

L'uso di sostanze antiossidanti ed immunomodulanti in una popolazione anziana sottoposta a vaccinazione antinfluenzale aumenta la risposta anticorpale e riduce gli episodi respiratori

Antioxidant and immunomodulating compounds in older people undergoing seasonal influenza vaccination improve serological response and reduce tract respiratory episodes

Summary

Background: Between 40 and 50% of elderly people (>65 years old) are vaccinated against seasonal influenza in Italy every year. However active immunization only occurs in a relatively small number of vaccinated people and does not always last for the entire winter season. Oxidative stress might be one of the factors involved in this low antibody response. **Aims:** To assess whether supplementation with a compound based on resveratrol reduces oxidative stress and increases the proportion of immunized people. **Design and methods:** Seventy-one elderly subjects (>65 years old), 26 of which were affected with mild-moderate COPD, who voluntarily underwent vaccination for the 2009-2010 season, were randomly assigned to receive a supplement based on resveratrol (n=35) or no supplement (n=36) for four consecutive twenty-day cycles. The first cycle started five days before the vaccination. The antibody titre against one of the three antigens contained in the vaccine [A/Brisbane/10/2007 (H3N2)] was measured before the vaccination (T-5) and again after 20 days (T1) and 4 months (T2). Oxidative stress was also measured (plasma H₂O₂) at times T1 and T2. Respiratory episodes were recorded from the vaccination up to the end of the trial. **Results:** Active immunization, defined as an increase in antibody titre ≥ 4 times baseline, occurred in 45.4% of supplemented subjects and 27.3% of controls (p<0.05). Significant decreases were also observed in oxidative stress (-21.5%; p<0.05) and respiratory episodes (-11.5%; p=0,058) in the supplementation group compared to subjects who had only received vaccine. The decrease in oxidative stress was lower in the COPD subgroup than in the whole study population. **Conclusions:** Administering a compound based on resveratrol decreases oxidative stress and increases the number of immune subjects four months after vaccination.

Pregliasco F, Cogo R. Antioxidant and immunomodulating compounds in older people undergoing seasonal influenza vaccination improve serological response and reduce tract respiratory episodes. *Trends Med* 2010; 10(3):175-182.

©2010 Pharma Project Group srl. ISSN: 1594-2848

Fabrizio Pregliasco¹, Roberto Cogo²

¹Dipartimento di Sanità Pubblica - Virologia - Microbiologia
Università degli Studi di Milano

²UO Riabilitazione Cardio-Respiratoria, Ospedale A. Zappatoni, Cassano d'Adda -MI-

Key words:

vaccin*
influenza
antibody
elderly
response
immun*
supplement

✉ Fabrizio Pregliasco

Dipartimento di Sanità Pubblica - Virologia - Microbiologia
Università degli Studi di Milano
Via C. Pascal, 36 - 20133 Milano

Nella maggior parte dei sistemi sanitari dei paesi industrializzati la vaccinazione contro l'influenza stagionale è erogata gratuitamente nella popolazione considerata a maggior rischio, in particolare nei pazienti over 65 e/o con specifiche comorbilità. Tale politica sanitaria si basa sul presupposto che i costi sostenuti per una profilassi vaccinale su così vasta scala, siano controbilanciati dai risparmi in prestazioni sanitarie e ricoveri ospedalieri evitati in conseguenza delle complicanze associate agli episodi influenzali. Non sempre tuttavia il rapporto costo/beneficio della profilassi antinfluenzale negli anziani sani si è dimostrato favorevole sotto il profilo economico per l'erogatore della prestazione^{1,2}.

Questo aspetto è probabilmente da attribuire all'evocazione di una risposta anticorpale insufficiente del vaccino nei soggetti anziani, un aspetto noto già da molti anni ed oggetto di numerosi studi sperimentali e speculazioni cliniche³⁻⁵. La ridotta capacità immunizzante nell'anziano sembra essere associata a due differenti cause: 1) meccanismi di senescenza fisiologica del sistema immunitario^{6,7}; 2) carenza di alcune sostanze necessarie per una buona risposta allo stimolo immunogeno, particolarmente micronutrienti, cofattori enzimatici e vitamine^{8,9}.

