini osoba koje su prethodno već cijepljene, a koje imaju i značajno veću prosječnu visinu ostatnog titra protutijela, što je moglo inhibitorno djelovati na produkciju specifičnih protutijela poslije cijepljenja (tablice 7 i 9).

Rezultati koji se odnose na komponentu cjepiva A/H₁N₁ pokazuju da je ta komponenta specifična po vrlo niskim titrovima protutijela, kako ostatnim (prije cijepljenja), tako i titrovima protutijela poslije cijepljenja, što odgovara i podacima iz literature (tablice 5 i 11) (13,15,17,140,141).

Naši rezultati pokazuju, što je u skladu i s rezultatima drugih studija, da je ostatni titar protutijela na tu komponentu cjepiva nizak, ne samo kada je nastao kao posljedica imunizacije prirodnim putem (u skupini osoba koje se cijepu prvi put), nego i kao rezultat prethodnih cijepljenja (tablice 5 i 11) (13,14,17). Naime, u većine ispitanika uključenih u ovo ispitivanje, a to su osobe stare 50 i više godina, ostatni titar za tu komponentu cjepiva nije ni bio mjerljiv. To se može objasniti slabom primarnom imunizacijom tih osoba, rođenih u vrijeme kada su populacijom cirkulirale starije varijante toga tipa virusa influence, karakteristične po slaboj antigenskoj varijabilnosti (mali „antigenski drift“). To je bio razlog zbog kojega su tadašnje epidemije influence bile malih razmjera pa je i imunizacija populacije na taj tip virusa influence prirodnim putem bila slaba (13,14,17).

Nizak ostatni titar može biti uzrokom i relativno niskih titrova protutijela i nakon cijepljenja, što smo za ovu komponentu cjepiva također utvrdili (tablice 5 i 11). Naime, dosadašnje iskustvo pokazuje da osobe bez ostatnog titra protutijela imaju i nizak titar protutijela i nakon cijepljenja (13,14,17). Drugi mogući uzrok niskih titrova protutijela nakon cijepljenja, za ovu komponentu cjepiva, je blisko povezan s prvim, a to je cijepljenjem potaknuta imunosna reakcija na starije varijante toga tipa virusa, što je moglo umanjiti reakciju na antigenski slične novije varijante, sadržane u sastavu sadašnjeg cjepiva (pojava poznata kao primarno antigensko iskustvo, *original antigenic sin*) (139).

Niski titrovi protutijela su vjerojatno i razlog što je učinak cijepljenja, izražen kao postotak osoba sa zaštitnim ($\geq 1:40$) titrom protutijela, za ovu komponentu cjepiva, najlošiji (tablice 6, 8 i 10).

Da su niski titrovi protutijela poslije cijepljenja, za tu komponentu cjepiva, povezani sa starijom dobnom strukturom ispitanika uključenih u ovo ispitivanje - indirektno govore rezultati drugih studija. Tako se u studiji u kojoj su uzorak ispitanika činile osobe mlađe i srednje dobi, komponenta A/H₁N₁ cjepiva ponašala drugačije nego u našem radu, jer je nađena značajna povezanost između visine ostatnog titra protutijela i porasta titra i za tu, kao i za ostale dvije komponente primijenjenog cjepiva (13). Rezultati nekih drugih studija su pokazali da se najmanji postotak osoba sa zaštitnim titrom protutijela poslije cijepljenja, za tu komponentu cjepiva, nalazi upravo u skupini starijih osoba, posebno onih koje su imale nemjerljiv ostatni titar protutijela (17).

Da bi slab serološki odgovor na tu komponentu cjepiva mogao biti posljedica o dobi ovisnog iskustva primarne imunizacije, govore rezultati rada čiji su autori našli da za tu komponentu cjepiva (ali ne i druge dvije) postoji značajna povezanost između dobi i visine ostatnog titra protutijela. Međutim, samo se visina ostatnog titra protutijela, ali ne i dob, pokazala samostalnim čimbenikom koji ima utjecaja na porast titra protutijela poslije cijepljenja (95).

Međutim, ni mogućnost da su niski titrovi protutijela, kao i slab serološki odgovor, za tu komponentu cjepiva, direktna posljedica starije dobi i s dobi povezanih kroničnih bolesti i poremećaja zdravstvenog stanja - ne može se sa sigurnošću isključiti.

Za razliku od komponente A/H₁N₁, komponentu A/H₃N₂ karakteriziraju visoki titrovi rezidualnih protutijela (ostatni titrovi), koji perzistiraju u serumu kao rezultat prošlih infekcija i prethodnih cijepljenja (tablice 7 i 11).

Naši rezultati su u skladu s poznatim značajkama podtipa H₃N₂ virusa influence tipa „A“ da potiče stvaranje visokih titara protutijela, što se povezuje s njegovom velikom antigenskom varijabilnošću, te većim epidemijama i boljom prirodnom imunizacijom populacije. Naime, taj tip virusa influence se nije bitno antigenski mijenjao od kako se sa pandemijom 1968. godine prvi puta pojavio u populaciji (10,17). Te njegove značajke vjerojatno uzrokuju visoke titrove protutijela koji se za tu komponentu cjepiva mogu naći čak i u osoba starije dobi, a visoki titrovi protutijela su vjerojatno i razlogom što je gotovo 100% osoba uključenih u ovo ispitivanje, neovisno o svom cijepnom statusu, cijepljenjem postiglo zaštitnu visinu titra protutijela (tablica 8).

Teorijski postoji mogućnost da visoki ostatni titrovi protutijela, zbog svog inhibirajućeg utjecaja, dovedu do smanjenja titra protutijela poslije cijepljenja. Takva tendencija je i vidljiva nakon 5 i više uzastopno ponovljenih cijepljenja (tablica 11). Međutim, vjerojatno upravo zbog sklonosti za produkciju visokih titara protutijela, čak ni brojno

uzastopno cijepljenje ne utječe negativno na zaštitni učinak cijepljenja na tu komponentu cjepiva, jer većina cijepljenih osoba ipak uspijeva postići zaštitnu visinu ($\geq 1:40$) titra protutijela (tablica8).

2. Utjecaj (starije) dobi na učinkovitost cijepljenja protiv influence

Učinak cijepljenja protiv influence u starijih osoba je slabiji nego u mlađih osoba (6,10,15,140). Međutim, ne zna se da li je to posljedica smanjene imunosne reaktivnosti starijih osoba, vezane uz proces starenja imunosnog sustava i/ili kronične bolesti koje prate starenje, povećanja broja cijepljenja progresivno s dobi, ili, kao u slučaju komponente A/H₁N₁, dobno ovisnih razlika u antigenskom iskustvu primarne imunosne reakcije (12,13,15,17,89,140,141,142,143,144).

Za vrijeme epidemija influence, u populaciji starijih osoba zbog toga može doći do teških posljedica. To naročito može doći do izražaja u slučaju slabe antigenske podudarnosti između komponenti cjepiva i cirkulirajućih virusa, ili pri pojavi antigeni potpuno novog virusa influence, kao što je u slučaju pandemije influence (11,130).

Naši rezultati ukazuju da zaštitni učinak cijepljenja protiv influence, izražen kao postotak osoba sa zaštitnim titrom protutijela, nije slabiji u osoba starijih od 65 godina, čak ni onih starijih od 70 godina, u odnosu na osobe mlađe od 65 godina (tablica12). Ni prosječna visina titra protutijela nakon cijepljenja se značajno sa starošću ne smanjuje (tablica13). Međutim, kada se za učinkovitost cijepljenja koristi mjera „postotak osoba sa značajnim (4-strukim i većim) porastom titra protutijela“, može se, u osoba starijih od 65 godina, zapaziti značajno smanjenje učinkovitosti cijepljenja, ali samo za komponentu cjepiva B/Hong Kong (tablica12).

Da taj rezultat može biti posljedica povećanja broja cijepljenja s dobi, pokazuju analize kojima je utvrđeno da postoji značajna razlika u broju cijepljenja između osoba starijih od 70 godina i osoba starih 65 godina i manje (Fisher`s Exact test, tablica12) (slika13). Moguće je da je to povećanje broja cijepljenja povezano sa značajno većim ostatnim titrom protutijela, za tu komponentu cjepiva, utvrđenim u dobnoj skupini 71-75 godina, u odnosu na mlađe dobne skupine (K-W test za grupu, tablica13). Na smanjeni učinak cijepljenja, na tu komponentu cjepiva, u osoba starijih od 70 godina, je mogla utjecati i heterologna reakcija na toj komponenti srodan antigen B/Sicuan. Naime, ta reakcija je došla do izražaja u osoba prethodno cijepljenih 2 ili više puta, a koje su većinom starije od 70 godina (tablica11) (slika13).

Iz te analize proizlazi da prethodno antigensko iskustvo može „zamaskirati“ neovisan utjecaj starije dobi i/ili pridruženih kroničnih bolesti i poremećaja zdravstvenog stanja na smanjenu učinkovitost cijepljenja protiv influence.

Zajedničko negativno djelovanje svih tih čimbenika, prema raspoloživim podacima, najviše dolazi do izražaja u reakciji starijih osoba na novu varijantu virusa influence koja se pojavila u populaciji (11). U našem radu, to je slučaj s antigenom B/Hong Kong, za kojega je jedino i utvrđeno smanjenje učinkovitosti cijepljenja, mjereno postotkom osoba s 4-strukim i većim porastom titra protutijela, u osoba starijih od 65 godina. Međutim, čak i u takvoj situaciji, zaštitni učinak cijepljenja, tj. postotak osoba sa zaštitnim titrom ($\geq 1:40$) protutijela nakon cijepljenja, u osoba starije dobi, u odnosu na osobe mlađe od 65 godina, ne mora biti smanjen (tablica12).

Ako se tim rezultatima pribroje i rezultati koji pokazuju da su osobe koje su više puta cijepljene (2-3 ili 4 i više puta) značajno starije (medijan 74, odnosno 69,5 godina) nego osobe koje nikada ranije nisu cijepljene ili su cijepljene samo jedanput (medijan 66, odnosno 64 godina) (slika13) - to ukazuje da ponavljanje cijepljenja nema negativnog utjecaja na učinkovitost cijepljenja u osoba starije dobi (>65 godina), čak ni onih s više kroničnih bolesti i poremećaja zdravstvenog stanja, kakvi su bili naši ispitanici.

III. UTJECAJ KRONIČNIH BOLESTI I PATOGENETSKIH POREMEĆAJA NA UČINKOVITOST CIJEPLJENJA

1. Dobiveni značajni parametri zdravstvenog stanja

Iz baze podataka, od ukupno 52 parametra koji osim dobi i spola opisuju i različite aspekte poremećaja zdravstvenog stanja, uz pomoć 4 kriterija za klasifikaciju ispitanika smo dobili 16 značajnih parametara koji bi mogli, pojedinačno, ili u kombinaciji, biti važni za predikciju slabog serološkog odgovora na cjepivo protiv influence (tablice14-18).

Općenito, najbolji odnos osjetljivosti i specifičnosti pokazuju parametri selekcionirani u klasifikacijskom postupku br.1, posebno prvih pet parametara na listi, s tim da su dobiveni na malom uzorku od 10 ispitanika klasificiranih da slabo serološki reagiraju (tablica14). Taj klasifikacijski postupak i opisuje osobe s najslabijim rezultatom cijepljenja, jer je od 10 ispitanika njih 9 imalo negativan rezultat serološkog testa na sve 3 komponente cjepiva.

Prema pravilima ILLM algoritama, prvi parametri na listi, dobiveni u nekom klasifikacijskom postupku, su i najbolji prediktori, a to su, u 4 klasifikacijska postupka: povećan postotak monocita i smanjen postotak limfocita u diferencijalnoj krvnoj slici, te smanjena serumska koncentracija vitamina B₁₂ i povećana koncentracija aminokiseline homocistein (tablice14-17).

Iako među dobivenim značajnim parametrima zdravstvenog stanja nema kliničkih dijagnoza bolesti, parametri specifično selekcionirani u pojedinoj od klasifikacija mogu ukazivati na pojedina specifična, bolje definirana klinička stanja, kao što su: 1.smanjena funkcija bubrega praćena hiperhomocisteinemijom, 2.sindrom upale i proteinske malnutricije povezan s poremećajem metabolizma glukoze, 3.kronični gastritis, te 4.promjene koje sa starenjem nastaju u mozgu (osobito u hipotalamusu i prednjem režnju hipofize, mjestima centralne neuroendokrine kontrole) (tablica18). S druge strane, parametri koji se preklapaju u dvije ili više klasifikacija mogu predstavljati zajedničke intermedijarne mehanizme koji utječu na učinak cijepljenja (tablica18). Ti parametri su: postotak limfocita i mononuklearnih leukocita u diferencijalnoj krvnoj slici, hormon štitne žlijezde tiroksin (fT₄), vitamin B₁₂ (ili njegov ekvivalent - parametar MCV), β-globulini, te debljina kožnog nabora iznad nadlaktice (tablica18).

2. Klinička stanja i patogenetski poremećaji koji mogu utjecati na serološki odgovor nakon cijepljenja

Pošto se među dobivenim značajnim parametrima zdravstvenog stanja ne nalaze dijagnoze bolesti, pomoću tih parametara nije moguće vršiti probir osoba koje bi mogle slabo reagirati na cjepivo protiv influence isključivo na osnovi kliničkih kriterija. Zato bi definiranje kliničkih stanja, povezanih sa slabom reakcijom na cjepivo protiv influence, moglo pomoći pri kliničkom probiru takvih osoba, te povećati naše razumijevanje o tome kako poremećaji zdravstvenog stanja utječu na imunosnu reaktivnost.

U tu svrhu smo primjenili dodatne klasifikacijske postupke, za većinu od 16 prethodno selekcioniranih parametara, čime smo stekli bolji uvid u način kako su ti parametri međusobno povezani u funkcionalne cjeline (tablice 19-31). To je, uz objašnjenje dobivenih rezultata pomoću postojećeg znanja, omogućilo definiranje 8 prepoznatljivih patogenetskih poremećaja i to: 1. pomicanje ravnoteže imunosnog odgovora, 2. deficit vitamina B₁₂ i hiperhomocisteinemija, 3. blaga kronična upala, proteinska malnutricija i kronična imunizacija, 4. hipofunkcija hormona štitne žlijezde (hipotireoza), 5. kronična bubrežna insuficijencija s hiperhomocisteinemijom i poremećajem metabolizma glukoze, 6. kronični gastritis uzrokovan infekcijom mikroorganizmom *Helicobacter pylori*, 7. mentalni i neurodegenerativni poremećaji praćeni hiperprolaktinemijom, te 8. starija dob (tablica 32).

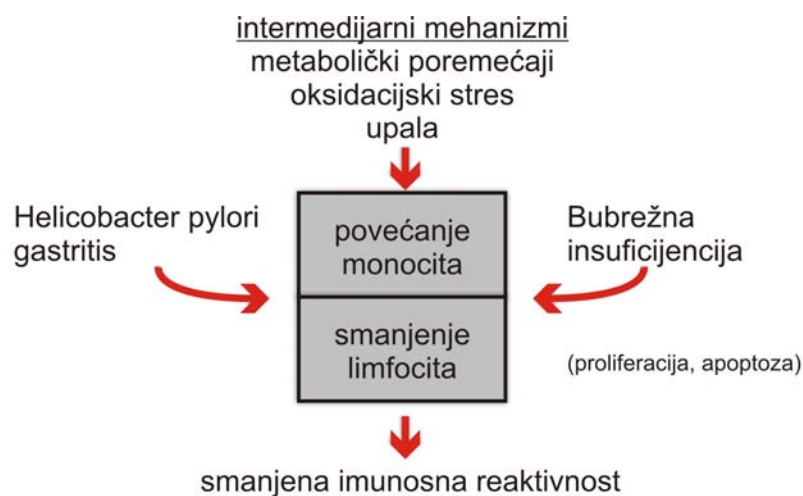
Neki od tih poremećaja predstavljaju intermedijarne mehanizme (1-3), a neki bolje definirana klinička stanja (4-7). Utvrđena povezanost između tako definiranih poremećaja znači da se više od jednog poremećaja može naći u pojedine osobe, što otežava probir osoba koje bi mogle slabo serološki reagirati pomoću kliničkih kriterija (slika 14).

2.1. Pomicanje ravnoteže imunosnog odgovora

Smanjen postotak limfocita (<35%) i povećan postotak mononuklearnih (>7,9%) i neutrofilnih leukocita (>49,5%) u diferencijalnoj krvnoj slici mogu biti pokazatelji patogenetskog poremećaja koji utječe na produkciju specifičnih protutijela, u skladu s pomicanjem ravnoteže imunosnog odgovora od specifične prema nespecifičnoj i staničnoj imunosti, pri čemu bi limfopenija u starijih osoba mogla biti znak slabljenja specifične imunosne reakcije (tablice 16, 17 i 19) (37, 89). U prilog tome govori i podatak

da je limfopenija u starijih osoba povezana s češćim bakterijskim infekcijama, te da predstavlja loš prognostički znak (145). Nadalje, limfopenija može biti i znak slabljenja ukupnih homeostatskih mehanizama, jer se pokazala dobrim predskazateljem skorašnjeg smrtnog ishoda (146). Kao druga mogućnost, ukupan broj limfocita u perifernoj krvi može biti i genetski determiniran (147).

Naši rezultati ukazuju na patogenetske poremećaje, kao što su poremećaj metabolizma glukoze i blagi stupanj upale, kao moguće uzroke limfopenije. Od kliničkih stanja, to su kronični gastritis uzrokovan infekcijom mikroorganizmom *Helicobacter pylori*, te smanjena bubrežna funkcija (tablica 19) (slika 15).



Slika 15. Pomicanje ravnoteže imunosnog odgovora od specifične prema nespecifičnoj i staničnoj imunosti
Objašnjenje u tekstu

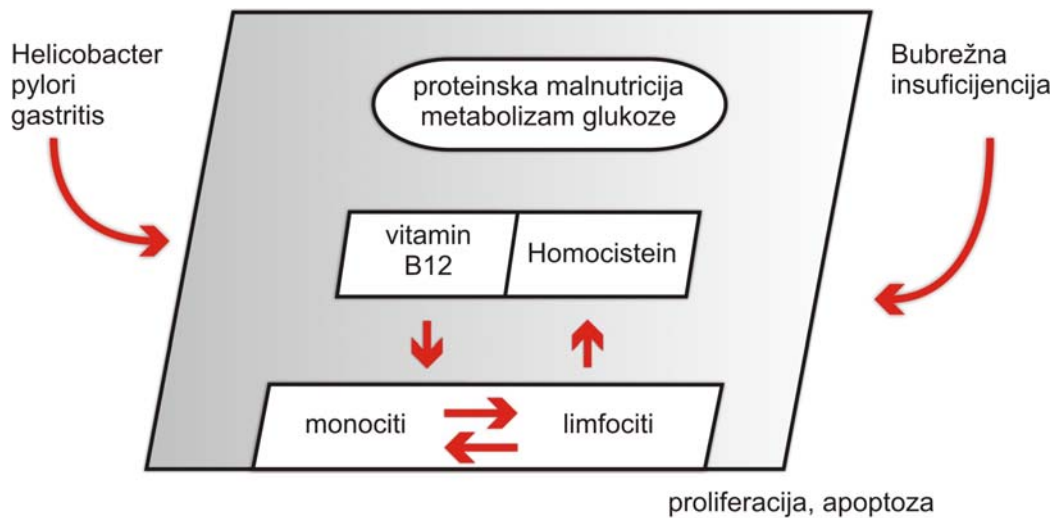
2.2. Deficit vitamina B₁₂, hiperhomocisteinemija

2.2.1. Uvod

Parametri „vitamin B₁₂ ≤ 212,0 pmol/L“ i „homocistein > 12,7 μmol/L“, dobiveni primarnom selekcijom iz baze podataka, ukazuju da deficit vitamina B₁₂ i hiperhomocisteinemija mogu također oslabiti produkciju specifičnih protutijela nakon cijepljenja (tablica 14).

