

OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2025.01.15

Адреса для листування: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська 69, Львів, 79010, Україна.

Е-пошта: iryna.krill@gmail.com

Надійшла до редакції: 07.04.2025

Прийнята до друку: 20.05.2025

Опублікована: 20.06.2025

ORCID IDs

Валентина Чопяк:

<https://orcid.org/0000-0003-3127-2028>

Наталія Мельникова:

<https://orcid.org/0000-0002-2114-3436>

Наталія Шаховська:

<https://orcid.org/0000-0002-6875-8534>

Ірина Кріль:

<https://orcid.org/0000-0002-6728-5827>

Особистий внесок авторів

Концепція: Валентина Чопяк, Наталія Шаховська;

Написання статті: усі автори однаковою мірою брали участь;

Остаточне затвердження версії для публікації: Ірина Кріль, Валентина Чопяк, Наталія Шаховська.

Конфлікт інтересів: усі автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Дозвіл комісії з питань біоетики: дослідження схвалене комісією з питань біоетики наукових досліджень, експериментальних розробок і наукових творів Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол схвалення № 10 від 9 жовтня 2023 р.).

Фінансування:

стаття опублікована коштом грантової підтримки НФДУ «Методи та засоби дослідження маркерів старіння та їх впливу на постковідні ефекти для подовження працездатного періоду». Державний реєстраційний номер: 0224U032663.



© Всі автори, 2025

АПОПТОТИЧНІ ВЗАЄМОДІЇ ПРИ LONG COVID ТА СТАРІННІ

Валентина Чопяк¹, Наталія Мельникова²,
Наталія Шаховська², Ірина Кріль¹

¹Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

²Національний університет «Львівська політехніка», Львів, Україна

Старіння – це фізіологічний процес, до якого залучені всі системи і тканини організму. Старіння спричиняє хронічне запалення, але і хронічне запалення може потенціювати старіння. Хронічно «активована» імунна система стає прозапальною і посилює вікові запальні процеси.

Мета дослідження – оцінити рівень рецепторно-лігандних взаємодій апоптичних маркерів на цитотоксичних CD8 та NK (CD56) клітинах у хворих із Long COVID.

Методи дослідження охоплювали клінічну оцінку пацієнтів, проточну цитометрію та статистичне опрацювання даних.

Результати. У групі постковідних пацієнтів були вірогідно знижені CD3, CD4 лімфоцити та NK-клітини, а кількість CD8 та CD19 клітин була вірогідно вища порівняно з контрольною групою осіб середнього віку. Щодо експресії ліганда FasL у постковідних пацієнтів, то вірогідна різниця простежувалася як у групі постковідних пацієнтів, так і у групі осіб літнього віку, а в експресії FasR не було вірогідної різниці на NK-клітинах. Стосовно експресії на цитотоксичних CD8 клітинах рецептора PD1R та його ліганда PD1L, то вірогідна різниця виявлена у групі постковідних пацієнтів та групі контролю осіб середнього

віку, але не було виявлено вірогідної різниці між групою постковідних пацієнтів та групою контролю осіб літнього віку.

Висновки. Зміни в експресії апоптичних маркерів у постковідних пацієнтів та осіб літнього віку корелюють між собою, що свідчить про зв'язок між старінням та інфекційним навантаженням у пацієнтів.

Ключові слова: long COVID, цитотоксичні Т-клітини, NK-клітини, старіння, клітинне старіння, апоптоз.

APOPTOTIC INTERACTIONS IN LONG COVID AND AGING

Valentyna Chopyak¹, Nataliia Melnykova², Nataliya Shakhovska², Iryna Kril¹

¹Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

²Lviv Polytechnic National University, Lviv, Ukraine

Aging is a natural process that engages all the body's systems and tissues. Aging leads to chronic inflammation, contributing to the overall aging process. A persistently activated immune system becomes pro-inflammatory, contributing to age-related inflammation.

Objective - to assess the level of receptor-ligand interactions of apoptotic markers on cytotoxic CD8 and NK (CD56) cells in patients with long COVID.

Research methods comprised clinical evaluation of patients, flow cytometry, and statistical data analysis.

Results. There was a significant reduction in CD3, CD4 lymphocytes, and NK cells among long COVID patients, while CD8 and CD19 cells were significantly elevated compared to the control group of middle-aged individuals. Concerning the expression of the FasL ligand in long COVID patients, a notable difference was found between long COVID patients and older age groups. In contrast, no significant difference was noted in the expression of FasR on NK cells. In terms of expression of the PD1R receptor and its ligand PD1L on cytotoxic CD8 cells, a notable difference was observed between the long COVID patient group and the middle-aged control group; however, no significant difference was noted between the long COVID patient group and the older control group.

Conclusions. Changes in the expression of apoptotic markers in long COVID-19 patients and elderly individuals correlate, suggesting a connection between aging and infectious burdens in patients.

Keywords: long COVID, cytotoxic T cells, NK cells, aging, senescence, apoptosis.

OPEN ACCESS

DOI: 10.25040/ntsh2025.01.15

For correspondence: Danylo Halytsky
Lviv National Medical University, Lviv,
Ukraine

E-mail: iryna.kril.im@gmail.com

Received: 07 Apr, 2025

Accepted: 20 May, 2025

Published: 20 Jun, 2025

ORCID IDs

Valentyna Chopyak:

<https://orcid.org/0000-0003-3127-2028>

Nataliia Melnykova:

<https://orcid.org/0000-0002-2114-3436>

Natalya Shakhovska:

<https://orcid.org/0000-0002-6875-8534>

Iryna Kril:

<https://orcid.org/0000-0002-6728-5827>

Disclosures: The authors declared no
Conflict of Interest.

Author Contributions

Conceptualization: Valentyna Chopyak; Nataliya Shakhovska

Writing: All authors participated equally

Review & Editing: Iryna Kril, Valentyna Chopyak, Nataliya Shakhovska.

Ethical approval: Ethics Commission for Scientific Research, Experimental Developments, and Scientific Works at Danylo Halytsky Lviv National Medical University (protocol No. 10, October 9, 2023).