Il ruolo di deficit nutrizionali nella risposta a vari stimoli antigenici, inclusa la vaccinazione antinfluenzale, è stato comprovato da numerosi studi condotti sia in modelli animali sia nell'uomo, evidenziando la necessità di mantenere entro limiti ben definiti, i livelli plasmatici di tali sostanze^{10,11}. Alcuni gruppi di ricerca hanno anche ipotizzato che nei pazienti anziani possano aversi non solo titoli anticorpali più bassi rispetto alla controparte più giovane, ma anche una accelerata "clearance" anticorpale, con ritorno più rapido del titolo ai livelli pre-vaccinazione, suggerendo l'utilità di una dose di richiamo nei soggetti particolarmente esposti^{12,13}.

Un aspetto del deficit immunitario nell'anziano più recentemente studiato, sia come condizione di fondo sia in risposta a stimoli antigenici, è quello relativo al ruolo giocato dello stress ossidativo: alcuni studi hanno infatti dimostrato che il deficit di alcune vitamine, in particolare E e C, può aumentare la pigrizia immunitaria e che la supplementazione può invertire il deficit e stimolare una maggiore risposta^{14,15}. Queste osservazioni, in realtà sporadiche, hanno però avuto una recente ed autorevole conferma circa il meccanismo di fondo da parte di Netzer e collaboratori: questo gruppo ha infatti pubblicato su *Nature* che un esaltato

stress ossidativo a livello delle cellule dell'immunità può alterare la fedeltà dei processi di trascrizione genica, con produzione di anticorpi con struttura stereochimica alterata e scarsamente funzionali¹⁶.

Sulla base di questi dati sono stati approntati numerosi studi clinici che hanno utilizzato supplementi contenenti vitamine e micronutrienti in associazione alla vaccinazione, con l'obiettivo di valutare se un *booster* dello status nutrizionale migliorava la risposta alla stimolazione anticorpale^{17,18}. I risultati di questi trial non sono sempre stati lusinghieri e le ragioni dell'insuccesso possono essere attribuite al tipo di supplemento, ai dosaggi (alcune vitamine hanno un range molto ristretto al di sopra del quale l'effetto è deleterio) o alla popolazione inclusa^{8,19,20}.

Popolazione e metodi

Soggetti inclusi

Nello studio sono stati inclusi 71 soggetti anziani (>65 anni) di entrambi i sessi, in buone condizioni generali, portatori di patologie croniche non invalidanti e tipiche dell'età (ipertensione, dislipidemia, etc), che spontaneamente si sottoponevano a vaccinazione antinfluenzale per l'anno 2009-2010 [vaccino contenente antigene analogo al ceppo A/Brisbane/59/2007 (H1N1), antigene analogo al ceppo A/Brisbane/10/2007 (H3N2), antigene analogo al ceppo B/Brisbane/60/2008]. Nel campione erano inclusi anche 26 pazienti con diagnosi di broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) in stadio GOLD I-II. Sono stati esclusi i pazienti portatori di patologie immuni/autoimmuni, quelli con diagnosi di neoplasie solide o ematologiche, quelli con diabete insulino-dipendente o con patologie metaboliche e cardiovascolari non compensate o con insufficienza epatica e renale (tabella 1).

Tabella 1. Profilo clinico dei pazienti alla randomizzazione.

	Vac/Suppl (n°35)	Vac (n°36)
Età (range)	66.8 (63-77)	65.9 (61-71)
Maschi (%)	21 (60.0)	22 (61,1)
Femmine (%)	14 (40.0)	14 (38.9)
Comorbidità, esclusa BPCO (%)	22 (62.8)	24 (66.6)
Stress ossidativo (UCARR)	360.2	371.1
Con episodi influenzali nell'anno precedente	18 (51.4)	21 (58.3)
BPCO (%)	13 (37.1)	13 (36.1)
-Stress ossidativo (UCARR)	396.6	391.9

Criteri di randomizzazione

Settantuno soggetti sono stati randomizzati in modo sequenziale si/no, fatti salvi i criteri di esclusione: 35 nel braccio attivo e 36 nel braccio di controllo. Questa semplice modalità di randomizzazione è stata possibile poiché l'età e gli altri parametri clinici ed epidemiologici variavano entro un range relativamente ristretto. Nella popolazione era incluso un sottogruppo di 26 pazienti con diagnosi di BPCO, 13 nel braccio attivo e 13 nel braccio di controllo. I due gruppi sono risultati omogenei per caratteristiche cliniche ed epidemiologiche senza variazioni statisticamente significative.