Radi se o skupini blisko povezanih metaboličkih poremećaja, primarno povezanih s deficitom vitamina B-skupine, osobito vitamina B₁₂, a rjeđe folne kiseline i/ili vitamina B₆, čija učestalost raste sa starošću (120). Na međusobnu povezanost tih poremećaja ukazuju i naši rezultati (tablice 20 i 21). Navedeni poremećaji mogu

utjecati na funkciju imunskog sustava direktno, ili indirektno - putem povezanosti s bolestima koje prate starenje (148,149).



Slika 16. Deficit vitamina B₁₂, hiperhomocisteinemija
Objašnjenje u tekstu

2.2.2. Utjecaj deficita vitamina B₁₂ i hiperhomocisteinemije na funkciju imunskog sustava

Navedeni poremećaji mogu direktno nepovoljno utjecati na funkciju imunskog sustava putem smanjene proliferacijske sposobnosti limfocita i/ili povećane sklonosti limfocita za apoptozu (149,150,151) (slika16). To je posljedica nepovoljnog utjecaja deficita vitamina B₁₂ i folne kiseline na funkcioniranje metioninskog ciklusa, važnog za odvijanje vitalnih fizioloških procesa. Poremećaji toga ciklusa mogu dovesti do poremećaja u funkciji stanica i regulaciji staničnog ciklusa (uključujući proliferaciju i apoptozu), a to je povezano i s povećanom sintezom aminokiseline homocistein i njenim nakupljanjem u krvi. Kao direktna posljedica tih metaboličkih poremećaja, može doći i do razvoja mentalnih i neuroloških poremećaja (149,152,153,154).

Stoga ne čudi što su navedeni metabolički poremećaji čimbenici rizika za razvoj glavnih bolesti starenja, kao što su arterioskleroza, rak, neurodegenerativne bolesti, demencija, depresija i artritis (149,152,153,154,155,156).

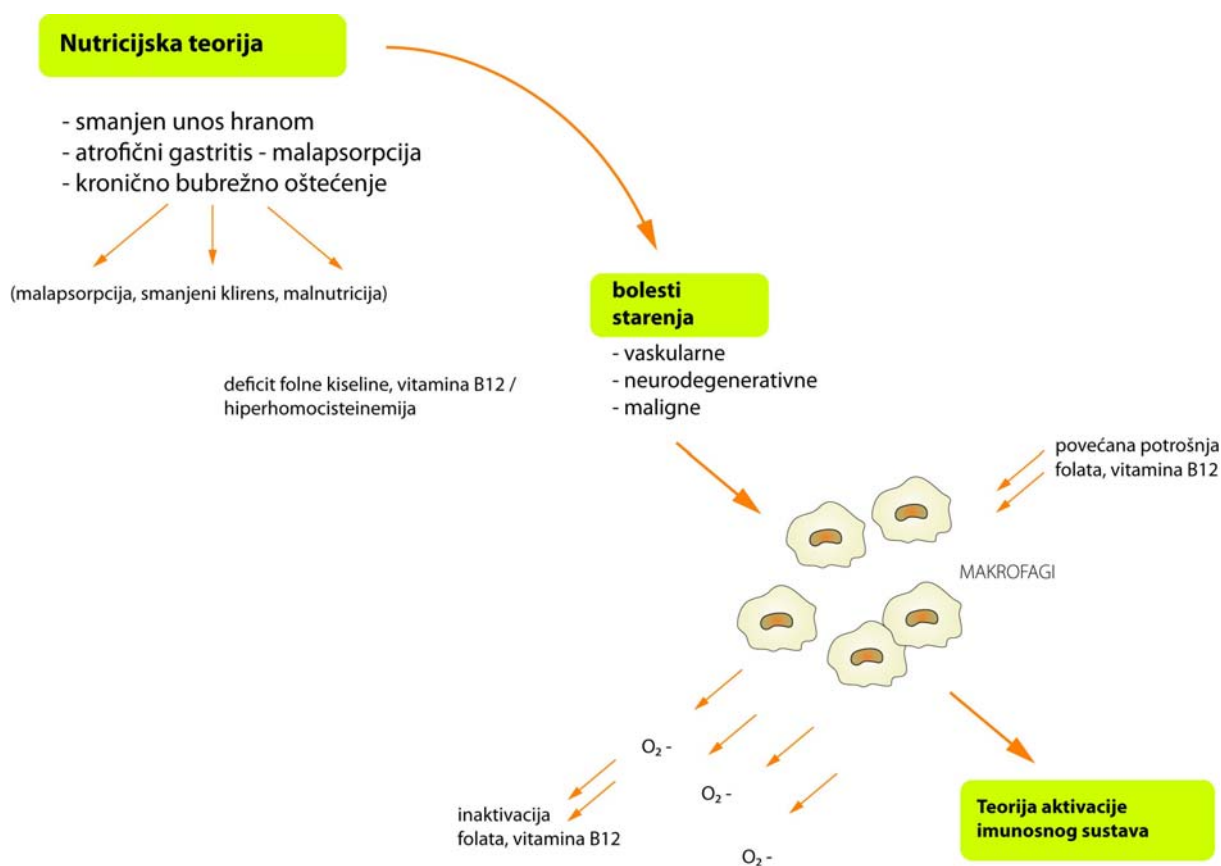
Do smanjene resorpcije vitamina B₁₂ i folne kiseline dolazi već od ranih faza gastritisa. Od nedavno je poznato da i subklinički oblik deficita tih vitamina dovodi do kliničkih manifestacija i to u obliku neuroloških i mentalnih poremećaja, ili subkliničkih

poremećaja hematopoeze, ali bez jasne kliničke slike megaloblastične anemije (157). U tom smislu, parametar „MCV>90 fL“, selekcioniran iz baze podataka u našim rezultatima, može biti odraz toga blagog (subkliničkog) deficita vitamina B₁₂ (tablica15). Na taj način, indirektno, interpretacijom dobivenih rezultata pomoću postojećeg znanja, može se zaključiti da kronični gastritis uzrokovan infekcijom bakterijom *Helicobacter pylori* doprinosi nastanku deficita vitamina B₁₂ (slika16).

Prema današnjim saznanjima, kronična bubrežna insuficijencija je kliničko stanje koje najviše doprinosi pojavi hiperhomocisteinemije (158,159). Na usku povezanost hiperhomocisteinemije i kronične bubrežne insuficijencije kao jedinstvenog poremećaja koji negativno utječe na serološku reaktivnost ukazuju i naši rezultati. Naime, navedeni parametri su specifični samo za jedan klasifikacijski postupak (klasifikacija br.1, tablica 14) (slika16).

Međutim, samo podskupina osoba sa smanjenom bubrežnom funkcijom ima i hiperhomocisteinemiju (klasifikacijski postupak „homocistein>12,7μmol/L“, tablica21). Točnije, radi se o skupini poremećaja koji se u dijela osoba sa smanjenom bubrežnom funkcijom često pojavljuju skupa, a osim hiperhomocisteinemije uključuju još i deficit vitamina B₁₂ i folne kiseline, poremećaj metabolizma glukoze poznat kao inzulinska rezistencija, te proteinsku malnutriciju (158,159) (slika16). O međusobnoj povezanosti tih poremećaja govore i naši rezultati. Tako parametri „glukoza u krvi“ i „HbA1c“ opisuju navedeni poremećaj metabolizma glukoze, parametar „debljina kožnog nabora“ opisuje stanje proteinske malnutricije, a parametar „klirens kreatinina“ predstavlja stanje kronične bubrežne insuficijencije (tablice 20 i 21). Svi su ti parametri primarnim klasifikacijskim postupcima selekcionirani iz baze podataka kao čimbenici koji utječu na rezultat cijepljenja (tablica18).

Prema novijim saznanjima, osim iz nutritivskih razloga, deficit vitamina B₁₂ i/ili folne kiseline, te hiperhomocisteinemija, mogu nastati i zbog trajne aktivacije imunosne reakcije staničnog tipa. Naime, intenzivnu proliferaciju imunokompetentnih stanica prati i povećan utrošak vitamina B₁₂ i folne kiseline, prekursora sinteze molekula DNA, dok povećan oksidacijski stres, rezultat aktivacije tih stanica, može te vitamine i biološki inaktivirati (148,149,160) (slika17).



Slika 17. Teorije koje objašnjavaju učestalu pojavu deficita vitamina B₁₂ i folne kiseline u osoba starije dobi

Konačno, zbog jakih oksidacijskih svojstava aminokiseline homocistein, njena povećana koncentracija u krvi može i samostalno doprinosti trajnom narušavanju funkcije imunskog sustava. Naime, povećan oksidacijski stres, putem aktivacije upalnih gena, može biti uzrokom trajne aktivacije T-limfocitnog sustava i makrofaga, a putem aktivacije mehanizama uključenih u proces apoptoze - i uzrokom nastanka limfopenije (33,34,148,149,151). Na takvu mogućnost ukazuju i naši rezultati (parametar „mononuklearni leukociti“, tablica20).

Taj uzajamni odnos između metaboličkih poremećaja povezanih s deficitom vitamina B₁₂ i povećane aktivnosti imunskog sustava staničnog tipa je ključni mehanizam koji u osoba starije dobi doprinosi progresivnom narušavanju funkcije imunskog sustava.

Svi navedeni poremećaji, povezani u kompleksnu mrežu interakcija, a ne samo samostalni deficit vitamina B₁₂ i/ili blaga hiperhomocisteinemija, mogu negativno utjecati na serološki odgovor.

2.3. Blaga kronična upala, proteinska malnutricija, kronična imunizacija

2.3.1. Blaga kronična upala

Parametri „ β -globulini“, „ γ -globulini“ i „albumin“, dobiveni primarnim klasifikacijskim postupcima br.2. i 3. iz baze podataka, ukazuju da kronična upala utječe na funkciju imunskog sustava (tablice 15i16).

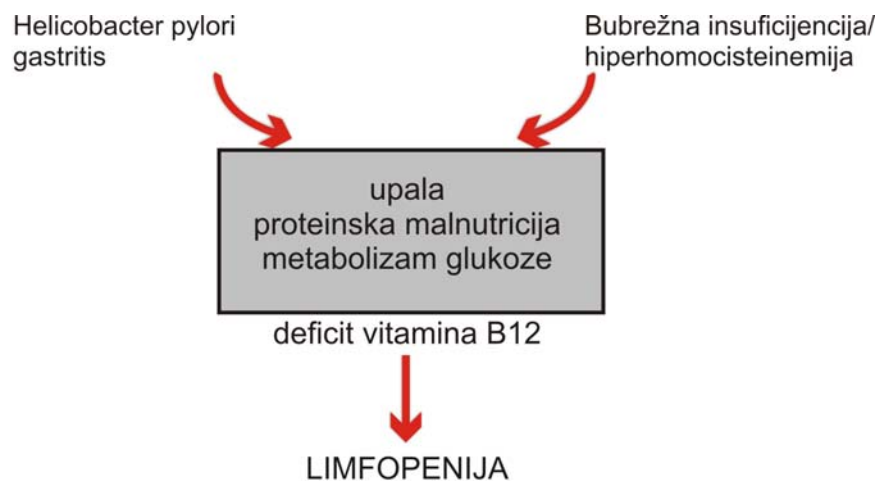
Blagi stupanj kronične upale, u osoba starije dobi, je posljedica ponavljanih i dugotrajnih reakcija na stresne podražaje, uključujući kroničnu antigensku stimulaciju i kronične bolesti (41,161,162). Kao znak toga stanja se smatra blago povećana (oko gornje granice normalnih vrijednosti) serumska koncentracija glavnih medijatora akutne faze upale, kao što su citokin IL-6 i C-reaktivni protein (161,162,163). To se klinički može manifestirati smanjenjem mišićne mase (proteinskom malnutricijom), anemijom, te smanjenjem serumske koncentracije albumina i ukupnog kolesterola (122). U vezi s tim, za razliku od ostalih proteina akutne faze upale, sinteza albumina se tijekom upalne reakcije smanjuje (negativni reaktant akutne faze) (164). Na elemente toga sindroma kronične upale, kao potencijalnog uzroka smanjene serološke reakcije na cjepivo protiv influence, ukazuju i naši rezultati (tablica22).

Trajna je dilema da li je upala predskazatelj nepovoljnih zdravstvenih događaja i preuranjenog smrtnog ishoda, ili poželjan kompenzacijski mehanizam - znak adaptacije organizma na dugotrajne stresne podražaje (41,123,165).

Misli se da bi upala, kao dio mreže patogenetskih mehanizama, mogla istovremeno biti i posljedica nastalih poremećaja i generator daljnjih promjena, te ovisno o kontekstu postojećih poremećaja pomicati ravnotežu patofizioloških procesa u različitim smjerovima (36,41). U tom smislu, upala može direktno nepovoljno utjecati na imunsku reaktivnost i rezultat cijepljenja. Alternativno, upala može samo odražavati poremećaje zdravstvenog stanja starijih osoba koji kao rezultat imaju slabu serološku reaktivnost. U prilog tome govori nalaz da se produkcija citokina IL-6 progresivno povećava sa starenjem, a to povećanje u velikoj mjeri ovisi o zdravstvenom stanju starijih osoba (166,167). Konačno, kao treća mogućnost, blagi stupanj akutne faze upale bi mogao biti zaštitni (kompenzacijski) odgovor na razorno djelovanje upalnih citokina TNF- α i IFN- γ , citokina staničnog tipa imunskog odgovora, koji dominira u starijih osoba. Povećana sinteza proteina akutne faze upale bi pri tome služila kao zaštita od nekontroliranog razvoja limfopenije. U prilog toj mogućnosti govori podatak da povećana sinteza proteina akutne faze, u

određenim kliničkim stanjima, može, inhibicijom apoptoze, povećati aktivnost limfocitnog sustava (168).

Najvažnije kliničko stanje koje doprinosi razvoju upale, prema našim rezultatima, je kronični gastritis uzrokovan infekcijom mikroorganizmom *Helicobacter pylori*, a od drugih poremećaja - to je hiperhomocisteinemija, najčešće znak bubrežne insuficijencije (tablica22) (slika18).



Slika 18. Upala, malnutricija
Objašnjenje u tekstu

2.3.2. Proteinska malnutricija

Rezultati primarnih klasifikacijskih postupaka ukazuju na proteinsku malnutriciju (parametar „debljina kožnog nabora“), kao na jedan od potencijalnih uzroka slabe serološke reakcije na cjepivo protiv influence (tablice14i17). Rezultati dodatnog klasifikacijskog postupka koji se odnosi na taj poremećaj ukazuju na blisku povezanost upale i drugih oblika malnutricije, kao što su deficit vitamina B₁₂ i folne kiseline, s mehanizama odgovornim za razvoj proteinske malnutricije, što je u skladu i s postojećim znanjem (tablica23) (169,170). Nadalje, klasifikacijskim postupkom koji se odnosi na deficit vitamina B₁₂ je dobiven parametar koji ukazuje na smanjenu bubrežnu funkciju (tablica20). U klasifikacijskim postupcima koji se odnose na deficit vitamina B₁₂, hiperhomocisteinemiju i proteinsku malnutriciju se preklapaju parametri koji ukazuju na deficit vitamina B₁₂ i folne kiseline, hiperhomocisteinemiju, proteinsku malnutriciju i kroničnu bubrežnu insuficijenciju (tablice20,21i23). Time oni, indirektno, ukazuju na kroničnu bubrežnu insuficijenciju kao najvažnije kliničko stanje odgovorno za razvoj proteinske malnutricije (slika18).

Poznato je da su za pojačan mišićni katabolizam u tih bolesnika odgovorna dva, međusobno ovisna mehanizma. To su rezistencija mišića na metaboličko djelovanje inzulina (inzulinska rezistencija) i povećana produkcija upalnog citokina TNF- α (činitelja kaheksije), kao posljedica povećane aktivnosti imunskog sustava staničnog tipa (171,172,173).

Na moguću ulogu povećane aktivnosti staničnog imunskog sustava u razvoju proteinske malnutricije, te na važnost tih poremećaja za slabiju serološku reaktivnost, u našim rezultatima ukazuje povezanost parametra „mononuklearni leukociti“ s parametrom „debljina kožnog nabora“ (tablice14,17i23). Podaci govore da su ti poremećaji često prisutni u osoba s kroničnom bubrežnom insuficijencijom, posebno onih s hiperhomocisteinemijom (171). Naime, prema novijim saznanjima, radi se o jedinstvenom kliničkom sindromu, u dijela osoba s kroničnom bubrežnom insuficijencijom, kojega čini upala, proteinska malnutricija i inzulinska rezistencija, a koji, prema našim rezultatima, doprinosi slaboj serološkoj aktivnosti (slika18) (172,173,174). Izostanak takvih specifičnih, multiplih kriterija za probir ispitanika je vjerojatno razlog zbog kojega rezultati ranijih studija u kojima je ispitivana povezanost između pojedinih pokazatelja nutricionalnog statusa i serološkog odgovora nisu davali jednoznačne rezultate (118,121,175).

2.3.3. Kronična imunizacija

Blago povećana serumska koncentracija γ -globulina, u starijih osoba, ukazuje na prisustvo kronične upale, kao posljedice kronične imunizacije i povećane sinteze autoreaktivnih protutijela (74,176). Taj nalaz istovremeno ukazuje na suženje repertoara specifičnosti protutijela, uslijed narušene funkcije humoralne imunodne reakcije, što i objašnjava u našim rezultatima dobivenu povezanost parametra „ γ -globulini“ sa slabim serološkim odgovorom (tablica15) (74,176). Prema našim rezultatima, kronični gastritis može značajno doprinosti porastu serumske koncentracije γ -globulina (klasifikacija br.2, tablice15i18).

2.4. Hipofunkcija hormona štitne žlijezde (hipotireoza)

Prema našim rezultatima, smanjena serumska koncentracija aktivnog oblika hormona tiroksina (parametar fT_4) i povećana koncentracija tireoidnog stimulirajućeg hormona (parametar TSH) mogu također biti predskazatelji slabog serološkog odgovora (klasifikacije br.1,3 i 4, tablice 14,16i17).

Hipofunkcija hormona štitne žlijezde (hipotireoza) je relativno čest poremećaj u osoba starije dobi, a može biti posljedica poremećaja funkcije štitne žlijezde (primarna), hipofize i hipotalamusa (sekundarna), ili blokade aktivnosti hormona štitne žlijezde u ciljnim tkivima (netireoidna) (tablica36).