Funding: The article was published with the grant support of the National Research Foundation. "Methods and means of research of markers of aging and their influence on post-Covid effects for prolongation of the working period." State registration number: 0224U032663



© All authors, 2025

Вступ

Старіння — це патофізіологічний процес поступового погіршення процесів організму, що призводить до руйнування та втрати важливих його функцій, пов'язаних із віком [1]. Загальновідомі три категорії відбору для визначення цих взаємопов'язаних механізмів (ознак): «вони проявляються з віком», «експериментальне прискорення старіння акцентує їхній прояв», «можливість уповільнити, зупинити або повернути старіння шляхом терапевтичного впливу на них» [2]. Існує кілька теорій старіння організму. Згідно з однією з них, у людському організмі поступово і незворотно відбувається зниження функцій тканин і клітин. Клітини мають генетично закріплену програму тривалості життя, реалізація якої знаменується поступовим розвитком незворотних вікових змін, що призводять до старіння. [3]. Згідно з імунною теорією, у людському організмі відбувається поступове ослаблення клітинної та гуморальної ланки імунної відповіді, що в результаті призводить до розвитку імунопатологічних синдромів: імунно-дефіцитних станів, аутоімунних захворювань і т. ін. Наслідком цього є підвищення сприйнятливості до інфекційних хвороб, які часто переходять у хронічну форму [4]. Імуностаріння означає зміни в імунній системі, що зумовлюють підвищену чутливість до захворювань у літніх людей, а це тісно пов'язане з розвитком інфекцій, аутоімунних захворювань і злоякісних пухлин [5]. Старіння організму спричиняють також численні біологічні зміни в імунній системі, пов'язані з віковими захворюваннями та порушеннями процесів апоптозу. Старіння спричиняє зниження експресії генів апоптозу та збільшення експресії генів, пов'язаних зі старінням [6]. Правильно відрегульований механізм запрограмованої клітинної смерті (programmed cell death – PCD) і фагоцитоз апоптичних тілець необхідні для запобігання зміні імунної відповіді [7]. Порушення регуляції PCD і фагоцитозу, що вони пов'язані зі старінням, можуть спричинити запалення та пов'язане з ним старіння, включно з активацією сигнального шляху NFκB [8-10]. Оскільки передавання сигналів NFκB може бути або проапоптотичне, або антиапоптотичне (залежно від клітинного контексту), це може поєднати запалення з подальшими змінами PCD. Хронічне запалення, з іншого боку, пов'язане з продукуванням прозапаль-

них медіаторів, а також з багатьма віковими патофізіологічними процесами та захворюваннями, зокрема і хворобою Альцгеймера, діабетом, атеросклерозом, остеоартритом [11]. Під час пандемії COVID-19 найбільше страждало населення літнього віку. Вплив генетичних факторів і основних та супутніх захворювань призводили до значних патофізіологічних змін в імунній системі, що впливало на перебіг захворювання та клінічні результати.

Ця публікація є продовженням наукового дослідження «Методи та засоби дослідження маркерів старіння та їх впливу на постковідні ефекти для продовження працездатного періоду», фінансованого Національним фондом досліджень України (реєстраційний номер 2021.01/0103) [12].

Мета дослідження: оцінити рівень рецепторно-лігандних взаємодій апоптичних маркерів на цитотоксичних CD8 та NK (CD56) клітинах у хворих із long COVID.

Пацієнти та методи

Дослідження проведене з дотриманням принципів 7-го перегляду Гельсінської декларації прав людини (2013), Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину та відповідних законів України. Дослідження схвалене комісією з питань етики наукових досліджень, експериментальних розробок і наукових творів Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол схвалення № 10 від 9 жовтня 2023 року).

Дослідження виконане на базі кафедри клінічної імунології та алергології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (розпочате у жовтні 2023 року). Для ідентифікації апоптичної взаємодії в системі рецептор/ліганд, ми визначали на NK-клітинах рецептор CD95 (Fas/APO-1R) та його ліганд CD178, а також на цитотоксичних CD8 клітинах рецептор CD279 (PD1R) та його ліганд CD274. Дослідження виконане із застосуванням точної цитометрії (BD FACSCalibur, США) з використанням програмного забезпечення MultiSET для виконання фенотипування лімфоцитів та CellQuest Pro – для дослідження рецептор-лігандних взаємодій.

Introduction

Aging is a pathophysiological process of gradual deterioration of body processes, leading to the destruction and loss of essential body functions associated with age [1]. There are three categories for selecting these interconnected mechanisms (traits): "They appear with age," "Experimental acceleration of aging highlights their manifestation," and "The potential to slow, halt, or reverse aging through therapeutic interventions on them" [2]. There are several theories of aging. According to one of them, the functions of tissues and cells gradually and irreversibly decline in the human body. Cells have a genetically fixed life expectancy program, the implementation of which is marked by the gradual development of irreversible age-related changes that lead to aging. [3]. The immune theory states that the immune response's cellular and humoral link in the human body gradually weakens, ultimately leading to the development of immunopathological syndromes: immunodeficiency states, autoimmune diseases, etc. The consequence is increased susceptibility to infectious diseases, which often become chronic [4]. Immunosenescence refers to the alterations in immune function that increase older adults' vulnerability to diseases, which are closely linked to the onset of infections, autoimmune disorders, and cancers [5]. Indicators of aging lead to various biological changes in the immune system, linked to age-related diseases and apoptosis disorders. Aging is associated with the reduced expression of apoptosis-related genes and the increased expression of genes related to aging [6]. Properly regulated programmed cell death (PCD) and phagocytosis of apoptotic bodies are necessary to prevent an altered immune response. [7]. Dysregulation of PCD and phagocytosis, which are associated with aging, may contribute to inflammation and associated aging, including the activation of the NF- κ B signaling pathway [8-10]. As NF κ B signaling can be either proapoptotic or antiapoptotic (depending on the cellular context), this may link inflammation to subsequent PCD changes. Conversely, chronic inflammation is associated with the production of pro-inflammatory mediators and numerous age-related pathophysiological processes and diseases, including Alzheimer's disease, diabetes, atherosclerosis, and osteoarthritis [11]. During the COVID-19 pandem-

ic, the elderly population suffered the most. Genetic factors and underlying and accompanying diseases led to notable physiological changes in the immune system, impacting disease progression and clinical outcomes.

This publication continues the scientific research "Methods and means of studying aging markers and their impact on long COVID effects to extend working life," funded by the National Research Foundation of Ukraine (register No. 2021.01/0103) [12].

Objective: to assess the level of receptor-ligand interactions of apoptotic markers on cytotoxic CD8 and NK (CD56) cells in patients with long COVID.