Obiettivi

Lo studio è stato disegnato con l'intento di verificare se la supplementazione con un composto multi-componente, in compresse solubili in acqua (Resvis XR, Biofutura Pharma SpA, Pomezia, Italia), ciascuna contenente resveratrolo (10 mg), estratto di arancia rossa (160 mg), Zinco (15 mg) e vitamina C (180 mg), somministrato per 4 cicli di 20 giorni cadauno, iniziando 5 giorni prima della vaccinazione, fosse in grado di: 1) potenziare l'effetto immunogeno della vaccinazione; 2) ridurre lo stress ossidativo; 3) ridurre gli episodi influenzali per tutta la durata dello studio (4 mesi); 4) ridurre gli episodi di riacutizzazione nei pazienti con diagnosi di BPCO.

Disegno dello studio e protocollo

I 35 soggetti allocati al braccio attivo erano sottoposti a vaccinazione più l'uso di un supplemento (1 cpr/die), mentre i 36 soggetti allocati al braccio di controllo si sottoponevano alla sola vaccinazione. La supplementazione iniziava nei 5 giorni precedenti la vaccinazione (T-5) e proseguiva per complessivi 20 giorni. Al tempo T-5 veniva eseguito il primo dosaggio (basale) del titolo anticorpale verso il ceppo A/Brisbane/10/2007 (H3N2). Dopo 20 giorni dalla vaccinazione (T1) veniva eseguito un secondo

dosaggio del titolo anticorpale ed il primo dosaggio dello stress ossidativo. A 10 giorni dall'assunzione dell'ultima compressa i soggetti vaccinati iniziavano un secondo ciclo, sempre della durata di 20 giorni, ed a seguire, con lo stesso schema, un terzo ed un quarto ciclo, per una durata complessiva di 120 giorni (figura 1). Al termine dello studio (10-20 gg dopo l'ultima dose di supplemento) i soggetti sono stati sottoposti ad un ultimo dosaggio del titolo anticorpale e dello stress ossidativo.

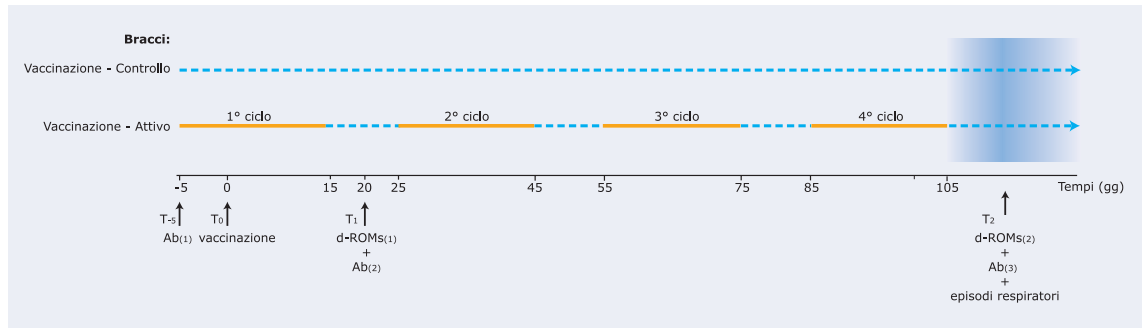
Misura degli endpoint

Per quanto riguarda il titolo anticorpale è stato utilizzato il dosaggio delle immunoglobuline anti- A/Brisbane/10/2007 (H3N2) eseguito con test di inibizione dell'emoagglutinazione secondo lo standard definito dall'APHA/ASM 1979²¹. I soggetti con incremento del titolo ≥ 2 volte rispetto al basale sono stati considerati *poor responder* mentre i soggetti con incremento ≥ 4 volte sono stati considerati *full responder*, ovvero sieroprotetti.

Il dosaggio dello stress ossidativo è stato eseguito dopo 20 giorni dalla vaccinazione (circa 25 giorni dopo l'inizio della supplementazione) ed al termine dello studio. La valutazione dello stress ossidativo è stata ottenuta utilizzando il d-ROMs[®] test (Diacron International, Grosseto, Italia), un test sufficientemente sensibile ed accurato per dosare le concentrazioni di idroperossido (H_2O_2) nel siero. La concentrazione dell'analita è espressa in Unità Carratelli (UCARR), dove 1UCARR corrisponde a 0.08 mg H_2O_2 /dL di siero. Nei soggetti sani non fumatori le concentrazioni di H_2O_2 sono generalmente < 300 UCARR.