Tablica 36.

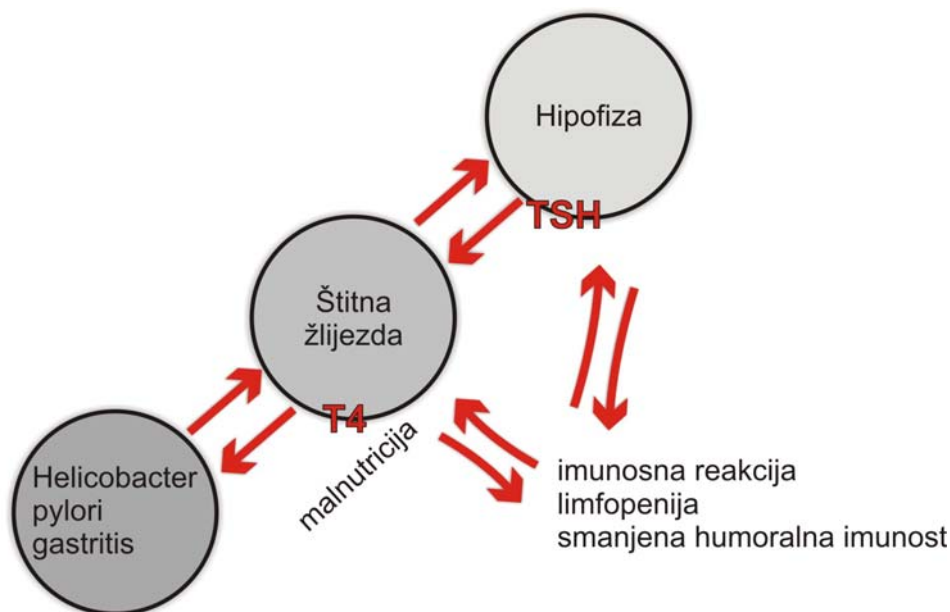
Dijagnostički kriteriji za pojedini oblik hipotireoze

primarna	snižen fT_4 (i fT_3) povišen TSH
primarna latentna	normalan fT_4 povišen TSH
sekundarna	snižen TSH
netireoidna	snižen fT_3 normalan ili povišen fT_4 normalan TSH

U našoj studiji, hipotireoza, kao čimbenik važan za serološku reaktivnost, je najčešće primarna, posljedica kroničnog autoimunog tireoiditisa. Kronični autoimuni tireoiditis i atrofični (autoimuni) gastritis su relativno česte bolesti u osoba starije dobi i pojavljuju se skupa, ali najčešće u subkliničkom obliku (177).

Na subklinički oblik hipotireoze, u našim rezultatima, ukazuju vrijednosti hormona fT_4 i TSH, dobivene u klasifikacijama 1,3i4, a koje se kreću još unutar granica normalnih vrijednosti (tablice14,16i17). Na povezanost između bolesti štitne žlijezde i kroničnog gastritisa, te na povezanost tih bolesti s češćom pojavom upalnih i imunskih poremećaja, ukazuju rezultati klasifikacijskog postupka koji opisuje klinički kontekst povezan s hipofunkcijom štitne žlijezde (tablica24) (slika19). O povezanosti primarne hipotireoze s češćom pojavom imunskih poremećaja, u osoba starije dobi, govore i rezultati kliničkih studija (178,179). Učestalost tih bolesti, kroničnog autoimunog tireoiditisa i atrofičnog gastritisa, nije međutim povećana u stogodišnjaka, populacijskoj skupini posebnoj po tome što predstavlja primijer „zdravog“ starenja, što se smatra rezultatom uspješnog adaptacijskog procesa glavnih kontrolnih sustava u tijelu, imunskog, neuroendokrinog i metaboličkog (180).

Novije spoznaje govore u prilog tome da su hormoni štitne žlijezde potrebni za proces generiranja novih B-limfocita iz koštane srži (181). Zbog toga bi deficit tih hormona mogao biti povezan sa smanjenjem imunskog reakcije humoralnog tipa. Na tu mogućnost, u našim rezultatima, ukazuje smanjen postotak eozinofilnih leukocita u diferencijalnoj krvnoj slici, povezan s primarnom hipotireozom (tablica24) .



Slika 19. Hipofunkcija štitne žlijezde (neuroendokrini osovina hipotalamus-hipofiza-štitna žlijezda)
Objašnjenje u tekstu

2.4.1. Disfunkcija neuroendokrine osovine hipotalamus-hipofiza-štitna žlijezda

Hormon hipofize TSH, kao imunomodulator, može također poslužiti kao samostalni predskazatelj slabe imunosne reaktivnosti. Dok se parametar fT_4 pojavljuje u 3 (od ukupno 4) klasifikacijska postupka, parametar TSH se javlja u samo jednom postupku, skupa s parametrom starije dobi, kao znak disfunkcije prednjeg režnja hipofize, u sklopu degenerativnih promjena mozga vezanih uz starenje (klasifikacija br.4, tablica17).

U prilog tome tumačenju, opisani su poremećaji neuroendokrinih i neurotransmitskih mehanizama u hipotalamusu i prednjem režnju hipofize koji čine jednu od najvažnijih promjena vezanih uz starenje. Povezano s tim, kronične bolesti, česte u osoba starije dobi, izazivaju stanje slično kroničnom stresu i time uzrokuju trajne poremećaje u transmitskim sustavima mozga, posebno u sintezi „*releasing*“ hormona iz hipotalamusa i hipofize (115,117).

Imunosna reakcija se također smatra oblikom reakcije na stres. Osim aktivacije neuroendokrine osovine stresa, imunosna reakcija dovodi i do prolazne hipofunkcije štitne žlijezde (182,183). U tom smislu, kronična stimulacija imunosnog sustava različitim antigenima, česta u osoba starije dobi, predstavlja trajni pozitivni *feed-back*

mehanizam s dugotrajnim modulirajućim djelovanjem na brojne neuroendokrine funkcije (183). Takav scenarij tj. interakciju unutar jedinstvene patogenetske mreže koju čine štitna žlijezda, hipotalamus i hipofiza, imunوسي sustav, te neuroendokrini osovina stresa, podupiru i naši rezultati (parametar „kortizol“, tablica24) (slika19).

2.5. Kronična bubrežna insuficijencija

2.5.1. Uvod

Parametar „klirens kreatinina $\leq 1,55 \text{ ml/s/1.73m}^2$ “, znak smanjene bubrežne funkcije, se pojavljuje samo u jednom primarnom klasifikacijskom postupku, zajedno s parametrom „homocistein“, što znači da ti parametri predstavljaju jedinstveno kliničko stanje (klasifikacija br.1, tablica14). Blago smanjena funkcija bubrega je poremećaj karakteriziran sniženim klirensom kreatinina, čija učestalost u velikoj mjeri ovisi o dobnoj strukturi ispitivane populacije (učestalost od 3-5% je ustanovljena za cjelokupnu odraslu populaciju, a povećava se sa starenjem). To stanje nije jednostavno prepoznatljivo klinički, ali je povezano s brojnim biokemijskim poremećajima od kojih su mnogi važni za imunosnu reaktivnost. Jedan od mehanizama pomoću kojih skupina poremećaja povezanih sa smanjenom bubrežnom funkcijom može oslabiti serološku reaktivnost je vjerojatno limfopenija (tablica19) (slika15). Takvo tumačenje je u skladu s nalazom da kroničnu bubrežnu insuficijenciju prati pojačana apoptoza limfocita, te limfopenija, više B-limfocita, nego T-limfocita (184,185).

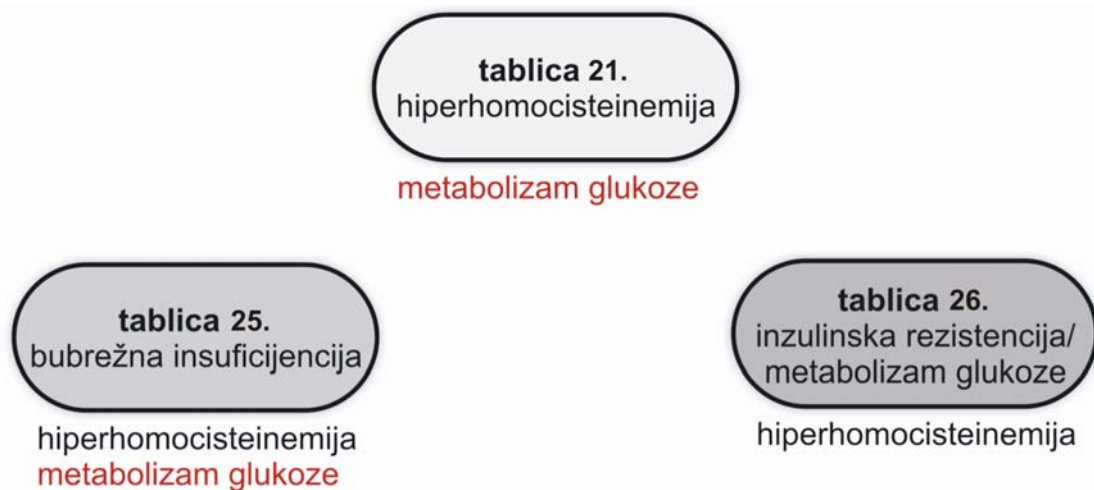
2.5.2. Sindrom upale, malnutricije i inzulinske rezistencije, u osoba s kroničnom bubrežnom insuficijencijom

Posredno, iz rezultata drugih kliničkih studija, se saznaje da hiperhomocisteinemiju često prati i proteinska malnutricija, te poremećaj metabolizma glukoze poznat pod nazivom inzulinska rezistencija, tipično u bolesnika s kroničnom bubrežnom insuficijencijom karakteriziran normalnim ili nižim vrijednostima glukoze u krvi. To je sve praćeno i povećanom produkcijom upalnog citokina TNF- α , kao znakom povećane aktivnosti imunosnog sustava staničnog tipa (172,174,186).

Na elemente te patogenetske cjeline, poznate pod nazivom „sindrom kronične bubrežne insuficijencije, upale, malnutricije i inzulinske rezistencije“, ukazuju i vrijednosti glukoze u krvi dobivene u našim rezultatima koji se odnose na osobe sa

smanjenom bubrežnom funkcijom (tablica25) (174). Da je taj parametar ujedno i znak upale i malnutricije, govori njegovo istovremeno pojavljivanje s parametrom pokazateljem smanjene serumske koncentracije albumina (klasifikacija br.3, tablica16).

Nadalje, na povezanost između smanjene koncentracije glukoze i povećane koncentracije aminokiseline homocistein u krvi, te na njihovu povezanost s kroničnom bubrežnom insuficijencijom, ukazuje preklapanje tih parametara u klasifikacijskim postupcima koji se odnose na te poremećaje (slika20). Na povezanost toga jedinstvenog patogenetskog poremećaja sa slabim serološkim odgovorom na cjepivo protiv influence ukazuje pojavljivanje navedenih parametara kao samostalnih čimbenika slabe serološke reaktivnosti u primarnim klasifikacijskim postupcima (klasifikacije br.1 i 3, tablice14 i 16).



Slika 20. "Sindrom upale, malnutricije, inzulinske rezistencije" u osoba sa smanjenom bubrežnom funkcijom i hiperhomocisteinijom

Preklapanje parametara u klasifikacijskim postupcima koji opisuju povezane poremećaje

2.5.3. Neuroendokrine promjene koje prate kroničnu bubrežnu insuficijenciju

Povećana serumska koncentracija hormona prednjeg režnja hipofize prolaktina (parametar „prolaktin>95,33 mIU/L“) i smanjena serumska koncentracija hormona štitne žlijezde trijodtironina (parametar „fT₃≤5,36“), prema našim rezultatima, prate stanje smanjene bubrežne funkcije (tablica25). Naime, poznato je da je smanjena bubrežna funkcija praćena brojnim endokrinim poremećajima, kao što su: aktivacija neuroendokrine osovine stresa, promjene u aktivnosti hormona hipotalamusa i

hipofize, uključujući i TSH i prolaktin, te smanjena serumska koncentracija hormona štitne žlijezde (187,188).

Najčešći oblik hipotireoze u osoba sa smanjenom bubrežnom funkcijom je sindrom netireoidne bolesti, na što ukazuju i naši rezultati (parametar „fT₃“). Naime, do pojave netireoidne bolesti obično dolazi tijekom težih akutnih ili kroničnih bolesti (189). U tim slučajevima, nekoliko mehanizama može biti odgovorno za slabu serološku reaktivnost na cjepivo.

Jedan od tih mehanizama je već spomenuta, direktna uključenost hormona štitne žlijezde u regulaciju imunosne reakcije. Drugi način je indirektan, putem povezanosti hipofunkcije hormona štitne žlijezde s razvojem mentalnih i kognitivnih poremećaja. U vezi s tim, povećana aktivnost imunosnog sustava staničnog tipa, uključenog u patogenezu neurodegenerativnih bolesti, može doprinijeti nastanku disfunkcije imunosnog sustava, a time i slabije reakcije na cjepivo (190).

I hiperprolaktinemija može, kao dio sindroma kronične bubrežne insuficijencije, na imunosnu reaktivnost djelovati direktno, putem utjecaja na aktivnost limfocita, ili može odražavati poremećaje nastale u mozgu i prednjem dijelu hipofize tijekom starenja (191,192,193).

Iz ove analize proizlazi zaključak da je potrebno poznavati sve te poremećaje i način njihove međusobne povezanosti, da bi se razumijela povezanost smanjene bubrežne funkcije sa slabim serološkim odgovorom.

2.6. Kronični gastritis uzrokovan infekcijom bakterijom *Helicobacter pylori*

2.6.1. Uvod

Parametar „*Helicobacter pylori* IgA>11,8 IU/ml“, selekcioniran iz baze podataka putem kriterija za klasifikaciju ispitanika br.2, ukazuje da kronični gastritis uzrokovan infekcijom mikroorganizmom *Helicobacter pylori* može utjecati na produkciju specifičnih protutijela (tablica15). Naime, prihvaćeni standard za postavljanje dijagnoze te infekcije je serumska koncentracija specifičnih IgA protutijela >11UI/ml. Učestalost kroničnog gastritisa se povećava s dobi (194,195). U većini slučajeva, za nastanak gastritisa je odgovorna infekcija želučane sluznice bakterijom *Helicobacter pylori*, s tim da još veći broj osoba ima latentnu infekciju, bez izraženih kliničkih simptoma. Naime, stopa seropozitiviteta na tu bakteriju (dobivena mjerenjem serumskih specifičnih IgG i IgA protutijela) u populaciji osoba starijih od 50 godina

iznosi i do 70%, zbog čega se ta infekcija smatra gotovo „normalnom“ pojavom starenja (195).

Atrofični (autoimuni) gastritis, bolest isključivo starije dobi, poznata po svojoj povezanosti s megaloblastičnom anemijom, se smatra krajnjim stupnjem oštećenja želučane sluznice, nastalim kao posljedica te infekcije, čime atrofični (autoimuni) gastritis i infekcija bakterijom *Helicobacter pylori* čine jedinstven entitet (195).

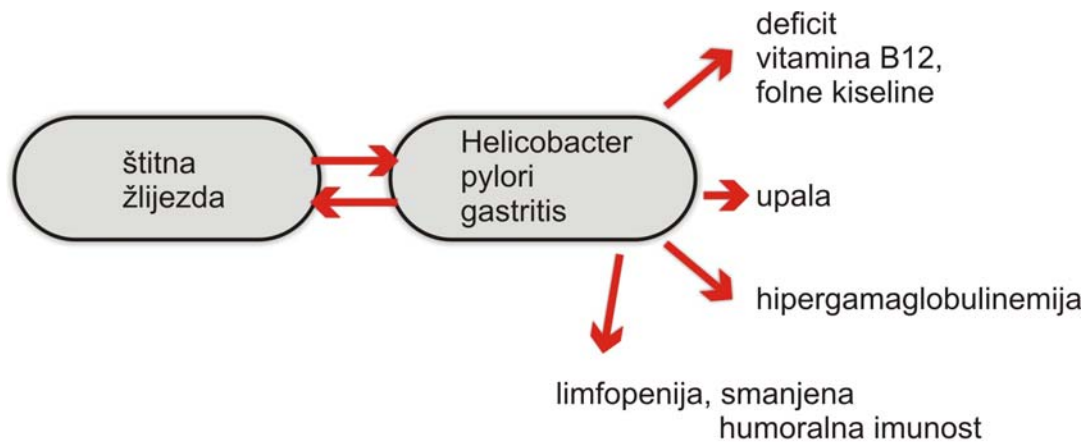
2.6.2. Mehanizam utjecaja na imunosnu reaktivnost: deficit vitamina B₁₂ i folne kiseline, proteinska malnutricija

Suprotno očekivanjima, parametri koji ukazuju na deficit vitamina B₁₂ i/ili folne kiseline, kao oblika malnutricije, nisu selekcionirani u dodatnim klasifikacijskim postupcima koji opisuju značajke osoba s kroničnim gastritisom (tablice27i28). Da je malnutricija povezana s kroničnim gastritisom, govori međutim smanjena serumska koncentracija albumina, znak upale i proteinske malnutricije, u klasifikacijskom postupku povezanim s početnim stupnjevima gastritisa, te parametri koji kao antropometrijske mjere predstavljaju znak malnutricije, a pojavljuju se u klasifikacijskom postupku koji opisuje podskupinu osoba s jačim stupnjem gastritisa (tablice27i28). Naime, za razliku od početnih stupnjeva površinskog (superficialnog) gastritisa, u kojem prevladavaju upalne promjene sluznice, više uznapredovale stupnjeve gastritisa histološki karakteriziraju pretežno atrofične promjene sluznice, što može biti povezano i s jačim stupnjem malnutricije (196).

2.6.3. Mehanizam utjecaja na imunosnu reaktivnost: upala, kronična imunizacija, autoimuna reakcija, limfopenija

Na moguću ulogu gastritisa izazvanog infekcijom mikroorganizmom *Helicobacter pylori* u nastanku sustavne upale ukazuju parametri „albumin $\leq 46,3$ g/L“ i „ γ -globulini $> 12,05$ g/L“, pokazatelji upale, selekcionirani u klasifikacijskom postupku povezanim s početnim stupnjevima kroničnog gastritisa (tablica27). I obrnuto, klasifikacijski postupak koji opisuje stanje upale, ukazuje na kronični gastritis kao na jedno od najvažnijih kliničkih stanja koja doprinose razvoju upale (tablica22). Naime, histološku i patogenetsku podlogu gastritisa uzrokovanog infekcijom bakterijom *Helicobacter pylori* čini jaka upalna reakcija u submukozi želuca, posredovana neutrofilnim leukocitima i B-limfocitima (196,197). Povećana produkcija reaktivnih kisikovih spojeva i citokina na mjestu te lokalne upale može biti uzrokom pojačane apoptoze

limfocita i nastanka limfopenije, što se može negativno odražavati i na učinkovitost cijepljenja protiv influence (197,198,199) (slika21).