Methods

The research adhered to the principles of the 7th revision of the Declaration of Helsinki on Human Rights (2013), the Council of Europe Convention on Human Rights and Biomedicine, and applicable Ukrainian laws. Approval was obtained from the Ethics Commission for Scientific Research, Experimental Developments, and Scientific Works at Danylo Halytsky Lviv National Medical University (protocol No. 10, October 9, 2023).

The research has been conducted at the Department of Clinical Immunology and Allergology at Danylo Halytsky Lviv National University since October 2023. To determine the apoptotic interaction in the receptor/ligand system, we evaluated the CD95 receptor (Fas/APO-1R) and its ligand CD178 on natural killer (NK) cells, as well as the CD279 receptor (PD1R) and its ligand CD274 on cytotoxic CD8+ cells. The research was conducted using flow cytometry (BD FACSCalibur, USA), MultiSET software for lymphocyte phenotyping, and CellQuest Pro to examine receptor-ligand interactions.

Statistical analysis was conducted using the Student's T-test, which assumed a normal distribution. For non-normal distributions, statistical calculations were performed using the non-parametric Mann-Whitney U-test. The study results are $M \pm SD$ (Mean \pm Standard deviation). A significant difference between groups, $P < 0.05$.

Статистичний аналіз проводили за t-критерієм Стьюдента при нормальному розподілі. У разі ненормального розподілу статистичні розрахунки проводили за допомогою непараметричного U-критерію Манна-Вітні. Результати досліджень наведені у $M \pm SD$ (Mean \pm Standard deviation). Вірогідна різниця між групами $p < 0.05$.

Результати

Клінічна складова пацієнтів. Критеріями залучення до дослідження були дорослі особи у віком від 18 років до 65 років (50 осіб обох статей) з даними анамнезу про перенесений COVID-19, з наявністю постковідної симптоматики більше 12-ти тижнів, що не пояснювалася альтернативним діагнозом [13-14]. При клінічному обстеженні пацієнтів із long COVID-19, які склали першу групу дослідження, найчастішими скаргами у пацієнтів були: підвищена втомлюваність – у всіх 50 пацієнтів (100%); порушення сну, постійна втома та підвищене потовиділення – у 42 (84%); порушення мобільності, болі в голові та втрата нюху – у 40 (80%); кашель і порушення пам'яті та уваги – у 35 (70%) пацієнтів. У половини пацієнтів (50%) – простежувалися прояви байдужості або тривожності; депресивні думки та меншою мірою (від 15 до 45%) були скарги на стиснення в грудній клітці, втрату смаку, випадіння волосся та інші. До дослідження були також залучені дві групи контролю: перша група – пацієнти літнього віку (55-70 років) з неперенесеним COVID-19 /або перенесеним у легкій формі, без очевидної постковідної симптоматики, та друга група контролю – особи середнього віку. Всі учасники дослідження (пацієнти та здорові контролі), що вони були залучені до цього дослідження, надали письмову інформовану згоду.

Для верифікації long COVID-19 використовували критерії NICE [15].

Групи дослідження. На першому етапі нашої роботи треба було оцінити популяційний та субпопуляційний склад лімфоцитів пацієнтів усіх досліджуваних груп. На цьому етапі досліджень ми виявили і описали дані результатів обстеження 50 осіб з постковідними наслідками (63,9% жінок і 36,1% чоловіків, середній вік $49,4 \pm 12,7$ років), які склали першу групу дослідження (1-а). Ще дві групи дослідження були контрольними групами порівняння: група 2-а – особи літнього віку (30 осіб, середній вік $62,7 \pm 23,5$ років; 68% жінок і 32% чоловіків) та група 3-а – особи середнього віку (40 осіб, середній вік $45,2 \pm 18,4$ років; 35% жінок і 45% чоловіків). У таблиці 1 наведені результати досліджень популяцій та субпопуляцій лімфоцитів у досліджуваних групах.

Отримані результати свідчать про статистично невірогідне зниження ($p = 0.2631$) кількості Т-клітин (CD3) у дослідній групі постковідних пацієнтів ($54.34 \pm 21.54\%$) порівняно з контролем осіб літнього віку ($60.24 \pm 24.54\%$) та між контрольними групами осіб літнього віку ($60.24 \pm 24.54\%$) та середнього віку ($65.33 \pm 26.8\%$, $p = 0.4180$). Однак простежувалося статистично вірогідне зниження кількості Т-клітин (CD3) у постковідних пацієнтів ($54.34 \pm 21.54\%$) порівняно з контролем осіб середнього віку ($65.33 \pm 26.8\%$, $p = 0.0335$). Було виявлене статистично вірогідне зниження Т-хелперів (CD4) у всіх дослідних групах порівняння: у групі постковідних пацієнтів ($27.16 \pm 12.33\%$) знижено порівняно з контрольною групою осіб літнього віку ($34.16 \pm 13.43\%$, $p = 0.0199$) та контрольною групою осіб середнього віку ($42.03 \pm 19.24\%$, $p = 0.0496$). Також у дослідній групі постковідних пацієнтів ($27.16 \pm 13.33\%$) було статистично вірогідне зниження ($p < 0.0001$) порівняно з контролем осіб середнього віку ($42.03 \pm 19.24\%$).

Таблиця 1

Результати досліджень популяцій та субпопуляцій лімфоцитів у досліджених групах

	Постковідні пацієнти	Контроль (літній вік)	Контроль (середній вік)	Вірогідність $p < 0.05$		
	1-а, n=50	2-а, n=30	3-а, n=40	1-2	1-3	2-3
CD3	54.33 ± 21.54	60.24 ± 24.54	65.33 ± 26.8	0.2631	0,0335	0.4180
CD4	27.16 ± 12.33	34.16 ± 13.43	42.03 ± 19.24	0.0199	<0.0001	0.0496
CD8	28.22 ± 14.55	25.76 ± 13.48	21.78 ± 11.34	0.4542	0,0241	0.1847
CD19	32.46 ± 16.83	24.46 ± 12.44	20.06 ± 10.01	0.0268	0.0001	0.1057
CD16/56	10.23 ± 5.51	12.21 ± 6.11	15.14 ± 7.72	0.1393	0,0007	0.0911

Results

The clinical component of patients. The inclusion criteria comprised 50 adults of both sexes, aged 18 to 65, with a history of COVID-19 and long COVID symptoms lasting more than 12 weeks, not attributable to another diagnosis [13–14]. In the clinical examination of patients with long COVID-19, who comprised the first study group, the most common complaints were increased fatigue in 50 (100%); sleep disturbances, persistent fatigue, and increased sweating in 42 (84%); mobility issues, headaches, and loss of smell in 40 (80%); cough, and memory and attention disorders in 35 (70%) patients. Fifty percent of patients experienced apathy, anxiety, and depressive thoughts, while 15% to 45% reported chest tightness, loss of taste, hair loss, and other issues to a lesser extent. The study included two control groups: the first group consisted of older patients (55–70 years old) with no history of COVID-19 or only mild cases without long COVID symptoms, and the second group consisted of middle-aged participants. All study participants, including patients and healthy control group members, provided informed consent. NICE criteria were employed to verify long COVID-19 (COVID-19 rapid guideline: managing the long-term effects of COVID-19). NICE guideline [15].