Gli episodi influenzali o simil-inflenzali sono stati classificati come "episodi respiratori" e sono stati annotati dai pazienti a partire dal termine del primo ciclo, circa 20 giorni dopo la vaccinazione in coincidenza con il secondo dosaggio anticorpale, e per tutta la durata residua del trial per complessivi tre

Figura 1. Disegno dello studio e protocollo di intervento.



mesi di follow up. Sono stati considerati episodi respiratori tutte le sindromi influenzali o simil-influenzali trattate dal medico di famiglia o quelle che, annotate dal paziente medesimo, avessero un quadro clinico caratterizzato da almeno 2 dei seguenti sintomi perduranti per almeno tre giorni consecutivi: 1) febbre $>38^{\circ}\text{C}$; 2) dissenteria (≥ 3 scariche/giorno); 3) malessere diffuso; 4) qualunque dei sintomi precedenti associati a tosse o rinorrea.

Risultati

I risultati da noi ottenuti sono parzialmente in linea con quelli riportati da altri^{9,22,23}. Ciò è dovuto sia al supplemento da noi utilizzato, sia ai valori di cut-off fissati per la risposta (clinica ed immunologica).

Effetto immunogeno

Nel nostro studio sierconversione a 20 giorni dalla vaccinazione, intesa come incremento del titolo ≥ 2 volte rispetto al basale, è stata ottenuta nel 68.6% dei soggetti del braccio attivo e nel 75.0% dei controlli, una differenza statisticamente significativa. Se però la soglia di sieroprotezione è definita come incremento del titolo ≥ 4 volte rispetto al basale, a 20 giorni dalla vaccinazione solo il 25% dei controlli è risultato protetto contro il 31.4% di quelli sottoposti a supplementazione adiuvante (tabella 2). Entrambi i dati sono apparsi inaspettatamente bassi se si considera l'età non particolarmente avanzata del campione e le buone condizioni generali all'inclusione.

Al termine dello studio quasi la metà dei supplementati (15/33; 45.4%) risultava ancora protetta dall'infezione, contro meno di 1/3 (9/33; 27.2%) dei vaccinati ($p<0.005$). E' stata quindi condotta una sub-analisi relativa ai 26 pazienti con BPCO

(13+13) per verificare il potenziale immunogeno in questa specifica popolazione. In questo caso i dati ottenuti sono simili a quelli dell'intero campione solo nelle fase precoce dello studio (a 20 gg dalla vaccinazione), con una riduzione sensibile dei controlli protetti al termine dello studio (titolo ≥ 4 volte), con un divario fra supplementati e controlli ulteriormente ampliato (46.2% vs 18.2%; $p<0.001$) (tabella 3). In sintesi molti più pazienti sono risultati sieroprotetti fra i supplementati rispetto ai sottoposti a sola vaccinazione.

Effetti sullo stress ossidativo

Il dosaggio dello stress ossidativo è stato eseguito dopo il primo ciclo (T_1) ed al termine dello studio (T_2). Nel braccio attivo il dosaggio degli idroperossidi ha evidenziato una riduzione media di 59.1 UCARR comparata al valore T_1 (360.2 UCARR). Nel braccio di controllo si è registrato un incremento non significativo (3.5%) al termine dello studio. In figura 2A è possibile rilevare che la supplementazione antiossidante ha indotto una variazione progressiva con una riduzione dello stress ossidativo del 16.4% rispetto al basale ($p<0.05$) ed un guadagno netto alla fine dello studio del 21.5% rispetto al gruppo di controllo ($p<0.01$).

La valutazione condotta sui pazienti affetti da BPCO ha evidenziato concentrazioni plasmatiche di idroperossidi significativamente maggiori in entrambi i bracci già al tempo T_1 (mediana di 394.2 UCARR) rispetto alla controparte senza BPCO (mediana di 365.9 UCARR) un differenza statisticamente significativa. Al termine dello studio nei pazienti BPCO supplementati si è registrata una riduzione dello stress ossidativo pari al 10.9% ($p<0.05$), un effetto non osservato nel braccio di controllo (+2.7% $p=ns$). E' interessante

Tabella 2. Variazione del titolo anticorpale verso l'antigene A/Brisbane/10/2007 a 20 giorni dall'immunizzazione ed al termine dello studio.