Slika 21. Helicobacter pylori gastritis
Objašnjenje u tekstu

O mogućoj ulozi toga mehanizma govore i naši rezultati. To je parametar „limfociti $\leq 35,1\%$ “, selekcioniran u klasifikacijskom postuku koji opisuje poremećaje povezane s kroničnim gastritisom (tablica27). Obrnuto, parametar „Helicobacter pylori IgA>11,8 IU/ml“, selekcioniran u klasifikacijskom postupku koji opisuje uzroke limfopenije, ukazuje na kronični gastritis kao na kliničko stanje koje najviše doprinosi nastanku limfopenije (tablica19).

I drugi poremećaji povezani s kroničnim gastritisom mogu biti od značaja kao uzroci slabe serološke reaktivnosti. To bi mogla biti i polispecifična aktivacija B-limfocita autoantigenima koji se uslijed intenzivne destrukcije sluznice oslobađaju na mjestu lokalne upale, a što dodatno može suziti repertoar specifičnosti imunskog reagiranja (196,197,199). Na moguću ulogu toga mehanizma ukazuju i naši rezultati i to parametar „ γ -globulini“, znak kronične imunizacije, selekcioniran u klasifikacijskom postupku povezanom s kroničnim gastritisom (tablica27) (slika21). Taj parametar se pokazao i samostalnim prediktorom slabe serološke reaktivnosti na cjepivo (klasifikacija br.2, tablica15).

2.6.4. Mehanizam utjecaja na imunosnu reaktivnost: neravnoteža imunosne reakcije s oslabljenim imunosnim odgovorom humoralnog tipa

Naši rezultati ukazuju na još jedan specifični mehanizam, odgovoran za to što se kronični gastritis pokazao jednim od najvažnijih kliničkih stanja odgovornih za slabu serološku reakciju. To je oslabljen imunosni odgovor humoralnog tipa (slika21).

Naime, eozinofilni leukociti i protutijela tipa IgE, na koje u našim rezultatima ukazuju parametri „eozinofili $\leq 3,15\%$ “ i „IgE $<46,0$ kIU/L“, su poznati medijatori alergijskih reakcija, tipičnih predstavnika humoralnog tipa imunosti (tablice 27 i 28). Citokini humoralne imunosti, kao što je IL-4, su neophodni za sintezu IgE protutijela, pa je smanjena produkcija tih protutijela ujedno i znak neravnoteže imunostne reakcije, s oslabljenim imunostnim odgovorom humoralnog tipa (200).

2.6.5. Mehanizam utjecaja na imunostnu reaktivnost: povezanost kroničnog gastritisa s primarnom hipotireozom

Kronični gastritis može biti povezan sa slabom serološkom reakcijom i posredno, putem hipofunkcije hormona štitne žlijezde (slika 21). Na takvu mogućnost ukazuje istovremena pojava kroničnog gastritisa uzrokovanog infekcijom mikroorganizmom *Helicobacter pylori* i kroničnog autoimunog tireoiditisa (180). Na mogući značaj toga mehanizma ukazuje parametar „fT₄ $\leq 14,05$ pmol/L“, pokazatelj hipofunkcije štitne žlijezde, selekcioniran u klasifikacijskom postupku povezanim s početnim stupnjevima kroničnog gastritisa (tablica 27). Obrnuto, parametar „*Helicobacter pylori* IgA $>12,25$ IU/ml“, znak kroničnog gastritisa uzrokovanog infekcijom mikroorganizmom *Helicobacter pylori*, je selekcioniran u klasifikacijskom postupku povezanim s primarnom hipotireozom (tablica 24).

2.7. Mentalni i neurodegenerativni poremećaji praćeni hiperprolaktinemijom

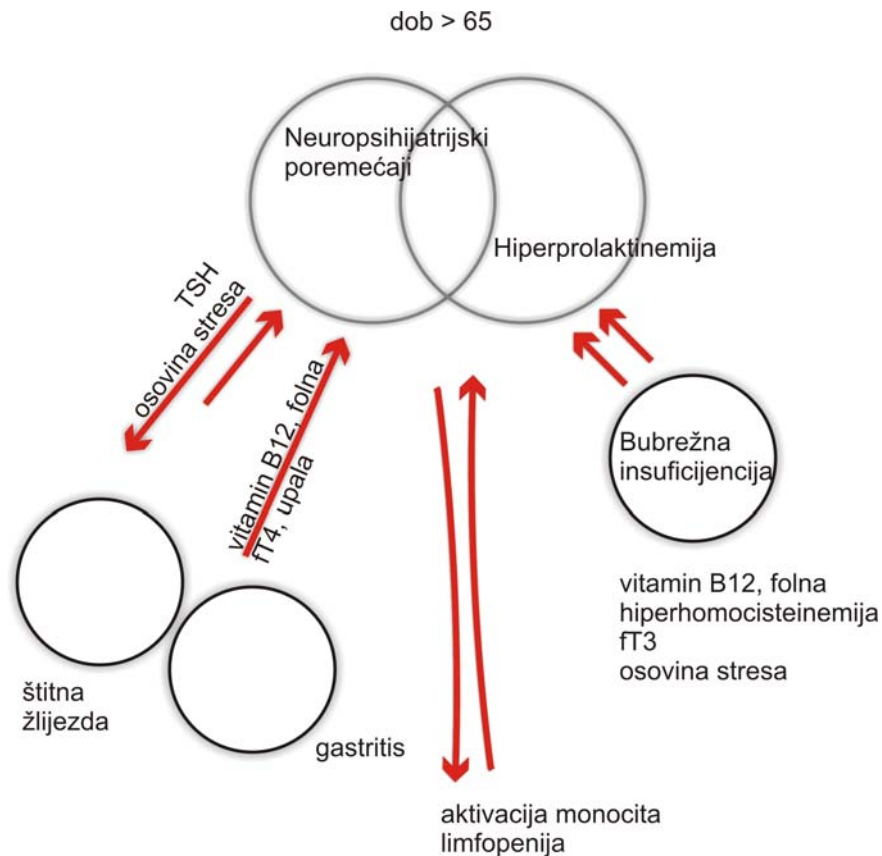
2.7.1. Uvod

Parametar „prolaktin $>90,24$ mIU/L“ koji ukazuje na povećanje serumske koncentracije hormona prolaktina (hiperprolaktinemiju) je selekcioniran u jednom od primarnih klasifikacijskih postupaka kao značajan za slabu serološku reaktivnost (klasifikacija br. 2, tablica 15). Taj je podatak u skladu s novijim shvaćanjima o važnosti toga hormona i općenito hormona prednjeg režnja hipofize (u koje spada i TSH) za kontrolu aktivnosti imunostnog sustava (181, 201). Taj hormon, preko svojih receptora na T- i B-limfocitima, može i direktno imunomodulatorno djelovati (201).

Iz ovih rezultata se međutim ne može sa sigurnošću utvrditi da li varijacije u serumskoj koncentraciji toga hormona direktno utječu na rezultat cijepljenja protiv influence, ili je taj parametar samo indirektni pokazatelj strukturnih (degenerativnih) promjena koje sa starenjem nastaju u mozgu, posebno u hipotalamusu i hipofizi (117, 192, 193) (slika 22). U prilog tome da bi to mogao biti indirektni pokazatelj

skupine bolesnika s neuropsihijatrijskim poremećajima, govore podaci da se hiperprolaktinemija često može naći u osoba s depresivnim poremećajima, te onih koje pate od kroničnog emocionalnog stresa (202).

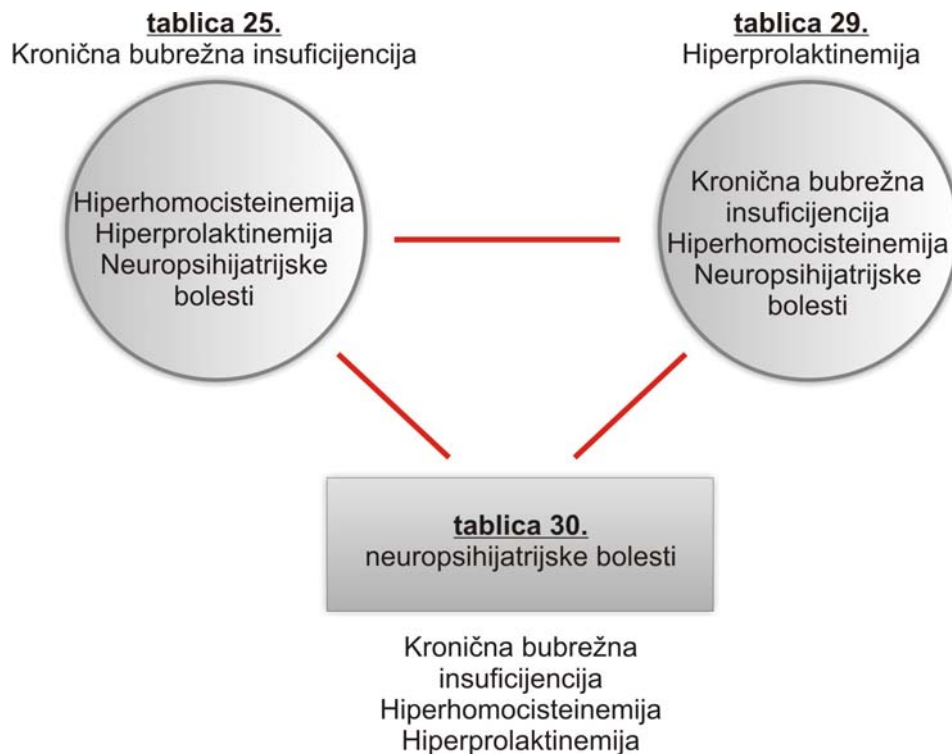
Hiperprolaktinemija je i jedan od brojnih endokrinih poremećaja koji prate stanje kronične bubrežne insuficijencije pa se može shvatiti i kao dio toga kliničkog sindroma (191) (slika22).



Slika 22. Disfunkcija hipotalamusa, prednjeg režnja hipofize
Objašnjenje u tekstu.

Naši rezultati govore u prilog tome da bi se na povezanost hiperprolaktinemije s promjenama imunosne reaktivnosti moglo gledati sa sva ta tri aspekta. Naime, na to ukazuje veliki stupanj preklapanja u kliničkim značajkama između tri skupine starijih osoba - one s hiperprolaktinemijom, one s neuropsihijatrijskim bolestima, te one sa smanjenom bubrežnom funkcijom (posebno u slučajevima praćenim hiperhomocisteinemijom) (tablice25,29i30) (slika23). Svaki od ta tri poremećaja, pojedinačno, je potencijalno važan za funkciju imunosnog sustava, a svi se ti poremećaji često nalaze (s varijabilnom ekspresijom) u osoba starije dobi. Da su u našu analizu ušle i osobe s latentnim depresivnim poremećajima (potrebno egzaktno

testiranje), a ne samo osobe s dijagnozom neuropsihijatrijskih poremećaja, to preklapanje bi možda bilo i veće.



Slika 23. Povezanost kronične bubrežne insuficijencije sa sindromom neuropsihijatrijske bolesti / hiperprolaktinemija

Preklapanje parametara između povezanih poremećaja

2.7.2. Povezanost neuropsihijatrijskih i neurodegenerativnih bolesti u osoba starije dobi

Prema postojećem znanju, u osoba s kroničnim poremećajima emotivnog stanja, kao što su depresivni i anksiozni poremećaji, postoji povećana aktivnost neuroendokrine osovine stresa (hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda). To je osnovni mehanizam pomoću kojega neuropsihijatrijski poremećaji mogu negativno djelovati na imunosnu reaktivnost, a time i na produkciju specifičnih protutijela (203,204,205).

To se može posebno nepovoljno odražavati na imunosnu reaktivnost osoba starije dobi, zbog utvrđene bliske povezanosti između razvoja neurodegenerativnih promjena mozga, osobito onih dijelova koji su važni za reakciju na stres, kao što su hipotalamus i hipofiza, te nastanka depresivnih i mentalnih poremećaja

(206,207,208). U vezi s tim, utvrđeno je da razvoj degenerativnih promjena mozga dovodi do aktivacije neuroendokrine osovine stresa, što je povezano i s učestalijom pojavom depresivnih poremećaja. Vrijedi i obrnuto, tj. depresija i loše emotivno stanje, putem istog mehanizma - aktivacije neuroendokrine osovine stresa, mogu ubrzati razvoj neurodegenerativnih promjena (208).

To pokazuje da, za razliku od osoba mlađe dobi, u kojih su anksiozno-depresivna stanja praćena samo neuroendokrinim poremećajima, potencijalno važnim za imunosnu reaktivnost - u osoba starije dobi dolazi do izražaja i dodatni mehanizam, a to je aktivacija imunosnog sustava staničnog tipa, kao posljedica razvoja degenerativnih promjena u strukturama mozga (slika22).

2.7.3. Povezanost kronične bubrežne insuficijencije s hiperprolaktinemijom i neuropsihijatrijskim bolestima

Na to da osobe s kroničnom bubrežnom insuficijencijom, posebno one s hiperhomocisteinemijom, mogu češće od ostalog dijela populacije imati i hiperprolaktinemiju i/ili neuropsihijatrijske bolesti, ukazuje preklapanje tih parametara u klasifikacijskim postupcima koji se odnose na te poremećaje (slika23).

Hiperprolaktinemija u osoba sa smanjenom bubrežnom funkcijom može biti samo pasivna posljedica smanjenog bubrežnog klirensa, ili, suprotno tome, pokazatelj nastale disfunkcije hipotalamusa i hipofize u tih osoba. U vezi s potonjim, povezanost kronične bubrežne insuficijencije s neuropsihijatrijskim poremećajima bi se mogla objasniti time što brojni poremećaji koji prate stanje kronične bubrežne insuficijencije, kao što su: hipofunkcija štitne žlijezde, aktivacija neuroendokrine osovine stresnog odgovora, deficit vitamina B₁₂ i/ili folne kiseline, te hiperhomocisteinemija, mogu ubrzati razvoj neurodegenerativnih i mentalnih poremećaja (153,190,208,209) (slika22).

Na taj način, stanje smanjene bubrežne funkcije i neuropsihijatrijski poremećaji postaju blisko povezani u svom zajedničkom negativnom djelovanju na funkciju imunosnog sustava, a time i na imunosnu reaktivnost na cjepivo (slika22).

2.7.3. Povezanost neuropsihijatrijskih bolesti s kroničnim gastritisom uzrokovanim infekcijom bakterijom *Helicobacter pylori*

Klasifikacijski postupak koji opisuje klinički kontekst povezan s neuropsihijatrijskim bolestima pokazuje da bi, uz kroničnu bubrežnu insuficijenciju, kronični gastritis mogao biti drugo kliničko stanje najčešće povezano s pojavom neuropsihijatrijskih poremećaja (tablica30).

Kronični gastritis može doprinositi razvoju neurodegenerativnih i neuropsihijatrijskih bolesti pomoću više mehanizama, kao što su: deficit vitamina B₁₂ i folne kiseline, povećan oksidacijski stres, te često pridružena hipofunkcija štitne žlijezde (156,209,190) (slika22).

Osim toga, intenzivna lokalna imunosna reakcija i upala, u sluznici želuca, mogu uzrokovati trajnu aktivaciju neuroendokrine osovine stresa i time doprinositi razvoju poremećaja u regulaciji hormona prednjeg režnja hipofize (115,117) (slika22).

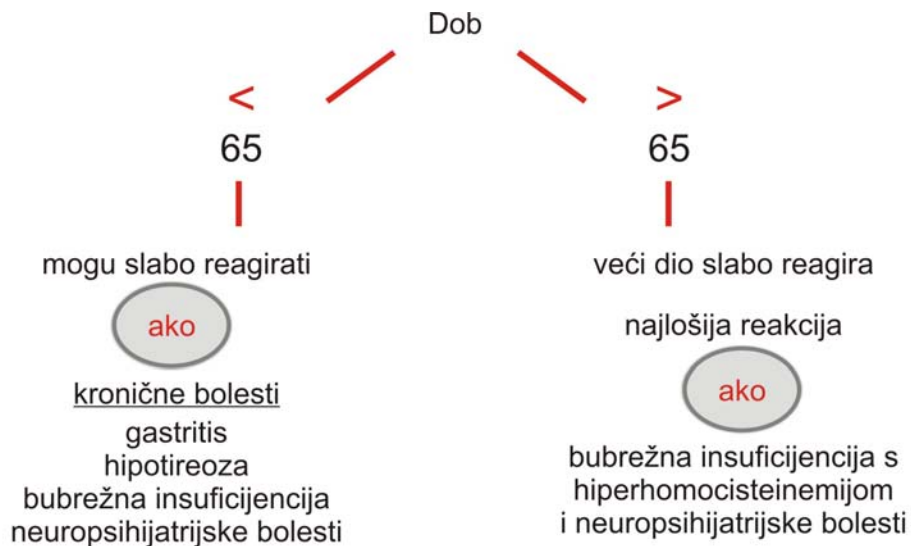
Na taj način, zbog uzajamnih interakcija, ta dva klinička stanja postaju povezana u istu funkcionalnu cjelinu koja može oslabiti imunosnu reakciju na cjepivo (slika22). Na takvo objašnjenje ukazuju i naši rezultati, tj. zajedničko pojavljivanje parametara „prolaktin“ i „*Helicobacter pylori* IgA“ u istom primarnom klasifikacijskom postupku (klasifikacija br. 2, tablica15).

2.8. Starija dob

Iz rezultata primarnog klasifikacijskog postupka u kojemu je selekcioniran parametar „dob>65,5 god.“ (klasifikacija br.4, tablica17) se može zaključiti da je većina osoba koje su reagirale slabim serološkim odgovorom na cjepivo protiv influence starija od 65 godina (test osjetljivosti), ali da ima i osoba starijih od 65 godina koje dobro reagiraju (test specifičnosti) (slika24). Uzorak ispitanika u ovom radu su činile osobe stare 50 ili više godina, s više kroničnih bolesti, pa se, posredno, može zaključiti da bi i osobe mlađe od 65 godina, ali one s kroničnim bolestima, mogle slabije reagirati na cjepivo (slika24).

Da bi utjecaj kroničnih bolesti na imunosnu reaktivnost mogao biti važniji od kronološke dobi, indirektno pokazuju rezultati studija na stogodišnjacima - populacijske skupine koja se odlikuje posebno dobrim zdravstvenim stanjem. Te studije su pokazale da većina imunosnih parametara i imunosnih funkcija u stogodišnjaka nije poremećena, što bi mogao biti rezultat dobre adaptacije imunosnog i drugih fizioloških sustava na uvjete okoliša (210,211).

Klinička stanja koja mogu biti od značaja zbog svog negativnog utjecaja na imunosnu reaktivnost, prema rezultatima ovoga rada, su: kronični gastritis izazvan infekcijom bakterijom *Helicobacter pylori*, hipotireoza, smanjena funkcija bubrega praćena hiperhomocisteinemijom, te neuropsihijatrijske bolesti praćene hiperprolaktinemijom (tablica32) (slika24).