Research groups. In the initial phase of our work, we needed to evaluate the population and subpopulation composition of lymphocytes in patients from all studied groups. At this research stage, we identified and described the outcomes of 50 individuals with long COVID effects (63.9% women and 36.1% men, with an average age of 49.4 ± 12.7 years), who comprised the initial study group. The first and second study groups served as control comparison

groups: (1) consisting of 30 individuals with an average age of 62.7 ± 23.5 years, including 68% women and 32% men, and (2) consisting of 40 individuals with an average age of 45.2 ± 18.4 years, including 35% women and 45% men. Table 1 presents the findings from studies on lymphocyte populations and subpopulations within the study groups.

The results show a statistically insignificant reduction ($p = 0.2631$) in T cell (CD3) count in the long COVID patient study group ($54.34 \pm 21.54\%$) compared to the elderly control group ($60.24 \pm 24.54\%$), as well as between the elderly control group ($60.24 \pm 24.54\%$) and the middle-aged control group ($65.33 \pm 26.8\%$, $P = 0.4180$). Nonetheless, long COVID patients had a statistically significant reduction in T-cell counts (CD3) ($54.34 \pm 21.54\%$) compared to the middle-aged control group ($65.33 \pm 26.8\%$, $P = 0.0335$). All experimental comparison groups showed a statistically significant decrease in T-helper cells (CD4): in the group of long COVID patients ($27.16 \pm 12.33\%$), it was reduced compared to the control group of older adults ($34.16 \pm 13.43\%$, $P=0.0199$) and the control group of middle-aged people ($42.03 \pm 19.24\%$, $P=0.0496$). Additionally, in the study group of long COVID patients ($27.16 \pm 12.33\%$), a statistically significant decrease ($P < 0.0001$) was observed compared to the middle-aged control group ($42.03 \pm 19.24\%$).

The number of cytotoxic CD8 cells was non-significantly increased ($p = 0.4542$) in the study group of long COVID patients ($28.22 \pm 14.55\%$) compared to the control group of older adults ($24.46 \pm 12.44\%$). The comparison of data from control groups of older adults ($25.76 \pm 13.48\%$) and middle-aged individuals ($21.78 \pm 11.34\%$) also showed no signif-

Table 1

Results of studies of lymphocyte populations and subpopulations in the study groups

Indicators	Patients with long COVID-19	Control group (old age)	Control group (average age)	Significance $p < 0.05$		
	1st n=50	2nd n=30	3rd n=40	1-2	1-3	2-3
	M±SD					
CD3	54.33±21.54	60.24±24.54	65.33±26.8	0.2631	0.0335	0.4180
CD4	27.16±12.33	34.16±13.43	42.03±19.24	0.0199	<0.0001	0.0496
CD8	28.22±14.55	25.76±13.48	21.78±11.34	0.4542	0.0241	0.1847
CD19	32.46±16.83	24.46±12.44	20.06±10.01	0.0268	0.0001	0.1057
CD16/56	10.23±5.51	12.21±6.11	15.14±7.72	0.1393	0,0007	0.0911

Кількість цитотоксичних CD8 клітин була невірогідно підвищеною ($p=0.4542$) у дослідній групі постковідних пацієнтів ($28.22\pm 14.55\%$) порівняно з контролем осіб літнього віку ($24.46\pm 12.44\%$). При порівнянні даних контрольних груп осіб літнього віку ($25.76\pm 13.48\%$) та середнього віку (21.78 ± 11.34) також не виявлені вірогідні зміни результатів ($p=0.1847$). Щодо порівняння постковідних пацієнтів ($28.22\pm 14.55\%$) і контролю осіб середнього віку ($21.78\pm 11.34\%$) то серед цих досліджуваних груп були виявлені вірогідні зміни ($p=0.0241$).

Кількість (CD19) В-клітин у постковідних пацієнтів дослідної групи ($32.46\pm 16.83\%$) була вірогідно вища ($p=0.0268$) порівняно з групою контролю осіб середнього віку ($20.06\pm 10.01\%$); також при порівнянні даних групи постковідних пацієнтів ($32.46\pm 16.83\%$) та групи контролю осіб середнього віку ($20.06\pm 10.01\%$) виявлені статистично вірогідні зміни ($p=0.0001$). Не були виявлені достовірні зміни ($p=0.1057$) між контрольними групами осіб літнього віку ($24.46\pm 12.44\%$) та осіб середнього віку ($20.06\pm 10.01\%$).

Кількість натуральних кілерів – NK-клітин (CD16/56) у дослідній групі постковідних пацієнтів ($10.23\pm 5.51\%$) була невірогідно зниженою ($p=0.1393$) порівняно з контролем осіб літнього віку ($12.21\pm 6.11\%$), проте була вірогідно зниженою порівняно з групою контролю осіб середнього віку ($15.14\pm 7.72\%$, $p=0,0007$). Не простежувалися також вірогідні зміни між контрольними групами осіб літнього віку ($12.21\pm 6.11\%$) та середнього віку ($15.14\pm 7.72\%$, $p=0.0911$).

Наступним нашим завданням було оцінити популяції клітин, що вірогідно не різнилися між постковідними пацієнтами та контрольною

групою осіб літнього віку, щоб виявити можливе залучення змін у механізми апоптозу.

Для виконання другого етапу дослідження ми вирішили детально розглянути зміни в роботі імунної системи. У групах дослідження визначали експресію рецепторів Fas (CD56+/95+), FasL (CD56+/178+) на NK-клітинах. Дані результатів досліджень наведені в таблиці 2.