Titolo anticorpale a 20 gg	Soggetti (%)	
	Vac/Suppl (n°35)	Vac (n°36)
≥ 2 volte (poor responder)	68.6*	75.0
≥ 4 volte (full responder)	31.4	25.0
Titolo anticorpale finale	Vac/Suppl (n°33)	Vac (n°33)
≥ 2 volte (poor responder)	54.6*	72.8
≥ 4 volte (full responder)	45.4*	27.2

* $p<0.05$ rispetto al controllo vs vaccinazione

Tabella 3. Variazione del titolo anticorpale nella popolazione affetta da BPCO.

Incremento titolo anticorpale a 20 gg	Soggetti (%)	
	Vac/Suppl (n°13)	Vac (n°13)
≥2 volte (<i>poor responder</i>)	69.3*	61.5
≥4 volte (<i>full responder</i>)	30.7	38.5
Incremento titolo anticorpale finale	Vac/Suppl (n°13)	Vac (n°11)
≥2 volte (<i>poor responder</i>)	53.8*	81.8
≥4 volte (<i>full responder</i>)	46.2*	18.2
*p<0.05 vs vaccinazione		

anche notare che la riduzione dello stress ossidativo, pur rilevante per ampiezza, è risultata sensibilmente minore nei pazienti supplementati affetti da BPCO (-10.9%) rispetto ai supplementati non affetti dalla malattia (-16.3%), suggerendo una relazione diretta fra stress ossidativo e risposta clinica.

Effetti sugli episodi infettivi delle alte vie

Nei 66 soggetti valutabili alla fine dello studio sono stati registrati 61 episodi respiratori, 27 dei quali occorsi nel braccio attivo (44.2%) e 34 nel braccio di controllo (55.7%). Complessivamente sono risultati colpiti 25/66 soggetti, 12 in supplementazione (36.3%) e 13 controlli (39.3%) (p=ns). Se si comparano i dati relativi ai giorni di "malattia"

si registrano 53 giorni nei soggetti in supplementazione e 74 nei controlli, per complessivi 127 giorni di malattia, intesa come paziente a domicilio o allettato. Nello studio non era prevista la differenziazione fra episodi da raffreddamento (vedi misura degli end point) ed episodi influenzali ma, considerando che il numero di pazienti colpiti è stato sovrapponibile, è probabile che tale differenza debba essere attribuita al maggior tasso di episodi influenzali, e quindi di maggior durata della convalescenza, fra i controlli (figura 3).

Discussione

Le terapie classificate come "alternative" sono utilizzate in misura crescente nei Paesi industrializ-