Slika 24. Starija dob i imunosna reakcija na cjepivo protiv influence
Objašnjenje u tekstu

Međusobna povezanost tih kliničkih stanja ukazuje da se više od jednog poremećaja može naći u pojedine osobe (poglavlje Rezultati, slika 14). To znači da je negativan utjecaj starije dobi na učinkovitost cijepljenja protiv influence najvjerojatnije posljedica brojnih poremećaja zdravstvenog stanja koji mogu oslabiti funkciju imunosnog sustava. To otežava predviđanje koje bi osobe na cjepivo protiv influence mogle slabo reagirati.

U osoba starije dobi (>65 god.), prema našim rezultatima, najčešće kliničko stanje je smanjena bubrežna funkcija. Dio tih osoba ima i hiperhomocisteinemiju koja se tipično može naći upravo u osoba starije dobi (tablica31). To bi ujedno mogle biti i osobe u kojih se može očekivati najslabija serološka reakcija na cjepivo protiv influence, na što ukazuje specifično pojavljivanje parametra „homocistein >12,7 μ mol/L“ u klasifikacijskom postupku koji opisuje skupinu osoba s najslabijim serološkim odgovorom na cijepljenje (tablice 14i18). Te bi se osobe prema tome

mogle prepoznati na relativno jednostavan način, mjerenjem samo toga jednog biokemijskog pokazatelja.

Zbog čestog pojavljivanja neuropsihijatrijskih bolesti u osoba s kroničnom bubrežnom insuficijencijom i hiperhomocisteinemijom, dio tih osoba bi se mogao prepoznati i pomoću isključivo kliničkog kriterija - dijagnoze neuropsihijatrijskih bolesti (tablice 25,29i30) (slike22i23).

Dio osoba starijih od 65 godina ipak ima očuvanu funkciju bubrega i klirens kreatinina, na što ukazuje mala specifičnost za parametar „dob>65 godina“, u klasifikacijskom postupku koji opisuje osobe sa smanjenim klirensom kreatinina (tablica25). To znači da i osobe starije dobi, ukoliko nemaju navedene poremećaje zdravstvenog stanja, mogu dobro reagirati na cjepivo (slika24).

IV. ZAJEDNIČKI UTJECAJ DOBI, PRETHODNOG ANTIGENSKOG ISKUSTVA I POREMEĆAJA ZDRAVSTVENOG STANJA NA UČINKOVITOST CIJEPLJENJA

Analizom zajedničkog utjecaja sva tri bitna čimbenika, dobi, prethodnog antigeniskog iskustva (cijepnog statusa i visine ostatnog titra protutijela), te poremećaja zdravstvenog stanja, na učinkovitost cijepljenja, definiranu po kriteriju da se slabom reakcijom na cjepivo protiv influence smatra ako je do $\geq 4x$ porasta titra protutijela došlo na samo jednu, ili nije došlo ni na jednu komponentu cjepiva, u skupini pretežno starijih osoba s kroničnim bolestima, dob se nije pokazala kao rizični čimbenik slabe učinkovitosti cijepljenja, dok su se prethodna cijepljenja pokazala kao izrazito protektivni čimbenik (tablica33).

Nepovoljan utjecaj na učinkovitost cijepljenja, prema rezultatima primijenjene logističke regresijske analize, može imati imunosna reakcija na antigenski sličnu komponentu iz prethodnog sastava cjepiva (heterologna reakcija), što je u ovom radu slučaj s komponentom B/Sicuan (tablica33). U manjoj mjeri, nepovoljan utjecaj mogu imati i neki patogenetski poremećaji, prije svega relativna limfopenija (smanjen postotak limfocita u diferencijalnoj krvnoj slici), te metabolički poremećaji povezani s deficitom vitamina B₁₂ i hiperhomocisteinemijom (tablice34 i35).

Pomoću 3 dobivena modela se može predvidjeti 76,9% (model sa svim varijablama) ($p < 0,002$), odnosno 75,8% (modeli forward i backward) ($p < 0,041$ i $p < 0,003$) rezultata cijepljenja, definiranih prema navedenim kriterijima.

Takvi dobiveni rezultati koji govore u prilog korisnog učinka prethodnih cijepljenja su u skladu s rezultatima drugih studija, kao i s preporukama SZO o potrebi redovitog

godišnjeg cijepljenja starijih osoba i osoba s kroničnim bolestima (16,88,98). Ti rezultati odgovaraju i rezultatima analize titrova protutijela, dobivenih u ovom radu (tablica12, te poglavlje Rasprava, podnaslov Utjecaj starije dobi na učinkovitost cijepljenja). Posebno povoljan učinak prethodnih cijepljenja od 2-3 puta na rezultat sadašnjeg cijepljenja, na što ukazuju rezultati logističke regresijske analize, odgovaraju rezultatima analize titrova protutijela prema kategorijama cijepnog statusa (tablice11 i 33). Međutim, rezultati analize titrova protutijela također upozoravaju na mogući nepovoljni utjecaj heterologne reakcije, pogotovo u situacijama brojnih ponavljanih cijepljenja (tablica11). To potvrđuju i rezultati logističke regresijske analize (značajan nepovoljni utjecaj visine ostatnog titra protutijela antigenske komponente B/Sicuan) (tablica33). Na inhibitorni učinak heterologne reakcije na učinkovitost cijepljenja ukazuju i rezultati drugih radova (12,14,15).

To što se dob, u zbirnoj analizi bitnih čimbenika učinkovitosti cijepljenja, nije pokazala značajnom, može biti u vezi sa strukturom uzorka ispitanika kojega čine pretežno osobe starije dobi. Osim toga, kao što su pokazale analize odnosa broja cijepljenja i dobi, samostalni nepovoljni utjecaj starije dobi na učinkovitost cijepljenja može biti „zamaskiran“ povoljnim učinkom prethodnih cijepljenja (Fisher`s Exact test, tablica12, te slika13).

Od parametara zdravstvenog stanja, prethodno selekcioniranih iz velike baze podataka metodama induktivnog učenja, rezultati logističke regresijske analize ukazuju jedino na slab negativni utjecaj relativne limfopenije, hiperhomocisteinemije i deficita vitamina B₁₂ na učinkovitost cijepljenja. Takvi rezultati odgovaraju i rezultatima dobivenim primjenom ILLM algoritama, pomoću kojih su se također vezani poremećaji „povećan postotak monocita/smanjen postotak limfocita u diferencijalnoj krvnoj slici“, te „deficit vitamina B₁₂/hiperhomocisteinemija“, pokazali najboljim prediktorima slabe serološke reaktivnosti, definirane po 4 različita kriterija (tablice14-17). Takvi rezultati su u skladu s postojećim saznanjima koja ukazuju da bi ti poremećaji mogli biti znak slabljenja specifične imunosne reakcije, te poremećaja u funkciji imunosnog sustava, kao posljedice smanjene proliferacijske sposobnosti limfocita i/ili njihove povećane sklonosti za apoptozu (37,89,149,150,151).

Parametri koji ukazuju na te poremećaje su se pokazali slabim prediktorima učinkovitosti cijepljenja definirane po kriteriju da se slaba serološka reaktivnost smatra ako je do značajnog ($\geq 4x$) porasta titra protutijela došlo na samo jednu komponentu cjepiva, ili nije došlo ni na jednu komponentu cjepiva. Međutim, važnost

tih parametara je u tome što njihovo uvođenje u model značajno povećava vrijednost modela za predviđanje slabog serološkog odgovora na cjepivo (negativnu prediktivnu vrijednost) (tablica34). Zbog toga bi značaj tih prediktora mogao biti i veći u situacijama cijepljenja u kojima se realno očekuje slaba produkcija specifičnih protutijela na cjepivo protiv influence.

To bi, prema postojećem znanju, kao i našim rezultatima, moglo biti u slučaju kada se starije osobe cijepu prvi put, ili pri pojavi novog virusa influence u populaciji, kao u slučaju pandemije influence. Naime, u tim situacijama može izostati zaštitni učinak prethodnih cijepljenja. Posebno se to odnosi na komponentu cjepiva A/H₁N₁, poznatu po čestom odsustvu ostatnog titra protutijela (tablica11) (11,17).

To bi mogle biti i situacije cijepljenja u kojima se očekuje negativan učinak heterologne imunodne reakcije na učinkovitost cijepljenja, što bi posebno moglo doći do izražaja, na što ukazuju i rezultati ovoga rada, u starijih osoba s brojnim ($\geq 4x$) prethodnim cijepljenjima (tablica11).

Uzorak ispitanika u ovom radu, zbog značajki kao što su starija dob, te prisustvo više kroničnih bolesti u pojedinog ispitanika, je bio pogodan za probir parametara zdravstvenog stanja potencijalnih prediktora slabe reaktivnosti na cjepivo protiv influence. Dobivene rezultate bi trebalo provjeriti i na drugim uzorcima ispitanika.

Stvarni značaj dobivenih laboratorijskih biomarkera za predviđanje ishoda cijepljenja protiv influence bi trebalo dodatno provjeriti i na specifično odabranim i većim uzorcima ispitanika, primjenom klasičnih statističkih metoda. Naime, na različitim uzorcima ispitanika i u različitim situacijama cijepljenja, je moguće da utjecaj pojedinih bitnih čimbenika bude različit. Da bi predikcija učinkovitosti cijepljenja protiv influence u tim različitim situacijama bila moguća, potrebno je poznati većinu bitnih čimbenika sa značajnim učinkom na ishod cijepljenja.

Predviđanje učinkovitosti cijepljenja protiv influence je preduvjet izrade plana cijepljenja. Potreba za provođenjem cijepljenja po unaprijed razrađenim protokolima (postupnicima), sve više dolazi do izražaja, jer se pojavljuju nova, efikasnija cjepiva. Problem je što su ta cjepiva dobivena visokorazvijenim tehnologijama pa su skuplja i nedovoljno dostupna za široku primjenu. Intenzivno se ispituju i drugačiji, alternativni načini primjene cjepiva, od danas opće prihvaćenog, a to je jednokratna sistemska primjena mrtvog, fragmentiranog, trokomponentnog cjepiva (128,129).

Zbog svega toga, znanje o tome u kojih osoba i u kojim situacijama cijepljenja bi mogao izostati zaštitni učinak cijepljenja bi moglo biti važno, jer bi omogućilo izradu preciznog plana cijepljenja po kojem bi se točno znalo koga bi trebalo cijepiti kojom vrstom cjepiva, ili kojim načinom primjene cjepiva. To bi, uz najmanje troškove, imalo najveći povoljni učinak na smanjenje obolijevanja, smanjenje pojave komplikacija i mortaliteta od influence (126,127,133).

Rezultati dobiveni u ovom radu su pokazali da dijagnoze bolesti, što je uobičajeni način klasifikacije pacijenata u kliničkoj praksi, ne mogu služiti kao prediktori učinkovitosti cijepljenja protiv influence, već su za tu svrhu korisniji laboratorijski biomarkeri, kao što su relativna limfopenija i/ili deficit vitamina B₁₂ i hiperhomocisteinemija. Pošto su ti mehanizmi vrlo bliski poremećajima funkcije imunskog sustava, moguće je da bi, za poboljšanje prediktivne sposobnosti matematičkih modela, trebalo, barem u manjeg dijela starijih osoba, napraviti i specifičnije analize imunskih funkcija. To bi međutim bilo povezano s većim troškovima, te manjom dostupnošću takvih analiza. To znači da bi i po pitanju specifičnih prediktora, potrebnih za matematičko predviđanje ishoda cijepljenja, trebalo razraditi postupnike.

Da bi se donijela odluka o tome koje bi laboratorijske biomarkere, pokazatelje poremećaja zdravstvenog stanja, i u kojih manjih skupina osoba, trebalo mjeriti, prvobitan probir osoba bi ipak trebalo vršiti na osnovu njihovih kliničkih značajki. U tome bi i rezultati ovoga rada koji upućuju na smanjenu funkciju bubrega, mentalne poremećaje, gastritis i poremećaje u funkciji štitne žlijezde, kao na klinička stanja povezana s poremećajima funkcije imunskog sustava - mogli pomoći. Važnost tih kliničkih stanja za slabiju reaktivnost na cjepivo protiv influence bi trebalo naknadno provjeriti, na većim uzorcima specifično probраних ispitanika koji imaju te poremećaje, te testiranjem razlika u serološkom odgovoru na cjepivo protiv influence, upotrebom klasičnih statističkih metoda.

O parametrima zdravstvenog stanja, kao specifičnim prediktorima slabe reaktivnosti na cjepivo protiv influence, do sada se nije znalo gotovo ništa (133,135,143,144). Zbog toga je, s ciljem prvobitne identifikacije tih parametara, trebalo pretražiti veću bazu podataka koja s različitih aspekata opisuje zdravstveno stanje ispitanika. I to je učinjeno u ovom radu. Dobivena skupina od 16 parametara zdravstvenog stanja može služiti kao polazni skup parametara za daljnje nadograđivanje znanja o biomarkerima slabe reaktivnosti na cjepivo protiv influence.

ZAKLJUČCI

1. Samostalni čimbenici koji mogu utjecati na produkciju specifičnih protutijela na cjepivo protiv influence su prethodno antigensko iskustvo i to broj prethodnih cijepljenja, visina ostatnog titra protutijela i značajke komponenti cjepiva (imunogeničnost, antigensko iskustvo primarne imunizacije i heterologna reakcija), te poremećaji zdravstvenog stanja, dok se učinak starije dobi (>65 god.) ne može odvojiti od učinka tih dvaju čimbenika.
2. Stvarni zaštitni učinak cijepljenja, tj. postotak osoba sa zaštitnim titrom protutijela ($\geq 1:40$), u osoba starih 50 i više godina, s kroničnim bolestima, kakve se najčešće i cijepu protiv influence u ambulantama opće medicine, nakon ponovljenih cijepljenja se općenito ne smanjuje.
3. Mogućnost da zaštitni učinak cijepljenja u odnosu na prvo cijepljenje bude smanjen postoji u osoba prethodno cijepljenih puno (četiri i više) puta, ali samo za komponentu cjepiva čiji se sastav u cjepivu često mijenja.
4. U osoba starih 50 i više godina, s kroničnim bolestima, najslabiji zaštitni učinak cjepiva protiv influence se postiže na antigensku komponentu A/H₁N₁. Posebno se to odnosi na osobe koje se cijepu prvi put, jer u tom slučaju često nedostaje ostatni titar protutijela.
5. Iz baze podataka, od ukupno 52 parametra kojima je opisano zdravstveno stanje ispitanika, primjenom metoda induktivnog učenja, na osnovi četiri različita kriterija pomoću kojih je definirana slaba serološka reaktivnost na cjepivo protiv influence, selekcionirali smo 16 potencijalnih predikcijskih parametara i to: postotak mononuklearnih leukocita i limfocita u diferencijalnoj krvnoj slici, hormon štitne žlijezde tiroksin (fT₄), vitamin B₁₂ (i njegov ekvivalent - parametar MCV), β -globulini, debljina kožnog nabora iznad nadlaktice, klirens kreatinina, aminokiselina homocistein, γ -globulini, IgA specifična protutijela na mikroorganizam *Helicobacter pylori*, hormon hipofize prolaktin, glukoza u krvi na tašte, serumski albumin, starija dob i tireoidni stimulirajući hormon hipofize (TSH). Od tih parametara, prema pravilima ILLM algoritama, najbolji prediktori su parametri koji predstavljaju dva para

međusobno povezanih poremećaja, kao što su „povećan postotak monocita i smanjen postotak limfocita u diferencijalnoj krvnoj slici“, te deficit vitamina B₁₂ i hiperhomocisteinemija“.

6. Primjenom dodatnih algoritama, za pojedine od dobivenih parametara, mogao se steći bolji uvid u način kako su parametri međusobno povezani u prepoznatljive (u skladu s postojećim znanjem) patogenetske cjeline. Na taj način smo identificirali četiri klinička stanja vrlo vjerojatno povezana sa slabim serološkim odgovorom na cjepivo protiv influence. Ta klinička stanja su: kronična bubrežna insuficijencija (posebno sindrom karakteriziran upalom, malnutricijom, poremećajem metabolizma glukoze i hiperhomocisteinemijom), mentalni i neurodegenerativni poremećaji (posebno oni povezani s promjenama u hipotalamusu i hipofizi, glavnim mjestima kontrole neuroendokrinih funkcija, praćeni hiperprolaktinemijom), hipofunkcija štitne žlijezde (hipotireoza), te kronični gastritis uzrokovan infekcijom bakterijom *Helicobacter pylori*.

7. Navedena klinička stanja mogu negativno utjecati na imunosnu reaktivnost, a time i na serološku reaktivnost na cjepivo protiv influence, posredstvom zajedničkih intermedijarnih mehanizama, kao što su: pomicanje ravnoteže imunosnog odgovora od specifične prema nespecifičnoj i staničnoj imunosti, upala, proteinska malnutricija, poremećaj metabolizma glukoze, te skupina metaboličkih poremećaja povezanih s deficitom vitamina B₁₂ i hiperhomocisteinemijom.

8. Negativan utjecaj starije dobi na učinkovitost cijepljenja protiv influence je vjerojatno posljedica brojnih poremećaja zdravstvenog stanja koja mogu oslabiti funkciju imunosnog sustava, budući da se ti poremećaji najčešće i pojavljuju u starijoj dobi.

9. Pojava više poremećaja zdravstvenog stanja u jedne osobe otežava klinički probir osoba koje bi mogle slabo serološki reagirati na cjepivo protiv influence. Velik dio tih osoba bi se ipak mogao prepoznati na relativno jednostavan način, po značajkama kao što su dob veća od 65 god. i hiperhomocisteinemija (kao samostalni biokemijski pokazatelj) i/ili dijagnoza neuropsihijatrijskih bolesti (kao isključivo klinički pokazatelj).

10. Analizom zajedničkog utjecaja sva tri bitna čimbenika na učinkovitost cijepljenja protiv influence, dobi, prethodnog antigenskog iskustva (broja prethodnih cijepljenja i visine ostatnog titra protutijela za četiri testirana tipa virusa influence), te poremećaja zdravstvenog stanja, po kriteriju da se slaba reakcija na cjepivo smatra ako je do $\geq 4x$ porasta titra protutijela došlo na samo jednu, ili nije došlo ni na jednu komponentu cjepiva, u skupini pretežno starijih osoba s kroničnim bolestima, dob se nije pokazala kao rizični čimbenik. Prethodna cijepljenja imaju izrazito značajan protektivni učinak, posebno prethodno cijepljenje od 2-3 puta. Nepovoljan utjecaj ima imunosna reakcija na antigenski sličnu komponentu iz prethodnog sastava cjepiva (heterologna reakcija), kao što je u ovom radu slučaj s antigenom B/Sicuan. U manjoj mjeri, nepovoljan utjecaj mogu imati i neki patogenetski poremećaji koji kao intermedijarni mehanizmi povezuju poremećaje općeg zdravstvenog stanja s poremećajima u funkciji imunskog sustava, kao što su relativna limfopenija (smanjen postotak limfocita u diferencijalnoj krvnoj slici) i metabolički poremećaji povezani s deficitom vitamina B₁₂ i hiperhomocisteinemijom. Utjecaj poremećaja zdravstvenog stanja na ishod cijepljenja protiv influence bi mogao doći više do izražaja u situacijama cijepljenja u kojima se realno očekuje slaba produkcija specifičnih protutijela.