Як видно з таблиці 2, в експресії Fas-рецептора CD95+ на CD56-позитивних клітинах очевидна статистично вірогідна різниця між постковідними пацієнтами ($4,12\pm 1,95\%$) та контрольною групою осіб середнього віку ($5.11\pm 2.54\%$, $p=0.0393$). Не виявлена вірогідна різниця експресії маркера CD95+ у постковідних пацієнтів ($4.12\pm 1.95\%$) порівняно з контрольною групою осіб літнього віку ($4,76\pm 2,32\%$, $p=0.1898$) та між контрольною групою осіб літнього віку ($4.76\pm 2.32\%$) та з особами середнього віку ($5.11\pm 2.54\%$, $p=0.5559$).

За результатами визначення експресії Fas-ліганду CD178+ на NK-клітинах, була встановлена статистично вірогідна різниця ($p=0.0455$) між групами постковідних пацієнтів ($4.25\pm 2.14\%$) порівняно з особами літнього віку ($3.32\pm 1.68\%$), та вірогідна різниця порівняно з контрольною групою осіб середнього віку ($2.83\pm 1.44\%$, $p=0.0005$). Проте не простежувалася вірогідна різниця ($p=0.1941$) між контрольними дослідними групами осіб літнього віку ($3.32\pm 1.68\%$) та групою контролю осіб середнього віку ($2.83\pm 1.44\%$). На рисунку 1 зображений відсотковий рівень експресії досліджуваних маркерів.

Наступним нашим завданням було оцінити рівень експресії рецептор-ліганд PD1 – PD1L

Таблиця 2

Експресія на NK клітинах Fas (CD95+), FasL (CD178+) у постковідних пацієнтів та груп контролю

	Постковідні пацієнти	Контроль (літній вік)	Контроль (середній вік)	Вірогідність між групами, $p<0,05$		
	1-а n=50	2-а n=30	3-а n=40	1-2	1-3	2-3
	M±SD					
CD95+	4.12±1.95	4.76±2.32	5.11±2.54	0.1898	0.0393	0.5559
CD178+	4.25±2.14	3.32±1.68	2.83±1.44	0.0455	0.0005	0.1941

ificant differences in the results ($p=0.1847$). When long COVID patients ($28.22\pm 14.55\%$) were compared with the control group of middle-aged ($21.78\pm 11.34\%$) individuals, significant differences ($p=0.0241$) were observed.

The count of (CD19) B cells in long COVID patients in the experimental group ($32.46\pm 16.83\%$) was notably higher ($p=0.0268$) than in the control group of middle-aged people ($20.06\pm 10.01\%$); furthermore, comparing the long COVID group ($32.46\pm 16.83\%$) with the control group of middle-aged ($20.06\pm 10.01\%$) individuals showed statistically significant differences ($p=0.0001$). No significant differences ($p = 0.1057$) were observed between control groups of elderly individuals ($24.46 \pm 12.44\%$) and middle-aged individuals ($20.06 \pm 10.01\%$).

In the study group of long COVID patients, the number of natural killer cells—NK cells (CD16/56) ($10.23\pm 5.51\%$)—was not significantly lower ($p=0.1393$) compared to the control group of older adults ($12.21\pm 6.11\%$) but was considerably lower compared to the control group of middle-aged ($15.14\pm 7.72\%$, $P=0.0007$) individuals. No notable differences were found between control groups of elderly ($12.21\pm 6.11\%$) and middle-aged individuals ($15.14\pm 7.72\%$, $P=0.0911$).

Our subsequent task was to assess cell populations that showed no significant differences between long COVID patients and the elderly control group to identify potential changes in apoptosis mechanisms.

We closely analyzed the immune system's functioning changes for the second research phase. Study groups assessed the expression of Fas (CD56+/95+) and FasL (CD56+/178+) receptors on NK cells. Research results are presented in Table 2.

According to Table 2, a statistically significant difference was observed in the expression of the Fas receptor CD95 on CD56-positive cells between long COVID patients ($4.12 \pm 1.95\%$) and the control group of middle-aged individuals ($5.11 \pm 2.54\%$, $P = 0.0393$). No significant difference was observed in the expression of the CD95+ marker in long COVID patients ($4.12\pm 1.95\%$) compared to the control group of elderly individuals ($4.76\pm 2.32\%$, $P=0.1898$). Additionally, there was no significant difference between the control group of elderly individuals ($4.76\pm 2.32\%$) and middle-aged individuals ($5.11\pm 2.54\%$, $P=0.5559$).

The results of determining the expression of Fas-ligand CD178+ on NK cells showed a statistically significant difference ($P=0.0455$) between the long COVID patient group ($4.25\pm 2.14\%$) and the group of older adults ($3.32\pm 1.68\%$), as well as a considerable difference compared to the control group of middle-aged ($2.83\pm 1.44\%$, $P=0.0005$) individuals. Nonetheless, no significant difference ($P = 0.1941$) was observed between the control study groups of elderly individuals ($3.32 \pm 1.68\%$) and the control group of middle-aged individuals ($2.83 \pm 1.44\%$). Figure 1 shows the percentage expression level of the studied markers.

As shown in Table 3, a statistically significant difference in the expression of the PD1 receptor (CD279+) on CD8-positive cells was observed only in the long COVID patient group ($6.44 \pm 3.28\%$, $p = 0.0011$) compared to the control group of middle-aged individuals ($9.16 \pm 4.35\%$). In the group of long COVID patients ($6.44\pm 3.28\%$), the level of expression of the CD279+ marker was insignificantly reduced ($P=0.1623$) compared to the control group of older adults ($7.64\pm 4.28\%$). A statistically non-significant difference ($p = 0.1498$) was also observed between the control group of elderly

Table 2

Expression on NK cells of Fas (CD95+), FasL (CD178+) in long COVID patients and control groups

Indicators	Patients with long COVID	Control group (old age)	Control group (average age)	Probability between groups, $p<0.05$		
	1st n=50	2nd n=30	3rd n=40	1-2	1-3	2-3
M±SD						
CD95+	4.12±1.95	4.76±2.32	5.11±2.54	0.1898	0.0393	0.5559
CD178+	4.25±2.14	3.32±1.68	2.83±1.44	0.0455	0.0005	0.1941

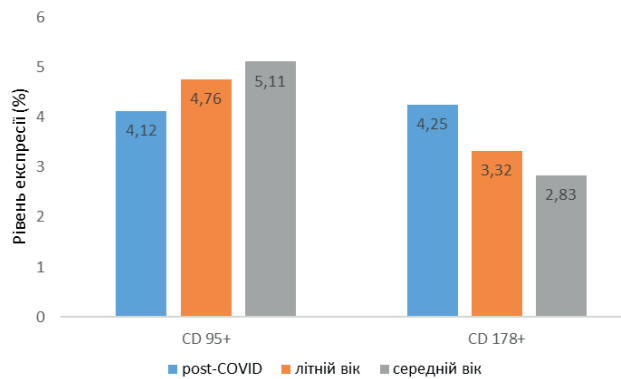


Рисунок 1. Порівняльний аналіз експресії FasR-FasL на НК-клітинах

апоптичних взаємодій на інших цитотоксичних лімфоцитах – CD8 клітинах, що належать до Т-лімфоцитів. Результати досліджень наведені у таблиці 3 та на рисунку 2.