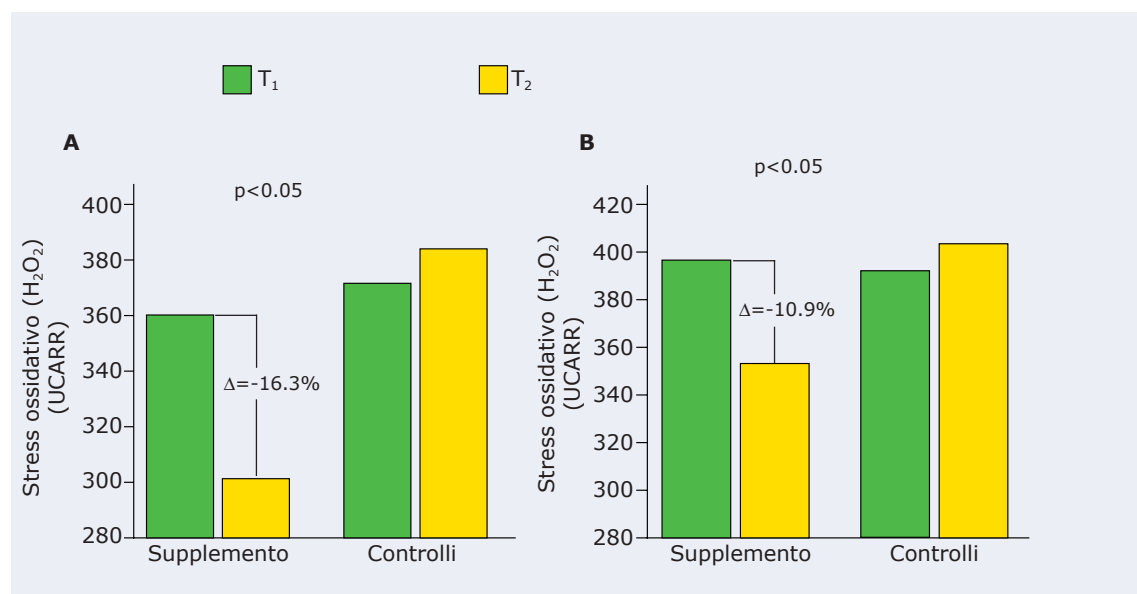
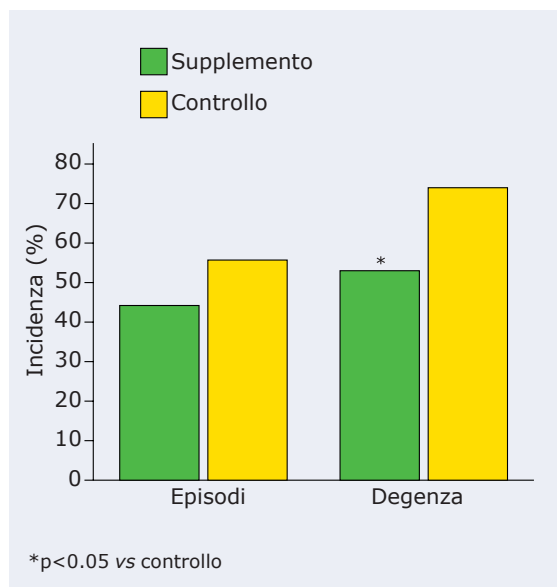
Figura 2. Riduzione dello stress ossidativo nell'intero campione (pannello A) e nella sottopopolazione con BPCO (pannello B).

Figura 3. Incidenza di episodi respiratori e giornate di degenza.

zati e costituiscono talvolta le uniche misure disponibili nei Paesi asiatici o in via di sviluppo^{24,25}. I benefici clinici di tali sostanze variano ampiamente in relazione al grado di purezza ed al tipo di patologia trattata^{26,27}. Negli ultimi anni un'importanza crescente è stata attribuita alle sostanze di origine naturale dotate di attività antiossidante, visto il ruolo dello stress ossidativo nella patogenesi di molte malattie^{28,29}.

Nello studio qui descritto è stato utilizzato il resveratrolo, un potente antiossidante naturale appartenente alla famiglia delle fitoalexine, una molecola con attività biologica pleiotropica, in associazione ad altre sostanze antiossidanti o immunofavorenti, come lo zinco^{30,31}. Il razionale di questa scelta risiede nella constatazione che nei soggetti anziani vi è un incremento dello stress ossidativo, sia correlato all'età che alla presenza di patologie croniche tipiche dell'anziano; inoltre, in alcune patologie l'aumento dello stress ossidativo appare rilevante nel determinare la risposta ai trattamenti e la prognosi: fra queste, paradigmatica appare la BPCO, che in questo trial era presente in circa un terzo degli inclusi; infine, la risposta alla vaccinazione appare meno pronta ed efficace con l'aumentare dell'età.

I risultati da noi ottenuti confermano precedenti esperienze ma sono per molti versi innovativi perché correlano direttamente due parametri: lo stress ossidativo, da noi misurato in modo diretto come concentrazione plasmatica di H_2O_2 , e la risposta anticorpale. In primo luogo abbiamo re-

gistrato valori moderatamente elevati di H_2O_2 , nella popolazione totale inclusa, e sensibilmente più elevati nella sottopopolazione con BPCO (figura 2B).

Inoltre i tassi di immunizzazione da noi osservati, definiti come incremento di almeno 4 volte del titolo anticorpale verso uno dei tre antigeni presenti nel vaccino sono risultati inaspettatamente bassi. Per esempio in uno studio di alcuni anni fa si rilevarono tassi di risposta lievemente maggiori dei nostri in una popolazione istituzionalizzata con età media di gran lunga maggiore (82 anni)³². Questo dato potrebbe dipendere o da un dosaggio anticorpale troppo precoce rispetto alla vaccinazione o dalla presenza di una quota rilevante di pazienti BPCO inclusi.