SAŽETAK

Godišnje cijepljenje trokomponentnim inaktiviranim cjepivom se odavno smatra najuspješnijim načinom prevencije influence. Taj postupak se posebno preporučuje starijim osobama (>65 godina) i osobama s kroničnim bolestima koje su i najviše sklone razvoju komplikacija od influence. Međutim, pokazalo se da je zaštitni učinak cijepljenja u starijih osoba značajno slabiji, nego u mlađih osoba.

U radu smo željeli procijeniti u kojoj mjeri pojedini od tri bitna čimbenika, prethodno antigensko iskustvo (primarna imunizacija, ostatni titar protutijela i broj prethodnih cijepljenja), starija dob (>65 god.) i poremećaji zdravstvenog stanja koji prate starenje, utječu na učinkovitost cijepljenja protiv influence. Poseban cilj je bio utvrditi koje bi kronične bolesti i patogenetski poremećaji mogle smanjiti serološki odgovor na cjepivo, budući da se o tome problemu još vrlo malo zna.

Ispitivanje je provedeno za vrijeme rutinskog postupka cijepljenja protiv influence, u sezoni 2003/2004 god., u jednoj ambulanti opće medicine. Za sudjelovanje u ispitivanju svoj informirani pristanak su dale 93 osobe, 35 M i 58 Ž, stare 50-89 godina (medijan 69), od ukupno 150 osoba koliko ih se te godine dobrovoljno cijepilo protiv influence. Lokalno Etičko povjerenstvo za medicinska istraživanja je odobrilo ispitivanje.

Za analizu titrova protutijela, ovisno o broju prethodnih cijepljenja i dobi, koristili smo klasične statističke metode (χ^2 , Kruskal-Wallis i Fisher exact test).

Da utvrdimo koji bi poremećaji zdravstvenog stanja koji prate starenje mogli imati najveći negativni utjecaj na serološki odgovor na cjepivo protiv influence, primijenili smo metodu strojnog učenja, na već pripremljenu bazu podataka. Konkretno, u radu su korišteni algoritmi ILLM (*Inductive Learning by Logic Minimization*) sustava, razvijeni u Laboratoriju za informacijske sustave Instituta "Rudjer Bošković" u Zagrebu. Bazu podataka je činilo 52 parametra koji su uključivali dob, spol, dijagnoze najvažnijih skupina kroničnih bolesti starije dobi, antropometrijske mjere, te hematološke i biokemijske laboratorijske analize.

Zajednički utjecaj sva tri čimbenika, prethodnog antigenskog iskustva (broj prethodnih cijepljenja i ostatni titar protutijela za četiri testirana tipa virusa influence), dobi, te parametara zdravstvenog stanja, na učinkovitost cijepljenja, smo analizirali metodom logističke regresije (model sa svim uključenim varijablama, te modeli s postepenim uključivanjem i isključivanjem varijabli, *forward* i *backward*). Od

parametara zdravstvenog stanja, u analizu su ušli samo oni koje smo prethodno dobili metodom strojnog učenja.

Rezultati su pokazali da su samostalni čimbenici koji mogu utjecati na učinkovitost cijepljenja protiv influence prethodno antigensko iskustvo i poremećaji zdravstvenog stanja koji prate starenje, dok se utjecaj starije dobi ne može odvojiti od utjecaja tih dvaju čimbenika.

Zaštitni učinak cijepljenja, tj. postotak osoba sa zaštitnim titrom protutijela ($\geq 1:40$), u osoba starih 50 i više godina, s više kroničnih bolesti, kakve se najčešće i cijepaju protiv influence u ambulantama opće medicine, nakon ponovljenih cijepljenja se općenito ne smanjuje. Mogućnost da do toga dođe postoji jedino u osoba prethodno cijepljenih puno (četiri i više) puta, ali samo za komponentu cjepiva čiji se sastav u cjepivu često mijenja. Slab učinak cijepljenja se može očekivati i u onih osoba koje se cijepaju prvi put, na komponentu cjepiva A/H₁N₁, poznatu po čestom odsustvu ostatnog titra protutijela.

Primjenom algoritama ILLM sustava na bazu podataka, prema četiri različita kriterija za definiciju slabe serološke reaktivnosti na cjepivo protiv influence, nađene su prepoznatljive strukture u podacima. Tim putem, iz baze podataka smo selekcionirali 16 parametara koji mogu služiti kao prediktori slabog serološkog odgovora. Ti parametri su: postotak mononuklearnih leukocita i limfocita u diferencijalnoj krvnoj slici, hormon štitne žlijezde tiroksin (fT₄), vitamin B₁₂ (ili njegov ekvivalent-parametar MCV), β -globulini, debljina kožnog nabora iznad nadlaktice, klirens kreatinina, aminokiselina homocistein, γ -globulini, IgA specifična protutijela na mikroorganizam *Helicobacter pylori*, hormon hipofize prolaktin, glukoza u krvi na tašte, serumski albumin, starija dob i tireoidni stimulirajući hormon hipofize (TSH).

Od tih dobivenih parametara, najbolji prediktori, prema pravilima ILLM algoritama, su oni koji predstavljaju dva para međusobno povezanih poremećaja, a to su „povećan postotak monocita i smanjen postotak limfocita u diferencijalnoj krvnoj slici“, te „deficit vitamina B₁₂ i hiperhomocisteinemija“.

Primjenom dodatnih algoritama, za pojedine od selekcioniranih parametara, mogao se steći bolji uvid u način kako su parametri međusobno povezani u funkcionalne cjeline. Na taj način smo identificirali četiri klinička stanja, najvjerojatnije povezana sa slabim serološkim odgovorom na cjepivo protiv influence. Ta klinička stanja su: smanjena bubrežna funkcija (posebno sindrom karakteriziran upalom, malnutricijom, poremećajem metabolizma glukoze i hiperhomocisteinemijom), mentalni i

neurodegenerativni poremećaji (posebno oni povezani s promjenama u hipotalamusu i hipofizi, praćeni hiperprolaktinemijom), hipofunkcija štitne žlijezde (hipotireoza), te kronični gastritis uzrokovan infekcijom bakterijom *Helicobacter pylori*. Svoj negativni utjecaj na imunosnu reakciju ta klinička stanja vjerojatno ostvaruju putem zajedničkih intermedijarnih mehanizama, kao što su: pomicanje ravnoteže imunosnog odgovora od specifične prema nespecifičnoj i staničnoj imunosti, upala, kronična imunizacija, proteinska malnutricija, poremećaj metabolizma glukoze, te metabolički poremećaji povezani s deficitom vitamina B₁₂ i hiperhomocisteinemijom.

U konačnici, ovi rezultati ukazuju da je negativan utjecaj starije dobi na učinkovitost cijepljenja protiv influence najvjerojatnije posljedica brojnih poremećaja zdravstvenog stanja koji mogu oslabiti funkciju imunosnog sustava, budući da se ti poremećaji najčešće i pojavljuju u starijoj dobi. Prisustvo više poremećaja zdravstvenog stanja u jedne osobe otežava klinički probir osoba koje bi mogle slabo serološki reagirati. Veliki dio tih osoba bi se ipak mogao prepoznati na relativno jednostavan način, po značajkama kao što su dob veća od 65 godina i hiperhomocisteinemija (kao samostalni biokemijski pokazatelj) i/ili dijagnoza neuropsihijatrijskih bolesti (kao isključivo klinički pokazatelj).

Analizom zajedničkog utjecaja sva tri bitna čimbenika na učinkovitost cijepljenja, po kriteriju da se slaba reakcija na cjepivo protiv influence smatra ako je do $\geq 4x$ porasta titra protutijela došlo na jednu, ili nije došlo ni na jednu komponentu cjepiva, starija dob se nije pokazala kao rizični čimbenik. Najboljim prediktorom su se pokazala prethodna cijepljenja. Pri tome, najbolji protektivni učinak je imalo prethodno cijepljenje od 2-3 puta (OR 0,062, 95% CI 0,006-0,634). Negativan utjecaj na učinkovitost cijepljenja, prema rezultatima ove analize, može imati imunosna reakcija na komponentu iz prethodnog sastava cjepiva (heterologna reakcija), kao što je u ovom radu slučaj s komponentom B/Sicuan (OR 1,050, 95% CI 1,003-1,100).

Poremećaji zdravstvenog stanja u manjoj mjeri utječu na učinkovitost cijepljenja od prethodnog antigenskog iskustva i to nepovoljno. Pri tome su za predikciju bitni intermedijarni mehanizmi koji povezuju kronične bolesti i poremećaje općeg zdravstvenog stanja s promjenama u funkciji imunosnog sustava. U ovoj analizi, primijeri za to su relativna limfopenija (smanjen postotak limfocita u diferencijalnoj krvnoj slici) (OR 0,942, 95% CI 0,889-0,998), te metabolički poremećaji povezani s deficitom vitamina B₁₂ (OR 0,998, 95% CI 0,994-1,002) i hiperhomocisteinemijom (OR 1,150, 95% CI 0,998-1,326). Utjecaj poremećaja zdravstvenog stanja na ishod

cijepljenja protiv influence bi mogao više doći do izražaja u situacijama cijepljenja u kojima se realno očekuje slaba produkcija specifičnih protutijela. Na takav zaključak navode rezultati *forward* analize koja je pokazala da uvođenje parametara zdravstvenog stanja u logistički model značajno povećava vrijednost modela za predviđanje slabog serološkog odgovora na cjepivo (negativna prediktivna vrijednost modela). Time su rezultati dobiveni metodom logističke regresije potvrdili rezultate dobivene prethodnim analizama.

Tri oblika logističke regresijske analize mogu predvidjeti 76,9% (model sa svim varijablama) i 75,8% (modeli *forward* i *backward*) svih rezultata serološkog odgovora na cjepivo protiv influence ($p=0,002$, $0,041$ i $0,003$).

ABSTRACT

Annual vaccination with a trivalent inactivated influenza vaccine has for a long time been widely accepted method for the prevention of influenza. This procedure is advised primarily for the elderly (>65) and subjects with chronic medical conditions, because of their susceptibility for the development of influenza complications. However, it has been shown that the vaccine efficacy in the elderly is significantly lower than in the younger population groups.

The aim of this study was to analyse the relative impact of the three main factors, previous antigenic exposure (original antigenic sin, preexisted antibody titres and repeated vaccinations), older age (>65) and age-related health disorders, on the influenza vaccine efficacy. The special aim was to identify which chronic diseases and pathogenic disorders may negatively influence the influenza vaccine serologic response, since it has so far been poorly recognized problem.

The study was conducted during a routine vaccination procedure against influenza, in the season 2003/2004, in a general medicine practice. Informed consent was obtained from 93 subjects, 35 M and 58F, aged 50-89 years (median 69), out of a total of 150 subjects who were vaccinated. The study was approved by the Regional Ethics Committee on Medical Research.

Classical statistical methods (the χ^2 , Kruskal-Wallis and Fisher exact tests) were used to analyse antibody titres, according to the number of previous vaccinations and age.

To identify age-related health disorders with potentially largest negative impact on the influenza vaccine serologic response, we applied the Machine Learning method on already prepared Data Base. Exactly, algorithms of the ILLM (Inductive Learning by Logic Minimization) system, developed in the Laboratory for Information System, Institute Rudjer Bošković, Zagreb, were used. The Data Base, used in the study, was composed of a total number of 52 clinical parameters, including age, sex, diagnoses of the main chronic aging diseases, anthropometric measures and hematological and biochemical laboratory tests.

Logistic regression (full model and two stepwise forms, forward and backward) was performed to determine the common impact of all three factors, previous antigenic exposure (the number of previous vaccinations and preexisted antibody titres for four tested influenza virus strains), older age and the health-*status* data, on the influenza

vaccine efficacy. Only those health-status data previously selected by using Machine Learning method, were included in the model.

The results showed that the independent factors which may influence the influenza vaccine efficacy are previous antigenic exposure and age-related health disorders, while the impact of older age can hardly be separated from these two factors.

Generally, the protective vaccine efficacy, i.e. the percent of subjects with protective antibody level ($\geq 1:40$), in subjects aged 50 years and more, with multiple chronic conditions, which are usually vaccinated in general practice, does not decrease after repeated vaccination. Only in subjects previously vaccinated for many (four and more) times, there is the possibility for the vaccine efficacy to decrease, in comparison with the first vaccination, but only for vaccine component which content has frequently been changed. The low vaccine efficacy can also be expected in subjects receiving vaccine for the first time, on the component A/H₁N₁, characterized by frequent absence of preexisted antibody titres.

By ILLM algorithms, applied on the Data Base according to four criteria for definition of the low serologic response, recognizable patterns in the data were identified. Consequently, 16 different parameters were selected which can serve as potential predictors of the low influenza vaccine serologic response. These parameters are: the percent of mononuclear leukocyte and lymphocyte in WBC (White Blood Cell) differential, the thyroid gland hormone thyroxine (fT₄), thyroid-stimulating hormone (TSH), vitamin B₁₂ and its equivalent - Mean Cell Volume (MCV), β -globulins, γ -globulins, triceps skinfold thickness, creatinine clearance, homocysteine, *Helicobacter pylori* specific immunoglobuline A, the pituitary gland hormone prolactin, blood fasting glucose, serum albumin and older age (>65).

Among these selected parameters, the best predictors, according to the rules of ILLM algorithms, are those representing two pairs of mutually related disorders, such as „increased percent of monocytes and decreased percent of lymphocytes in WBC differential“ and „vitamin B₁₂ deficiency and hyperhomocysteinemia“.

By using additional ILLM algorithms, for particular of selected parameters, we set apart interconnected parameters forming functional units. In this way, we identified four clinical conditions most likely associated with the low serologic response. These clinical conditions are: impaired renal function (particularly the syndrome characterized by inflammation, malnutrition, glucose metabolism impairment and hyperhomocysteinemia), mental and neurodegenerative disorders (especially those

connected with changes in the hypothalamus and the pituitary gland, associated with hyperprolactinemia), the thyroid gland hormones hypofunction (hypothyreosis) and chronic gastritis caused by the *Helicobacter pylori* infection. These clinical conditions may negatively influence the influenza vaccine serologic response via common intermediate mechanisms, such as: turning the bias of the immune reaction from the specific to the nonspecific and cellular immune response, inflammation, chronic immunization, protein malnutrition, glucose metabolism impairment and metabolic disorders associated with vitamin B₁₂ deficiency and hyperhomocysteinemia.

Finally, based on these results, the negative impact of older age on the influenza vaccine efficacy could be the result of a number of the health-status impairments influencing negatively the immune system function, since these impairments most frequently occur in older age. Several health-status disorders simultaneously existing in one person make the prediction of the influenza vaccine serologic response difficult. A large proportion of the subjects which might have the low influenza vaccine serologic response could however be identified on a relatively simple way, based on characteristics such as age older than 65 years and hyperhomocysteinemia (as an independent biochemical marker) and/or diagnosis of neuropsychiatric diseases (as the clinical marker only).

Based on the analysis of the common impact of all three main factors influencing the influenza vaccine efficacy, using $\geq 4x$ increase in antibody titres for one or none vaccine component as criteria for definition of the low serologic response, older age was not selected as a significant risk factor. The best predictor was repeated vaccinations. Especially, previous vaccinations of 2-3 times showed the best beneficial effect (OR 0,062, 95%CI 0,006-0,634). Based on this analysis, immune reaction on the vaccine component contained in the influenza vaccine before the last content exchange (heterologous reaction), as it is, in this study, the case with the vaccine component B/Sicuan, may significantly negatively influence the influenza vaccine efficacy (OR 1,050, 95%CI 1,003-1,100).

Compared to the factors related to previous antigenic exposure, the health-status disorders showed only minor, albeit non-beneficial effect. For the purpose of prediction, intermediate mechanisms, linking chronic diseases and the general health-status disorders with the immune system dysfunctions, could be of the main importance. Examples, based on this analysis, are relative lymphopenia (decreased percent of lymphocytes in WBC differential) (OR 0,942, 95%CI 0,889-0,998) and

metabolic disorders associated with vitamin B₁₂ deficiency (OR 0,998, 95%CI 0,994-1,002) and hyperhomocysteinemia (OR 1,150, 95%CI 0,998-1,326). Based on the results obtained by the logistic regression analysis, type forward, showing the significant improvement of the capability of the model to predict the low influenza vaccine serologic response (the negative predictive power) when the health-status data are included in the model, it can be concluded that the health-status disorders might have much greater impact on the influenza vaccine efficacy in situations where poor postvaccination specific antibody production is expected. In this way, results obtained by the logistic regression have proved the results obtained by the previously used methods.

Three selected models of performed logistic regression analysis can predict 76,9% (full model) and 75,8% (both forward and backward types) of the total results of the influenza vaccine serologic response (p=0,002, 0,041 and 0,003 respectively).