Згідно з даними таблиці 3, очевидна статистично достовірна різниця в експресії PD1-рецептора (CD279+) на CD8 позитивних клітинах лише у групі постковідних пацієнтів (6.44±3.28%, p=0.0011) порівняно з контрольною групою осіб середнього віку (9.16±4.35%). У групі постковідних пацієнтів (6.44±3.28%) рівень експресії CD279+ маркера був невірогідно знижений (p=0.1623) порівняно з контролем осіб літнього віку (7.64±4.28%). Простежувалася також невірогідна статистична різниця (p=0.1498) між контрольними пацієнтами літнього віку (7.64±4.28%) і контрольною групою осіб середнього віку (9.16±4.35%).

За результатами визначення експресії PD1-ліганду CD274+була встановлена статистично достовірна різниця (p=0.0018) у досліджуваній групі постковідних пацієнтів (7.42±3.55%) порівняно з контрольною групою осіб середнього віку (5.28±2.52%). Також була виявле-

на статистично вірогідна різниця (p=0.0477) між контрольними пацієнтами літнього віку (6.67±3.25%) і контрольною групою осіб середнього віку (5.28±2.52%). Утім не простежувалася вірогідна різниця (p=0.3483) між групою постковідних пацієнтів (7.42±3.55%) та контрольною групою осіб літнього віку (6.67±3.25%).

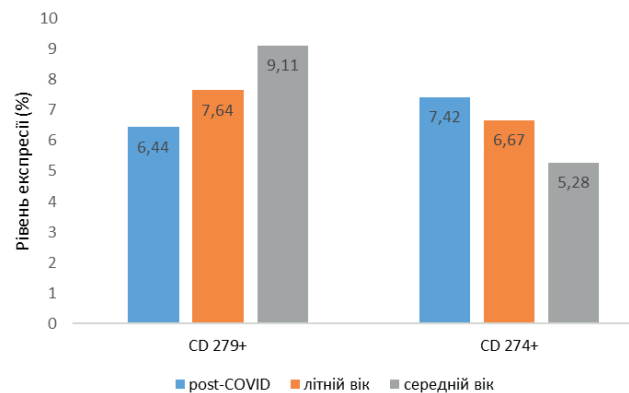


Рисунок 2. Порівняльний аналіз експресії PD1 – PD1L на цитотоксичних CD8 клітинах

Обговорення

Проведене нами дослідження дало змогу виявити зміни фенотипового складу лімфоцитів, серед яких знижена загальна кількість Т-лімфоцитів, підвищена кількість цитотоксичних CD8 клітин та знижена кількість Т-хелперів; підвищена кількість В-лімфоцитів та знижена кількість НК-клітин. За нашими результатами, також у постковідних пацієнтів виявлені зміни у апоптичних рецептор-лігандних взаємодіях на цитотоксичних клітинах CD8 та НК-клітинах, що володіють функцією розпізнавання і знищення інфікованих вірусом клітин. Ми також визначили, що експресія Fas-рецептора CD95+ у постковідних пацієнтів була знижена порівняно з контрольними група-

Таблиця 3

Порівняльний аналіз рецептор-лігандних взаємодій CD279+ CD274+ на CD8+ клітинах постковідних пацієнтів та груп контролю

Показники	Постковідні пацієнти перша група	Контроль (літній вік)	Контроль (середній вік)	Вірогідність між групами, p<0.05		
	1-а n=50	2-а n=30	3-а n=40	1-2	1-3	2-3
M±SD						
CD279+	6.44±3.28	7.64±4.28	9.16±4.35	0.1623	0.0011	0.1498
CD274+	7.42±3.55	6.67±3.25	5.28±2.52	0.3483	0.0018	0.0477

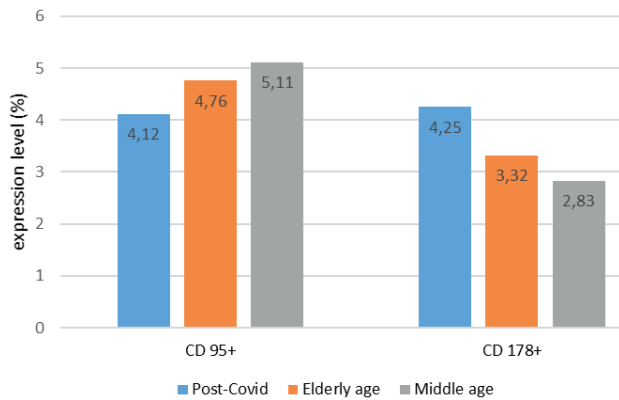


Figure 1. Comparative analysis of FasR-FasL expression on NK cells. Our subsequent task was to evaluate the expression level of the receptor-ligand PD1-PD1L apoptotic interactions on other cytotoxic lymphocytes, specifically CD8 cells, which are a type of T lymphocyte. Research results are shown in Table 3 and Figure 2.

patients ($7.64 \pm 4.28\%$) and the control group of middle-aged individuals ($9.16 \pm 4.35\%$).