In quello studio tuttavia la supplementazione con zinco ed arginina non si dimostrò in grado di migliorare l'immunizzazione e ciò potrebbe suggerire la necessità di abbattere lo stress ossidativo come misura prioritaria per consentire al sistema immunitario di rispondere allo stimolo antigenico.

La ricaduta clinica di tali benefici è stata da noi misurata come numero di episodi respiratori occorsi nei due gruppi, episodi intesi in senso generale come affezioni delle alte vie, non avendo la possibilità di porre diagnosi differenziale fra infezione da virus influenzale stagionale e sindromi simil-influenzali. La differenza da noi osservata è stata dell'11.5% a favore dei soggetti in supplementazione attiva, un dato accompagnato dalla parallela riduzione di 21 giorni di malattia nei soggetti sottoposti a misure antiossidanti sia prima della vaccinazione che per cicli consecutivi di 20 gg/mese nei tre mesi successivi.

Conclusioni

L'uso di un supplemento contenente vari antiossidanti polifenolici incluso resveratrolo, più lo Zinco, uno ione coinvolto in vario modo nei meccanismi immunitari, somministrato in adiuvante alla vaccinazione influenzale e per cicli successivi fino ad un massimo di 4 mesi, migliora la risposta anticorpale, riduce significativamente lo stress ossidativo e riduce gli episodi infettivi delle alte vie. I pazienti con diagnosi di BPCO sembrano avere una risposta peggiore al vaccino, anche se "adiuvati", e tale peggioramento si manifesta con una risposta meno rapida ed ampia sia a 20 giorni che a 4 mesi. Quest'ultimo dato potrebbe esser associato ad una montata anticorpale meno ampia o ad una più rapida clearance del titolo nei soggetti anziani. Una valutazione intermedia del ti-

tolo anticorpale a 45-60 giorni dalla vaccinazione avrebbe permesso di fare luce su questo aspetto. Sarebbe inoltre opportuno eseguire i dosaggi dello Zinco al basale e dopo supplementazione, per

verificarne le variazioni plasmatiche e l'impatto sugli enzimi Zinco-dipendenti, enzimi di cui sono noti gli effetti immunostimolanti ma non le modalità con cui tali effetti si esplicano. **TiM**