POPIS LITERATURE

1. Beverly P. Vaccination. U: Roitt I, Brostoff J, Male D, ur. Immunology. šesto izd. Edinburgh-London-New York-Philadelphia-St Louis-Sydney-Toronto: Mosby; 2001, str. 277-286.
2. Rouse BT, Moylett E, Hanson IC. Vaccines. U: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzin BL, Schroeder HW, ur. Clinical immunology. Principles and practice. deseta sekcija. Prevention and therapy of immunologic diseases. drugo izd. vol.1. London-Edinburgh-New York-Philadelphia-St Louis-Sydney-Toronto: Mosby; 2001, pogl.112.
3. Mims C, Nash A, Stephen J. Vaccines and how they work. U: Mims C, Nash A, Stephen J, ur. MIMS'pathogenesis of infectious disease. peto izd. San Diego-San Francisco-New York-Boston-London-Sydney-Tokyo: Academic Press; 2001, str. 392-414.
4. Gray D, Ahmed R. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 1996;272:54-60.
5. Plotkin SA. Immunologic correlates of protection induced by vaccination. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:63-75.
6. Webster RG. Immunity to influenza in the elderly. *Vaccine* 2000; 18:1686-1689.
7. Murasko DM, Bernstein ED, Gardner EM, Gross P, Munk G, Dran S, Abrutyn E. Role of humoral and cell-mediated immunity in protection from influenza disease after immunization of healthy elderly. *Exp Gerontol* 2002; 37: 427-439.
8. Mbawuikie IN, Fujihashi K, DiFabio S, Kawabata S, McGhee JR, Couch RB, Kiyono H. Human interleukin-12 enhances interferon- γ -producing influenza-specific memory CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *J Infect Dis* 1999;180:1477-1486.
9. Price GE, Gaszewska-Mastarlarz A, Moskophidis D. The role of alpha/beta and gamma interferons in development of immunity to influenza A virus in mice. *J Virol* 2000;74(9):3996-4003.
10. Remarque E.J. Influenza vaccination in elderly people. *Exp Gerontol* 1999; 34:445-452.
11. de Jong JC, Beyer WEP, Palache AM, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME. Mismatch between the 1997/1998 influenza vaccine and the major epidemic A(H3N2) virus strain as the cause of an inadequate vaccine-induced antibody response to this strain in the elderly. *J Med Virol* 2000; 61:94-99.
12. Smith DJ, Forrest S, Ackley DH, Perelson AS. Variable efficacy of repeated annual influenza vaccination. *PNAS* 1999; 96(24):14001-14006.
13. Kunzel W, Glathe H, Engelmann H, Van Hoecket Ch. Kinetics of humoral antibody response to trivalent inactivated split influenza vaccine in subjects previously vaccinated or vaccinated for the first time. *Vaccine* 1996;14(12):1108-10.
14. Pyhala R, Kumpulainen V, Alanko S, Forsten T. HI antibody kinetics in adult volunteers immunized repeatedly with inactivated trivalent influenza vaccine in 1990-1992. *Vaccine* 1994;12(10):947-52.
15. de Bruijn IA, Remarque EJ, Jol-van der Zijde CM, van Tol MJD, Westendorp RGJ, Knook DL. Quality and quantity of the humoral immune response in healthy elderly and young subjects after annually repeated influenza vaccination. *J Infect Dis* 1999;179:31-6.
16. Beyer WEP, de Bruijn IA, Palache AM, Westendorp RGJ, Osterhaus ADME. Protection against influenza after annually repeated vaccination. A meta-analysis of serologic and field studies. *Arch Intern Med* 1999;159:182-88.
17. Pyhala R, Kinnunen L, Kumpulainen V, Ikonen N, Kleemola M, Cantell K. Vaccination-induced HI antibody to influenza A(H1N1) viruses in poorly primed adults under circumstances of low antigenic drift. *Vaccine* 1993;11(10):1013-17.
18. Kovaïou RD, Herndler-Brandstetter D, Grubeck-Loebenstien B. Age-related changes in immunity: implications for vaccination in the elderly. *Expert Rev Mol Med* 2007;9(3):1-10.
19. Gravenstein S, Drinka PJ, Duthie EH. Risks for influenza and respiratory illness in vaccinated elderly. *Aging:Immun Infectious Dis.* 1990;2:185-193.
20. Govaert TME, Thijs CTMCN, Masurel N, Sprenger MJW, Dinant GJ, Knottnerus JA. The efficacy of influenza vaccination in elderly individuals: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *JAMA* 1994;272:1661-5.
21. Govaert ThME, Sprenger MJW, Dinant GJ, Aretz K, Masurel N, Knottnerus JA. Immune response to influenza vaccination of elderly people. A randomized double-blind placebo-controlled trial. *Vaccine* 1994;12(13):1185-1189.
22. Palache AM, de Bruijn IA, Nauta J. Influenza immunisation. I. Influenza vaccination policies and new vaccine developments. II. Fifteen years's experience with a subunit influenza vaccine. *J Clin es* 1999;2:111-139.

23. van Dijk-Hard I, Soderstrom I, Feld S, Holmberg D, Lundkvist I. Age-related impaired affinity maturation and differential D-JH gene usage in human VH6-expressing B lymphocytes from healthy individuals. *Eur J Immunol* 1997; 27:1381-1386.
24. McElhane JE, Gravenstein S, Upshaw CM, Hooton JW, Krause P, Drinka P. Immune response to influenza vaccination in institutionalized elderly: effect on different T-cell subsets. *Vaccine* 1998;16(4):403-409.
25. Kutza J, Gross P, Kaye D, Murasko DM. Natural killer cell cytotoxicity in elderly humans after influenza immunization. *Clin Diag Lab Immunol* 1996;3(1):105-108.
26. Schwaiger S, Wolf AM, Robatscher P, Jenewein B, Grubeck-Loebenstein B. IL-4 producing CD8⁺T cells with a CD62L⁺⁺(bright) phenotype accumulate in a subgroup of older adults and are associated with the maintenance of intact humoral immunity in old age. *J Immunol* 2003;170:613-619.
27. Cristofalo VJ, Gerhard GS, Pignolo RJ. Molecular biology of aging. In: Zenilman ME, Roslyn JJ, ur. *The surgical clinics of North America. Surgery in the elderly patient I. vol.74 (1).* Philadelphia: Saunders company; 1994, str.1-21.
28. Hamet P, Tremblay J. Genes of aging. *Metabolism* 2003; 52(10) Suppl 2: 5-9.
29. Gonos ES. Genetics of aging: lessons from centenarians. Mini-review. *Exp Gerontol* 2000; 35:15-21.
30. Charlesworth B. Evolutionary mechanisms of senescence. *Genetica* 1993;91:11-19.
31. Hughes KA, Alipaz JA, Drnevich JM, Reynolds RM. A test of evolutionary theories of aging. *PNAS* 2002; 99(22):14286-14291.
32. Campisi J. Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. *Exp Gerontol* 2003; 38:5-11.
33. Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 1996,10:709-20.
34. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B - a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *NEJM* 1997;336:1066-71.
35. Semsei I. On the nature of aging. *Mech Age Dev* 2000;117:93-108.
36. Franceschi C, Valensin S, Bonafe M, Paolisso G, Yashin AI, Monti D i sur. The network and the remodelling theories of aging: historical background and new perspectives. *Exp Gerontol* 35 (6-7):879-896.
37. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S. Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity and the filling of immunological space: *Vaccine* 2000;18:1717-1720.
38. Paolisso G, Barbieri M, Bonafe M, Franceschi C. Metabolic age modelling: the lesson from centenarians. *Eur J Clin Invest* 2000;30:888-894.
39. Barbieri M, Rizzo MR, Manzell D, Grella R, Ragno E, Carbonella M i sur. Glucose regulation and oxidative stress in healthy centenarians. *Exp Gerontol* 2003;38:137-143.
40. Vasto S, Candore G, Balistreri CR, Caruso M, Colona-Romano G, Grimaldi MP i sur. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Age Dev* 128:83-91.
41. Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F i sur. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Age Dev* 128:92-105.
42. Kriete A, Sokhansanj BA, Coppok DL, West GB. Systems approaches to the network of aging: review. *Age Res* 2006;5:434-448.
43. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genetics suppl* 20003;33:244-254.
44. Lipsitz LA. Dynamics of stability: the physiologic basis of functional health and frailty. *J Gerontol* 2002; 57A(3): 115-125.
45. Manton KG. Dynamic paradigms for human mortality and aging. *J Gerontol* 1999; 54(6):247-254.
46. Coffey DS. Self-organization, complexity and chaos: the new biology for medicine. *Nat Med* 1998; 4(8):882-885.
47. Crevecoeur GU. A system approach modelling of the three-stage non-linear kinetics in biological ageing. *Mech Age Dev* 2001; 122:271-290.
48. Systems biology [pristupljeno 2008 prosinac 13]; dostupno s: http://en.wikipedia.org/wiki/Systems_biology.
49. Kitano H. Systems biology: A brief overview. *Science* 2002;295(5560):1662-1664.

50. Iris F. Biological modeling in the discovery and validation of cognitive dysfunctions biomarkers. U: Turck CW, ur. Biomarkers for psychiatric disorders. prvo izd. New York: Springer Science. Business Media, LLC; 2008, str. 473-522.
51. Kapetanovic IM, Rosenfeld S, Izmirlian G. Overview of commonly used bioinformatics methods and their applications. *Ann NY Acad Sci* 2004;1020:10-21.
52. Kern J. Informacijska tehnologija u odlučivanju, klasificiranju i predviđanju. U: Kern J, ur. Medicinskoinformatičke metode. Zagreb: Medicinska naklada; 2006, str. 36-94.
53. Aw D, Silva AB, Palmer DB. Immunosenescence:emerging challenges for an ageing population. Review article. *Immunology* 2007;120:435-446.
54. Miller RA. The aging immune system. Primer and prospectus. *Science* 1996;273:70-273.
55. Globerson A, Effros RB. Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol Today* 2000; 21(10):515-521.
56. Solana R, Pawelec G. Molecular and cellular basis of immunosenescence. *Mech Age Dev* 1998; 102:115-129.
57. Pawelec G, Adibzadeh M, Solana R, Beckman I. The T cell in the ageing individual. *Mech Age Dev* 1997; 93:35-45.
58. Effros RB, Pawelec G. Replicative senescence of T cells: does the Hayflick limit lead to immune exhaustion? *Immunol Today*. Review 1997;18(9):450-454.
59. Sandberg JK, Fast NM, Nixon DF. Functional heterogeneity of cytokines and cytolytic effector molecules in human CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 2001; 167:181-187.
60. Xu X, Beckman I, Aharen M, Bradley J. A comprehensive analysis of peripheral blood lymphocytes in healthy aged humans by flow cytometry. *Immunol Cell Biol* 1993;71:549-557.
61. Kudlacek S, Jahandideh-Kazempour S, Graninger W, Pietschmann P. Differential expression of various T cell surface markers in young and elderly subjects. *Immunobiol* 1995;192:198-204.
62. Hamann D, Baars PA, Hooibrink B, van Lier RAW. Heterogeneity of the human CD4+ T-cell population: two distinct CD4+ T-cell subsets characterized by coexpression of CD45RA and CD45RO isoforms.
63. Yen C-J, Lin S-L, Huang K-T, Lin R-H. Age-associated changes in interferon- γ and interleukin-4 secretion by purified human CD4+ and CD8+ T cells. *J Biomed Sci* 2000; 7:317-321.
64. Karanfilov CI, Liu B, Fox CC, Lakshmanan RR, Whisler RL. Age-related defects in Th1 and Th2 cytokine production by human T cells can be dissociated from altered frequencies of CD45RA+ and CD45RO+ T cell subsets. *Mech Age Dev* 1999; 109:97-112.
65. Sandmand M, Bruunsgaard H, Kemp K, Andersen-Ranberg K, Pedersen AN, Skinhoj P, Pedersen BK. Is ageing associated with a shift in the balance between type 1 and type 2 cytokines in humans? *Clin Exp Immunol* 2002; 127:107-114.
66. Gardner EM, Murasko DM. Age-related changes in type 1 and type 2 cytokine production in humans. *Biogerontol* 2002; 3:271-289.
67. Fagnoni FF, Vescovini R, Mazzola M, Bologna G, Nigro E, Lavagetto G i sur. Expansion of cytotoxic CD8+CD28- T cells in healthy ageing people, including centenarians. *Immunol* 1996;88:501-507.
68. Monteiro J, Batliwalla F, Ostrer H, Gregersen PK. Shortened telomeres in clonally expanded CD28-CD8+ T cells imply a replicative history that is distinct from their CD28-CD8+ counterparts. *J Immunol* 1996;156:3587-3590.
69. Effros R, Boucher N, Porter V, Zhu X, Spaulding C, Walford RL et al. Decline in CD28+ T cells in centenarians and in long-term T cell culture: a possible cause for both *in vivo* and *in vitro* immunosenescence. *Exp Gerontol* 1994;29(6):601-609.
70. Wack A, Cossarizza A, Heltai S, Barbieri D, D'Addato S, Franceschi C i sur. Age-related modifications of the human $\alpha\beta$ T cell repertoire due to different clonal expansions in the CD4+ and CD8+ subsets. *Int Immunol* 1998; 10(9): 1281-1288.
71. Joss A, Akdis M, Faith A, Blaser K, Akdis CA. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. *Eur J Immunol* 2000;30:1683-1690.
72. Saurwein-Teissl M, Lung TL, Marx F, Gschosser C, Asch E, Blasko I i sur. Lack of antibody production following immunization in old age: association with CD8+CD28- T cell clonal expansions and an imbalance in the production of Th1 nad Th2 cytokines. *J Immunol* 2002; 168:5893-5899.
73. Greenspan NS, Gor DO, Wei B-R. Immunoglobulin function. U: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzin BL, Schroeder HW, ur. Clinical immunology. Principles and practice. druga sekcija. Host defense mechanisms and inflammation, drugo izd. vol.1. London-Edinburgh-New York-Philadelphia-St Louis-Sydney-Toronto: Mosby; 2001, pogl.14.

74. Weksler ME, Szabo P. The effect of age on the B-cell repertoire. *J Clin Immunol* 2000; 20(4): 240-249.
75. Wang X, Stollar BD. Immunoglobulin VH gene expression in human aging. *Clin Immunol* 1999; 93(2):132-142.
76. Ferguson SE, Han S, Kelsoe G, Thompson CB. CD28 is required for germinal center formation. *J Immunol* 1996; 156:4576-4581.
77. Schroeder HW, Radbruch A, Berek C. B-cell development and differentiation. U: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzin BL, Schroeder HW, ur. *Clinical immunology. Principles and practice. Prva sekcija. Principles of immune recognition. drugo izd. vol.1.* London-Edinburgh-New York-Philadelphia-St Louis-Sydney-Toronto: Mosby; 2001, pogl.9.
78. Kosco-Vilbois MH, Zentgraf H, Gerdes J, Bonnefoy J-Y. To 'B' or not to 'B' a germinal center? *Viewpoint. Immunol Today* 1997;19(5):225-229.
79. McHeyzer-Williams MG, Ahmed R. B cell memory and the long-lived plasma cell. *Curr Opin Immunol* 1999;11:172-179.
80. Chikako M, Hisami W, Masahiro M, Hiromu T, Toshihiko K, Yumiko N i sur. Numerical and functional characteristics of lymphocyte subsets in centenarians. *J Clin Immunol* 1997;17(5):420-429.
81. Solana R, Mariani E. NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine* 2000;18:1613-1620.
82. Ohkawa T, Seki S, Dobashi H, Koike Y, Habu Y, Ami K et al. Systematic characterization of human CD8+ T cells with natural killer cell markers in comparison with natural killer cells and normal CD8+ T cells. *Immunol* 2001;103:281-290.
83. Mims C, Nash A, Stephen J. Microbial strategies in relation to the immune response. U: Mims C, Nash A, Stephen J, ur. *MIMS' pathogenesis of infectious disease, peto izd.* San Diego-San Francisco-New York-Boston-London-Sydney-Tokyo: Academic Press; 2001, str.183-214.
84. Miyaji C, Watanabe H, Toma H, Akisaka M, Tomiyama K, Sato Y, Abo T. Functional alteration of granulocytes, NK cells, and Natural Killer T cells in centenarians. *H Immunol* 2000;61:908-916.
85. Sadeghi HM, Schnelle JF, Thomas JK, Nishanian P, Fahey JL. Phenotypic and functional characteristics of circulating monocytes of elderly persons. *Exp gerontol* 1999;34:959-970.
86. Rink L, Cakman I, Kirchner H. Altered cytokine production in the elderly. *Mech Age Dev* 1998;102:199-209.
87. Fagiolo U, Cossarizza A, Scala E, Fanales-Belasio E, Ortolani C, Cozzi E i sur. Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *Eur J Immunol* 1993;23:2375-2378.
88. Gross PA. The efficacy of influenza vaccine in elderly persons. A meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med.* 1995;123:518-27.
89. Castle CS. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clin Infect Dis* 2000;31:578-585.
90. Wick G, Grubeck-Loebenstein B. Primary and secondary alterations of immune reactivity in the elderly: impact of dietary factors and disease. *Immunol Rev* 1997;160:171-184.
91. Pozzetto B, Odelin MF, Bienvenu J, Defayolle M, Aymard M. Is there a relationship between malnutrition, inflammation, and post-vaccinal antibody response to influenza viruses in elderly? *J Med Virol* 1993;41(1):39-43.
92. Schonitzer D, Jurgens G. The decline of the immune response during aging: the role of an altered lipid metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 1991;621:277-299.
93. Stuling TM. *In vivo* LDL receptor and HMG-CoA reductase regulation in human lymphocytes and its alterations during aging. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:872-78.
94. Jennings BJ, Ozanne SE, Hales CN. Nutrition, oxidative damage, telomere shortening, and cellular senescence: individual or connected agents of aging? *Mol Genetics Met* 2000;71:32-42.
95. Hirota Y, Kaji M, Ide S, Goto S, Oka T. The hemagglutination inhibition antibody responses to an inactivated influenza vaccine among healthy adults: with special reference to the prevaccination antibody and its interaction with age. *Vaccine* 1996;14(17/18):1597-1602.
96. Marjanović K, Soldo-Butković S, Kralj M, Soldo I, Marjanović M, Hanzer N. The incidence of stroke in Baranya county (east Croatia). *Coll Antropol* 2003;27:547-549.
97. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2000-2007.
98. Center for Disease Control and Prevention, Immunization Practices Advisory Committee. Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2007;56(RR-6):1-54.

99. Hemagglutination-Inhibition (HAI) Test. U: Lennette EH, Jung M, Jung F, ur. Serology of infectious disease syndromes. Zurich (Switzerland): Virion Edition, 1989, str. 43.
100. Čepelak I, Dodig S, Labar B, Štraus B, ur. Medicinsko-biokemijske smjernice. prvo izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2004.
101. McGrath RE, ur. Understanding statistics. A reserach perspective. United States: Addison Wesley Educational Publishers Inc; 1996.
102. Cambell MJ, ur. Statistics at square two. Understanding modern statistical applications in medicine. United Kingdom: Blackwell Publishing; 2006.
103. Machine Learning [pristupljeno 2008 prosinac 22]; dostupno s: http://en.wikipedia.org/wiki/Machine_learning.
104. Larranaga P, Calva B, Santana R, Bielza C, Galdiano J, Inza I i sur. Machine learning in bioinformatics. Briefings in bioinformatics 2005;7(1):86-112.
105. Fayyad U, Piatetsky-Shapiro G, Smyth P. From Data Mining to Knowledge Discovery in Databases [AI Magazine 17-03-2-article] 1996 [pristupljeno 2008 travanj 17]; dostupno s <http://www.daedalus.es/fileadmin/daedalus/doc/MineriaDeDatos/fayyad96.pdf>.
106. Gamberger D, Šmuc T. Data Mining Server. Zagreb (Hrvatska): Institut Ruđer Bošković. Laboratorij za Informacijske sustave; 2001 [pristupljeno 2009 siječanj 9]; dostupno s: [http://dms.irb.hr/].
107. Algorithms: the basic methods. U: Witten IH, Frank E, ur. Data Mining. Practical Machine Learning Tools and Techniques. drugo izd. San Francisco: Elsevier, Morgan Kaufmann Publishers; 2005. str. 83-142.
108. WEKA. Machine Learning project at the University of Waikato in New Zealand. [2009 siječanj 19]; dostupno s: <http://www.cs.waikato.ac.nz/ml/weka/>.
109. Gamberger D, Šmuc T, Lavrač N. Subgroup Discovery: On-line Data Mining Server and its application. U: Arnez ZM, Brebbia CA, Solina F, Stankovski V, ur. Simulations in Biomedicine V. WIT press; 2003, str. 433-442.
110. Sonicki Z, Gamberger D, Šmuc T, Sonicki D, Kern J. Data Mining Server-On-line Knowledge Induction tool. Stud Health Technol Inform 2002;90:330-334.
111. Effros RB. Long-term immunological memory against viruses. Mech Age Dev 2000;121:161-71.
112. Trzonkowski P, Mysliwska J, Szmit E, Wieckiewicz J, Lukaszuk K, Brydak LB i sur. Association between cytomegalovirus infection, enhanced proinflammatory response and low level of anti-hemagglutinins during the anti-influenza vaccination - an impact of immunosenescence. Vaccine 2003;21(25-26):3826-36.
113. Madden SK, Felten DL. Experimental basis for neural-immune interactions. Physio Rev 1995;75:77-106.
114. Toates F. The nervous, endocrine and immune systems. U: John Wiley&Sons, ur. Stress. Conceptual and biological aspects.prvo izd. West Sussex: John Wiley&Sons; 1995, str. 72-85.
115. Rothwell NJ, Hopkins SJ. Cytokines and the nervous system II: actions and mechanisms of action. Reiew. Trends Neurosci 1995;18:130-36.
116. Ader R. On the development of psychoneuroimmunology. Eur J Pharmac 2000;405:167-176.
117. Marques-Deak A, Cizza G, Sternberg E. Brain-immune interactions and disease susceptibility. Mol Psychiatry 2005;10:239-50.
118. Fulop T, Wagner JR, Khalil A, Weber J, Trottier L, Payette H. Relationship between the response to influenza vaccination and the nutritional status in institutionalized elderly subjects. J Gerontol A Biol Med Sci 1999;54(2):59-64.
119. Volkert D, Kruse W, Oster P, Schlierf G. Malnutrition in geriatric patients: diagnostic and prognostic significance of nutritional parameters. Ann Nutr Metab 1992;36(2):97-112.
120. Clarke R, Grimley EJ, Schneede J, Nexo E, Bates C, Fletcher A et al. Vitamin B₁₂ and folate deficiency in later life. Age Ageing 2004;33(1):34-41.
121. Pike J, Chandra RK. Effect of vitamin and trace element supplementation on immune indices in healthy elderly. Internat J Vit Nutr Res 1995;65:117-120.
122. Ershler WB, Keller ET. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases and frailty. Ann Rev Med 2000;51:245-270.
123. Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, Corti MC, Wacholder S, Ettinger WH i sur. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. Am J Med 1999;106(5):506-12.