According to the results of determining the expression of the PD1 ligand CD274+, a statistically significant difference ($P = 0.0018$) was observed in the study group of long COVID patients ($7.42 \pm 3.55\%$) compared to the con-

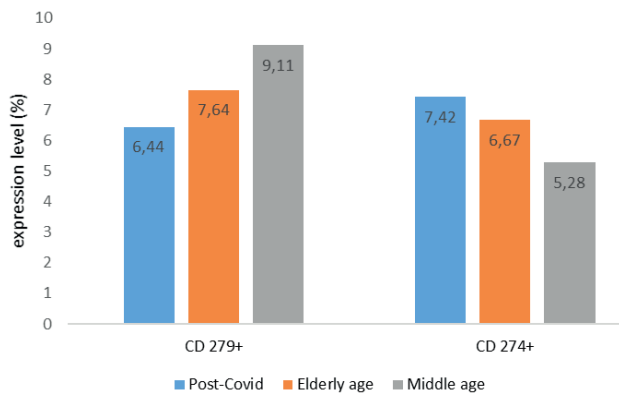


Figure 2. Comparative analysis of PD1 - PD1L expression on cytotoxic CD8 cells

rol group of middle-aged individuals ($5.28 \pm 2.52\%$). A statistically significant difference ($P = 0.0477$) was identified between the elderly patient control group ($6.67 \pm 3.25\%$) and the middle-aged individual control group ($5.28 \pm 2.52\%$). However, no significant difference ($P = 0.3483$) was observed between the long COVID patient group ($7.42 \pm 3.55\%$) and the control group of older adults ($6.67 \pm 3.25\%$).

Discussion

Our research revealed abnormalities in the phenotypic composition of lymphocytes, including a decreased total number of T-lymphocytes, an increased number of cytotoxic CD8 cells, a reduced number of T-helper cells, an increased number of B-lymphocytes, and a decreased number of natural killer (NK) cells. Based on our findings, patients with long COVID-19 experienced alterations in apoptotic receptor-ligand interactions on cytotoxic CD8 cells and NK cells, which are responsible for identifying and eliminating virus-infected cells. We also found that the expression of the Fas receptor CD95+ in long COVID patients was lower compared to control groups, while the level of the Fas ligand CD178 was higher than in control groups. A similar trend was noted in cytotoxic CD8 cells concerning the PD1-PD1L interaction. In long COVID patients, the results showed no significant difference from the elderly control group regarding CD95+ (Fas receptor) expression on NK cells. Similarly, for apoptotic interactions on cytotoxic CD8 cells, there was no notable difference between long COVID patients and the elderly control group in terms of the expression of both the PD1 receptor and the PD-L1 ligand.

Age-related changes affect the host's immune response, weakening the ability to fight infectious diseases. Under specific conditions, a cell can leave the cell cycle without dying, enter a resting state, and stop its usual function, called

Table 3

Comparative analysis of receptor-ligand interactions CD279+, CD274+ in long COVID-19 patients and control groups

Indicators	Patients with long COVID	Control group (old age)	Control group (average age)	Probability between groups, $p < 0.05$		
	1st n=50	2nd n=30	3rd n=40	1-2	1-3	2-3
	M±SD					
CD279+	6.44±3.28	7.64±4.28	9.16±4.35	0.1623	0.0011	0.1498
CD274+	7.42±3.55	6.67±3.25	5.28±2.52	0.3483	0.0018	0.0477

ми і, навпаки, рівень Fas-ліганда CD178 був вищий ніж у контрольних групах. Така сама тенденція простежувалася і на цитотоксичних CD8 клітинах, стосовно взаємодії PD1 – PD1L. Результати у постковідних пацієнтів вірогідно не відрізнялися між контрольною групою літніх людей щодо експресії CD95+ (рецептора Fas) на NK-клітинах; щодо апоптичних взаємодій на цитотоксичних CD8 клітинах у постковідних пацієнтів дані вірогідно не відрізнялися між контрольною групою літніх людей щодо експресії, рецептора PD1 і ліганда PD1L.

Вікові зміни впливають на імунну відповідь господаря, послаблюють здатність боротися з інфекційними захворюваннями. За певних умов клітина може вийти з клітинного циклу не вмираючи, а натомість переходить у стан спокою та припиняє свою нормальну функцію. Це називається клітинним старінням (сенесценція). Існує кілька зв'язків між клітинним старінням (immunosenescence) і хронічним запаленням, пов'язаним з віком (age-related immune-mediated inflammation or inflammaging). Старіння клітини – законний незворотній руйнівний процес, притаманний віковим змінам, що призводить до порушень метаболізму клітини, її пристосувальних можливостей, підвищує вірогідність її смерті. Частка застарілих клітин збільшується з віком [16]. Старі клітини виділяють маркери запалення, які зумовлюють старіння [17]. Встановлено, що посилення очищення від старих клітин сенолітиками, затримує настання вікових розладів [18]. Відомо, що Fas-FasL є частиною комплексної регуляції в ЦНС при локальних запальних реакціях. Дисфункція системи Fas-FasL призводить як до розладів протівірусної імунної відповіді, так і до посилення нейрозапалення [19-20].

Під час сигнальної фази відбувається ініціація апоптозу. Існує рецепторно-залежний сигнальний шлях і мітохондріальний. В першому випадку відбувається взаємодія білків рецепторів клітинної загибелі, що розташовані на поверхні клітинної мембрани (TNF-рецептори, англ. tumor necrosis factor receptor, найбільш відомі з них Fas або APO-1, TNFR1, DR3) зі специфічними зовнішньоклітинними чинниками, або лігандами. Активовані рецептори взаємодіють із внутрішньоклітин-

ними чинниками, або адаптерами, а потім з ефекторними прокаспазми – неактивними попередниками протеолітичних ферментів каспаз. У результаті ланцюжка взаємодії «ліганд–рецептор–адаптер–ефектор» формуються сигнальні комплекси, або апоптосоми, в яких активуються каспази. Каспази запускають процеси руйнування білків всередині клітини [21]. Хоча імунна система відіграє важливу роль у модулюванні рівнів про- та протизапальних факторів, вона не є єдиним джерелом цих факторів. Сучасні дослідження фібробластів і епітеліальних клітин засвідчили, що клітинне старіння супроводжується вражаючим зростанням у секретії 40–80 факторів, які беруть участь у міжклітинній сигналізації [11].

Хронічне запалення може зумовлювати загальний процес старіння. І, своєю чергою, хронічне запалення може виникнути під час старіння. Хронічно активована імунна система, яку називають «запальною», є джерелом вікового запалення. Також прозапальний фенотип застарілих клітин є додатковим джерелом посилення хронічного запалення. [11].

Доведено, що порушення регуляції імунної відповіді пов'язане із серцево-судинними захворюваннями, запальними процесами, хворобою Альцгеймера та онкологією. З віком імунна система стає неефективною та зростає ймовірність взаємодії імунокомпетентних клітин із компонентами власного організму. За іншою теорією, старіння є результатом катастрофічного нагромадження помилок біосинтетичних механізмів клітини, згідно з іншою — воно є наслідком обмеження можливостей росту клітин. Вважають, що старіння клітин є механізмом стабілізації кількості клітин у дорослому організмі [22].