Bibliografia

1. Allsup S, Gosney M, Haycox A, *et al.* Cost-benefit evaluation of routine influenza immunisation in people 65-74 years of age. *Health Technol Assess* 2003; 7:iii-x, 1-65.
2. Jefferson T, Di Pietrantonj C, Al-Ansary LA, *et al.* Vaccines for preventing influenza in the elderly. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010; 2:CD004876.
3. McElhaney JE. Influenza vaccination in the elderly: seeking new correlates of protection and improved vaccines. *Aging health* 2008; 4:603-613.
4. Simonsen L, Taylor RJ, Viboud C, *et al.* Mortality benefits of influenza vaccination in elderly people: an ongoing controversy. *Lancet Infect Dis* 2007; 7:658-666.
5. Targonski PV, Jacobson RM, Poland GA. Immunosenescence: role and measurement in influenza vaccine response among the elderly. *Vaccine* 2007; 25:3066-3069.
6. Grubeck-Loebenstein B, Della Bella S, Iorio AM, *et al.* Immunosenescence and vaccine failure in the elderly. *Aging Clin Exp Res* 2009; 21:201-209.
7. Kovaiou RD, Herndler-Brandstetter D, Grubeck-Loebenstein B. Age-related changes in immunity: implications for vaccination in the elderly. *Expert Rev Mol Med* 2007; 9:1-17.
8. Pike J, Chandra RK. Effect of vitamin and trace element supplementation on immune indices in healthy elderly. *Int J Vitam Nutr Res* 1995; 65:117-120.
9. Potter JM, O'Donnell B, Carman WF, *et al.* Serological response to influenza vaccination and nutritional and functional status of patients in geriatric medical long-term care. *Age Ageing* 1999; 28:141-145.
10. Fulop T Jr, Wagner JR, Khalil A, *et al.* Relationship between the response to influenza vaccination and the nutritional status in institutionalized elderly subjects. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1999; 54:M59-M64.
11. Monget AL, Galan P, Preziosi P, *et al.* Micronutrient status in elderly people. *Int J Vitam Nutr Res* 1996; 66:71-76.
12. Skowronski DM, Tweed SA, De Serres G. Rapid decline of influenza vaccine-induced antibody in the elderly: is it real, or is it relevant? *J Infect Dis* 2008; 197:490-502.
13. Roos-Van Eijndhoven DG, Cools HJ, *et al.* Randomized controlled trial of seroresponses to double dose and booster influenza vaccination in frail elderly subjects. *J Med Virol* 2001; 63:293-298.
14. Park OJ, Kim HY, Kim WK, *et al.* Effect of vitamin E supplementation on antioxidant defense systems and humoral immune responses in young, middle-aged and elderly Korean women. *J Nutr Sci Vitaminol* 2003; 49:94-99.
15. Alvarado C, Alvarez P, Puerto M, *et al.* Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice. *Nutrition* 2006; 22:767-777.
16. Netzer N, Goodenbour JM, David A, *et al.* Innate immune and chemically triggered oxidative stress modifies translational fidelity. *Nature* 2009; 462:522-526.
17. Bunout D, Barrera G, Hirsch S, *et al.* Effects of a nutritional supplement on the immune response and cytokine production in free-living Chilean elderly. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2004; 28:348-354.
18. Girodon F, Galan P, Monget al, *et al.* Impact of trace elements and vitamin supplementation on immunity and infections in institutionalized elderly patients: a randomized controlled trial. *MIN. VIT. AOX. geriatric network. Arch Intern Med* 1999; 159:748-754.
19. Gaughran F, Walwyn R, Lambkin-Williams R, *et al.* Flu: effect of vaccine in elderly care home residents: a randomized trial. *J Am Geriatr Soc* 2007; 55:1912-1920.
20. Halperin SA, Smith B, Nolan C, *et al.* Safety and immunoenhancing effect of a Chlorella-derived dietary supplement in healthy adults undergoing influenza vaccination: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *CMAJ* 2003; 169:111-117.
21. Dowdle WA, Kendal AP, Noble GR. Influenza viruses. In: Lennette EH, Schmidt NJ, editors. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 5th ed. Washington: American Public Health Association; 1979:585-609.
22. Hemila H. Vitamin C supplementation and common cold symptoms: problems with inaccurate reviews. *Nutrition* 1996; 12:804-809.
23. Langkamp-Henken B, Bender BS, Gardner EM, *et al.* Nutritional formula enhanced immune function and reduced days of symptoms of upper respiratory tract infection in seniors. *J Am Geriatr Soc* 2004; 52:3-12.
24. Eisenberg D, Davis R, Ettner S, *et al.* Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997. *JAMA* 1998; 280:1569-1575.
25. Durante KM, Whitmore B, Jones CA, *et al.* Use of vitamins, minerals and herbs: a survey of patients attending family practice clinics. *Clin Invest Med* 2001; 24:242-249.
26. Herrera E, Jiménez R, Aruoma OI, *et al.* Aspects of antioxidant foods and supplements in health and disease. *Nutr Rev* 2009; 67 (Suppl 1):S140-S144.
27. Webb GP. Nutritional supplements and conventional medicine; what should the physician know? *Proc Nutr Soc* 2007; 66:471-478.
28. Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat Inflamm Allergy*

Drug Discov 2009; 3:73-80.

29. **Dryden GW Jr, Deaciuc I, Arteel G, et al.** Clinical implications of oxidative stress and antioxidant therapy. *Curr Gastroenterol Rep* 2005; 7:308-316.
30. **Pervaiz S, Holme AL.** Resveratrol: its biologic targets and functional activity. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11:2851-2897.
31. **Overbeck S, Rink L, Haase H.** Modulating the immune response by oral zinc supplementation: a single approach for multiple diseases. *Arch Immunol Ther Exp* 2008; 56:15-30.
32. **Provinciali M, Montenovo A, Di Stefano G, et al.** Effect of zinc or zinc plus arginine supplementation on antibody titre and lymphocyte subsets after influenza vaccination in elderly subjects: a randomized controlled trial. *Age Ageing* 1998; 27:715-722.