124. Bender BS, Nagel JE, Adler WH, Andres R. Absolute peripheral blood lymphocyte count and subsequent mortality of elderly men. *JAGS* 1986;34:649-654.
125. Myckatyn SO, Russell AS. Outcome of positive antinuclear antibodies in individuals without connective tissue disease. *J Rheumatol* 2003;30(4):736-9.
126. Ryan J, Zoellner Y, Gradl B, Palache B, Medema J. Establishing the health and economic impact of influenza vaccination within the European Union 25 countries. *Vaccine* 2006;24(47-48):6812-6822.
127. Kim S-Y, Goldie SJ. Cost-effectiveness analyses of vaccination programmes. A focused review of modelling approaches. *Pharmacoeconomics* 2008;26(3):191-215.
128. Betts RF, Treanor JJ. Approaches to improved influenza vaccination. *Vaccine* 2000;18(6):1690-1695.
129. Tosh PK, Poland GA. Emerging vaccines for influenza. *Expert Opin Emerg Drugs* 2008;13(1):21-40.
130. Nichol KL, Treanor JJ. Vaccines for seasonal and pandemic influenza. *J Infect Dis* 2006;194(suppl 2):S111-S118.
131. Straetemans M, Buchholz U, Reiter S, Haas W, Krause G. Prioritization Strategies for pandemic influenza vaccine in 27 countries of the European Union and the Global Health Security Action Group: a review. *BMC Public Health* 2007;7:236-248.
132. Stephenson I, Nocholson KG, Wood JM, Zambon MC, Katz JM. Confronting the avian influenza threat; vaccine development for a potential pandemic. *Lancet Infect Dis* 2004;4(8):499-509.
133. Allsup S, Haycox A, Regan M, Gosney M. Is influenza vaccination cost effective in patients from high risk groups. *Drugs* 2000;60(1):35-53.
134. van Hoecke C, Prikazsky V, Uto I, Menschikowski C. Immunogenicity of an inactivated split influenza vaccine in institutionalized elderly patients. *Gerontology* 1996;42(4):190-198.
135. Brydak LB, Machala M. Humoral immune response to influenza vaccination in patients from high risk groups. *Drugs* 2000;60(1):35-53.
136. Pozzilli P, Gale EA, Visalli N, Baroni M, Crovari P, Frighi V i sur. The immune response to influenza vaccination in diabetic patients. *Diabetologia* 1986;29(12):850-854.
137. Kohut ML, Cooper MM, Nickolaus MS, Russell DR, Cunnick JE. Exercise and psychosocial factors modulate immunity to influenza vaccine in elderly individuals. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002;57(9):M557-M562.
138. Hara M, Tanaka K, Hirota Y. Immune response to influenza vaccine in healthy adults and the elderly: association with nutritional status. *Vaccine* 1989;7(5):385-394.
139. Beyer WEP, de Brujin IA, Palache Am, Westendorp RGJ, Osterhaus ADME. The plea against annual influenza vaccination? The „Hoskins’ paradox“ revisited. *Vaccine* 1998;16:1929-32.
140. McElhyney JE, Meneilly GS, Lechelt KE, Beattie BL, Bleackley RC. Antibody response to whole-virus and split-virus influenza vaccines in successful aging. *Vaccine* 1993;11(10):1055-60.
141. de Brujin IA, Remarque EJ, Beyer WE, le Cessie S, Masurel N, Ligthart GJ. Annually repeated influenza vaccination improves humoral responses to several influenza virus strains in healthy elderly. *Vaccine* 1997;15(12/13):1323-29.
142. Ligthart GJ, Corberand JX, Fournier C, Galanaud P, Hijmans W, Kennes B, Muller-Hermelink HK, Steinmann GC. Admission criteria for immunogerontological studies in man: the senior protocol. *Mech Age Dev* 1984;28:47-55.
143. Remarque EJ, Cools HJM, Boere TJ, van der Klis RJ, Masurel N, Ligthart GJ. Functional disability and antibody response to influenza vaccine in elderly patients in a Dutch nursing home. *BMJ* 1996;312:1015-22.
144. Gross PA, Quinnan GV, Weksler ME, Setia U, Douglas RG. Relation of chronic disease and immune response to influenza vaccine in the elderly. *Vaccine* 1989;7:303-8.
145. Proust J, Rosenzweig P, Debouzy C. Lymphopenia induced by acute bacterial infections in the elderly: a sign of age related immune dysfunction of major prognostic significance. *Gerontology* 1985;31:178-85.
146. Bender BS, Nagel JE, Adler WH, Andres R. Absolute peripheral blood lymphocyte count and subsequent mortality of elderly men. The Baltimore longitudinal study of aging. *J Am Geriatr Soc* 1986;34:649-54.
147. Caruso C, Bongiardina C, Candore G, Cigna D, Romano GC, Colucci AT i sur. HLA-B8,DR3 haplotype affects lymphocyte blood levels. *Immunol Invest* 1997;26(3):333-340.

148. Schroecksnadel K, Frick B, Wirleitner B, Winkler C, Schennach H, Fuchs D. Moderate hyperhomocysteinemia and immune activation. *Curr Pharmaceut Biotech* 2004;5:107-118.
149. Kuo HK, Sorond FA, Chen JH, Hashmi A, Milberg WP, Lipsitz LA. The role of homocysteine in multisystem age-related problems: a systematic review. *J Gerontol A Biol Med Sci* 2005;60(9):1190-201.
150. Fenech MF, Dreosti IE, Rinaldi JR. Folate, vitamin B₁₂, homocysteine status and chromosome damage rate in lymphocytes of older men. *Carcinogenesis* 1997;18(7):1329-36.
151. Dang Chi V. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis and metabolism. *Mol Cell Biol* 1999;19(1):1-11.
152. Widner B, Leblhuber F, Frick B, Laich A, Artner-Dworzak E, Fuchs D. Moderate hyperhomocysteinemia and immune activation in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2002;109(12):1445-52.
153. Reutens S, Sachdev P. Homocysteine in neuropsychiatric disorders of the elderly. *Int J Geriatr Psychiatry* 2002;17(9):859-64.
154. Postiglione A, Milan G, Ruocco A, Gallotta G, Guiotto G, Di Minno G. Plasma folate, vitamin B (12) and total homocysteine and homozygosity for the C677T mutation of the 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase gene in patients with Alzheimer's dementia. A case-control study. *Gerontology* 2001;47(6):324-29.
155. Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C et al. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1997;57(6):1098-102.
156. Coppen A, Bolander-Gouaille C. Treatment of depression: time to consider folic acid and vitamin B12. *J Psychopharmacol* 2005;19(1):59-65.
157. Sipponen P, Laxen F, Huotari K, Harkonen M. Prevalence of low vitamin B₁₂ and high homocysteine in serum in an elderly male population: association with atrophic gastritis and *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 2003;38(12):1209-216.
158. Landray MJ, Thambyrajah J, McGlynn FJ, Jones HJ, Baigent C, Kendall MJ i sur. Epidemiological evaluation of known and suspected cardiovascular risk factors in chronic renal impairment. *Am J Kidney Dis* 2001 38(3):537-46.
159. Qureshi AR, Alvestrand A, Danielsson A, Divino-Filho JC, Gutierrez A, Lindholm B i sur. Factors predicting malnutrition in hemodialysis patients: a cross-sectional study. *Kidney Int* 1998;53(3):773-82.
160. Fuchs D, Jaeger M, Widner B, Wirleitner B, Artner-Dworzak E, Leblhuber F. Is hyperhomocysteinemia due to the oxidative depletion of folate rather than to insufficient dietary intake? *Clin Chem Lab Med* 2001;39(8):691-94.
161. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E i sur. Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence. *An NY Ac Sc* 2000;908:244-254.
162. Macy EM, Hayes TE, Tracy RP. Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy subjects: implications for reference intervals and epidemiological applications. *Clin Chem* 1997;43(1):52-8.
163. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei X-F et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998;101(2):311-320.
164. Ramadori G, Christ B. Cytokines and the hepatic acute-phase response. *Sem Liv Dis* 1999;19(2):141-55.
165. Ferrucci L, Harris TB, Guralnik JM, Tracy RP, Corti MC, Cohen HJ et al. Serum IL-6 level and the development of disability in older persons. *J Am Geriatr Soc* 1999;47(6):755-56.
166. Mysliwska J, Bryl E, Foerster J, Mysliwski A. Increase of interleukin 6 and decrease of interleukin 2 production during the ageing process are influenced by the health status. *Mech Age Develop* 1998;100:313-28.
167. Sandmand M, Bruunsgaard H, Kemp K, Andersen-Ranberg K, Pedersen AN, Skinhoj P, Pedersen BK. Is ageing associated with a shift in the balance between type 1 and type 2 cytokines in humans? *Clin Exp Immunol* 2002; 127:107-114.
168. Vejda S, Posovszky C, Zelzer S, Peter B, Bayer E, Gelbmann D i sur. Plasma from cancer patients featuring a characteristic protein composition mediates protection against apoptosis. *Mol Cell Proteomics* 2002;1(5):387-93.
169. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signalling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(19):1974-84.
170. Sergi G, Coin A, Enzi G, Volpato S, Inelmen EM, Buttarollo M et al. Role of visceral proteins in detecting malnutrition in the elderly. *Eur J Clin Nutr* 2006;60(2):203-9.

171. Du J, Mitch WE. Identification of pathways controlling muscle protein metabolism in uremia and other catabolic conditions. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005;14(4):378-82.
172. Lawson JA, Lazarus R, Kelly JJ. Prevalence and prognostic significance of malnutrition in chronic renal insufficiency. *J Ren Nutr* 2001;11(1):16-22.
173. Mitch WE. Proteolytic mechanisms, not malnutrition, cause loss of muscle mass in kidney failure. *J Ren Nutr* 2006;16(3):208-11.
174. Yao Q, Lindholm B, Stenvinkel P. Inflammation as a cause of malnutrition, atherosclerotic cardiovascular disease and poor outcome in hemodialysis patients. *Hemodialysis Int* 2004; 8:118-129.
175. Pozzetto B, Odelin MF, Bienvenu J, Defayolle M, Aymard M. Is there a relationship between malnutrition, inflammation, and post-vaccinal antibody response to influenza viruses in elderly? *J Med Virol* 1993;41(1):39-43.
176. Batory G, Jancso A, Puskas E, Redei A, Lengyel E. Antibody and immunoglobulin levels in aged humans. *Arch Gerontol Geriatr* 1984;3(2):175-88.
177. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, Braverman LE. Serum TSH, T4 and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994).
178. Aversano M, Caiazzo P, Iorio G, Ponticiello L, Lagana B, Leccese F. Improvement of chronic idiopathic urticaria with L-thyroxine:a new TSH role in immune response? *Allergy* 2005; 60(4):489-93.
179. Loviselli A, Calia MA, Murenu S, Mossa P, Cambosu MA, Caradona A. Circulating soluble IL-2 receptor levels are low in patients with hypothyroid autoimmune thyroiditis. *Horm Metab Res* 1994; 26(11):548-51.
180. Candore G, Di Lorenzo G, Mansueto P, Melluso M, Frada G, Li Vecchi M i sur. Prevalence of organ-specific and non organ-specific autoantibodies in healthy centenarians. *Mech Ageing Dev.* 1997;94(1.3):183-90.
181. Dorshkind K, Horseman ND. The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency. *Endocrine Rev* 2000;21(3):202-312.
182. Klein JR, Wang HC. Characterization of a novel set of resident intrathyroidal bone marrow-derived hematopoietic cells:potential for immune-endocrine interactions in thyroid homeostasis. *J Exp Biol* 2004;207(1):55.65.
183. Bagriacik EU, Zhou Q, Wang HC, Klein JR. Rapid and transient reduction in circulating thyroid hormones following systemic antigen priming: implications for functional collaboration between dendritic cells and thyroid. *Cell Immunol* 2001;212(2):92-100.
184. Bhaskaran M, Ranjan R, Shah H, Siu J, Colvin R, Radhakrishan N i sur. Lymphopenia in dialysis patients: a preliminary study indicating a possible role of apoptosis. *Clin Nephrol* 2002;57(3):221-29.
185. Fernandez-Fresnedo G, Ramos MA, Gonzalez-Pardo MC, de Francisco AL, Lopez-Hoyos M, Arias M. B lymphopenia in uremia is related to an accelerated in vitro apoptosis and dysregulation of Bcl-2. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15(4):502-10.
186. Pecoits-Filho R, Lindholm B, Stenvinkel P. The malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA) syndrome - the heart of the matter. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17 Suppl 11:28-31.
187. Luger A, Lang I, Kovarik J, Stummvoll HK, Templ H. Abnormalities in the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 1987;9(1):51-4.
188. Kutlay S, Atli T, Koseogullari O, Nergizoglu G, Duman N, Gullu S. Thyroid disorders in hemodialysis patients in an iodine-deficient community. *Artif Organs* 2005;29(4):329-32.
189. Reinhardt W, Mann K. Non-thyroid illness or changed thyroid hormone parameter syndrome with non-thyroid illnesses. *Med Klin* 1998;93(11):662-68.
190. Carta MG, Loviselli A, Hardoy MC, Massa S, Cadeddu M, Sardu C i sur. The link between thyroid autoimmunity (antithyroid peroxidase autoantibodies) with anxiety and mood disorders in the community: a field of interest for public health in the future. *BMC Psychiatry* 2004;4:25-31.
191. Holley JL. The hypothalamic-pituitary axis in men and women with chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2004;4:337-41.

192. Magri F, Locatelli M, Balza G, Molla G, Cuzzoni G, Fioravanti M i sur. Changes in endocrine circadian rhythms as markers of physiological and pathological brain aging. *Chronobiol Int* 1997;14(4):385-96.
193. Lewy H, Ashkenazi IE, Touitou Y. Prolactin rhythms-oscillators' response to photoperiodic cues is age and circadian time dependent. *Neurobiol Aging* 2005;26(1):125-33.
194. Presečki V, Katičić M, Marušić M, Kalenić S, Strnad M, Plečko V i sur. Serološka dijagnostika infekcije *Helicobacterom Pylori*. *Liječ Vjesn* 2002;124(S1):23-28.
195. Wyatt JL, Shallcross TM, Crabree JE, Heatley RV. *Helicobacter pylori*, gastritis and peptic ulceration in the elderly. *J Clin Pathol* 1992;45:1070-74.
196. Futagami S, Takahashi H, Norose Y, Kobayashi M. Systemic and local immune responses against *Helicobacter pylori* urease in patients with chronic gastritis; distinct IgA and IgG productive sites. *GUT* 1998;43:168-75.
197. Peek RM, Miller GG, Tham Kyi T, Perez-Perez GI, Zhao X, Atherton JC i sur. Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to *cagA*⁺ *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest* 1995;71(12):760-70.
198. Neri M, Reale M, Di Febbo C, Festi D, Calafiore AM, Conti P et al. Increased levels of soluble tumour necrosis factor receptor I (sTNF RI) in serum of *Helicobacter pylori*-positive ischemic heart disease patients. *Gastroenterology* 1996;110:A209.
199. Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE, Dogan A, Spencer J. Immunoglobulin specificity of low grade B cell gastrointestinal lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) type. *Am J Pathol* 1993;142(1): 285-92.
200. Barnes KC, Marsh DG. The genetics and complexity of allergy and asthma. *Immunol Today* 1998;19(7):325-32.
201. Foster M, Montecino-Rodriguez R, Clark R, Dorshkind K. regulation of B and T cell development by anterior pituitary hormones. *Cell Mol Life Sci* 1998;54:1076-82.
202. Sonino N, Navarrini C, Ruini C, Fallo F, Boscaro M, Fava GA. Life events in the pathogenesis of hyperprolactinemia. *Eur J Endocrinol* 2004;151(1):61-65.
203. Olf M. Stress, depression and immunity: the role of defense and coping styles. *Psychiat Res* 1999;85:7-15.
204. Burns VE, Carroll D, Drayson M, Whitham M, Ring C. Life events, perceived stress and antibody response to influenza vaccination in young, healthy adults. *J Psychosom Res* 2003;55(6):569-72.
205. Phillips AC, Carroll D, Burns VE, Drayson M. Neuroticism, cortisol reactivity and antibody response to vaccination. *Psychophysiology* 2005;42(2):232-38.
206. Vedhara K, Cox NK, Wilcock GK, Perks P, Hunt M, Anderson S i sur. Chronic stress in elderly carers of dementia patients and antibody response to influenza vaccination. *Lancet* 1999;353(9153):627-31.
207. Guidi L, Tricerri A, Frasca D, Vangeli M, Errani AR, Bartoloni C. Psychoneuroimmunology and aging. *Gerontology* 1998;44(5):247-61.
208. Magri F, Cravello L, Barili L, Sarra S, Cinchetti W, Salmoiraghi F i sur. Stress and dementia: the role of the hypothalamopituitaryadrenal axis. *Aging Clin Exp Res* 2006;18(2):167-70.
209. Scott TM, Tucker KL, Bhadelia A, Benjamin B, Patz S, Bhadelia R i sur. Homocysteine and B vitamins relate to brain volume and white-matter changes in geriatric patients with psychiatric disorders. *Am J Geriatr Psychiatry* 2004;12(6):631-38.
210. Franceschi C, Monti D, Sansoni P, Cossarizza A. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunol Today* 1995;16(1):12-16.
211. Perls T, Levenson R, Regan M, Puca A. What does it take to live to 100? *Mech Age Dev* 2002; 123:231-242.