Клітинне старіння, перш за все, є протипухлинним шляхом, що запобігає розмноженню клітин, які стали на шлях злякисного переродження, проте також існують дані про те, що воно задіяне у процесах відновлення тканин. З іншого боку, клітинне старіння може мати і негативні наслідки, зокрема зумовлювати старіння цілого організму, і навіть новоутворів стимулювати розвиток злякисних [23].

cellular aging (senescence). There are multiple connections between immunosenescence and inflammaging. Cell aging is a natural, irreversible, and destructive process of age-related changes that disrupts cell metabolism, affects its adaptive abilities, and raises the likelihood of cell death. The percentage of aging cells increases with age [16]. Aged cells release inflammatory markers that aid aging [17]. Research has shown that improving the removal of old cells using senolytics can postpone the onset of age-related disorders [18]. Fas-FasL is recognized as a component of the intricate regulation within the CNS during localized inflammatory responses. Dysfunction in the Fas-FasL system results in a compromised antiviral immune response and heightened neuroinflammation [19–20].

During the signaling phase, apoptosis is initiated. There are two receptor-dependent signaling pathways and a mitochondrial pathway. In the initial scenario, cell death receptor proteins on the cell membrane surface (TNF receptors, also known as tumor necrosis factor receptors, with Fas or APO-1, TNFR1, and DR3 being the most well-known) interact with specific extracellular factors or ligands. Activated receptors engage with intracellular factors, or adaptors, and subsequently with effector procaspases—the inactive precursors of proteolytic enzymes known as caspases. Signaling complexes, also known as apoptosomes, are formed due to the “ligand-receptor-adapter-effector” interaction chain, which leads to the activation of caspases. Caspases trigger protein degradation processes inside the cell [21]. While the immune system plays a crucial role in regulating the levels of pro- and anti-inflammatory factors, it is not the sole source of these factors. Recent research on fibroblasts and epithelial cells has revealed that cellular aging is marked by a significant rise in the secretion of 40–80 factors involved in intercellular signaling [11].

Chronic inflammation can contribute to the overall aging process and occur during aging. A persistently activated immune system, called “inflammatory,” originates from age-related inflammation. Additionally, the pro-inflammatory phenotype of aging cells contributes to heightened chronic inflammation [11].

It has been shown that immune response dysregulation is linked to cardiovascular diseases,

inflammatory processes, Alzheimer’s disease, and cancer. As we age, the immune system becomes less effective, and the chances of immunocompetent cells interacting with the body’s own components increase. Another theory suggests that aging results from a catastrophic buildup of errors in the cell’s biosynthetic mechanisms, while another posits that it is due to the cell’s limited growth potential. Cellular aging is thought to be a mechanism for maintaining cell numbers in the adult body [22].

Cellular senescence primarily functions as an antitumor mechanism, halting cell proliferation along the path to malignant transformation. However, there is also evidence suggesting its role in tissue repair processes. Conversely, cellular senescence can also have negative consequences, including contributing to the entire body’s aging and even stimulating the development of malignant neoplasms [23].

Recent studies suggest that a decline in immunity may result from secondary changes caused by environmental and lifestyle factors, where diet, physical activity, and medication can influence immune function as we age. Immunological aging and chronic inflammation are key characteristics of the aging immune system, where the accumulation of senescent immune cells contributes to its deterioration while promoting inflammatory phenotypes that lead to immune dysfunction [24]. Like every system in the body, the immune system undergoes progressive changes with age. Some of these changes result in reduced functionality, as evidenced by an increased vulnerability to respiratory infections, such as influenza and new coronaviruses. Conversely, inflammaging is age-related immune-mediated inflammation [10, 26–27]. Alongside age-related comorbidities, these changes highlight the susceptibility of the elderly to latent and new infections, resulting in higher rates of illness and death from COVID-19 [24; 25].

In other words, apoptosis and cellular senescence are two cellular processes that might exemplify antagonistic pleiotropy. Both methods are crucial for the survival and health of young organisms; however, they can also contribute to the development of aging characteristics, including some age-related diseases [28–29].

Нові дослідження свідчать про те, що ослаблення імунітету може бути результатом вторинних змін, спричинених факторами навколишнього середовища та способу життя, коли харчування, фізичні вправи та приймання ліків впливають на імунну функцію з віком. Імунологічне старіння та хронічне запалення при старінні вважають ключовими ознаками виснаженої імунної системи, де накопичення змінених імунних реакцій сприяє її зниженню, і одночасно посиленню запальних фенотипів, які зумовлюють імунну дисфункцію [24]. Як і для кожної системи в організмі, коли відбувається природне старіння, супроводжуване погресивними біологічними змінами імунної системи, деякі з цих змін призводять до зниження функцій імунітету, про що свідчить підвищена сприйнятливості до респіраторних інфекцій, зокрема грипу і нових коронавірусів. З іншого боку, розвивається імуноопосередковане запалення, пов'язане з віком [10, 26-27]. Разом із супутніми захворюваннями, що посилюються з віком, ці зміни свідчать про вразливість людей літнього віку до латентних та нових інфекцій і призводять до зростання захворюваності та смертності від COVID-19 [24; 25].

Тобто, два клітинних процеси, апоптоз і клітинне старіння, можуть бути прикладами антагоністичної плейотропії. Обидва процеси необхідні для життєздатності та життєдіяльності молодих організмів, але можуть сприяти фенотипам старіння, включно з певними віковими хворобами [28–29].

Отже, імуносупресивні та запальні фактори зумовлюють невідворотне зниження імунітету, руйнуючи здатність системи боротися з латентними та новими інфекціями та

створювати адекватні відповіді на вакцини. Водночас ці фактори сприяють розвитку прозапальних фенотипів і у такий спосіб впливають не тільки на сприйнятливості людини до коронавірусної інфекції. Краще розуміння цих факторів необхідне для адаптації терапії і стратегії щодо вакцин на шляху до персоналізованої медицини, особливо щодо таких смертельних захворювань, як COVID-19, що спричиняють пандемію.

У висновках:

1. У групі постковідних пацієнтів була достовірно знижена кількість CD3, CD4 лімфоцитів та NK-клітини, а кількість CD8 та CD19 клітин була вірогідно підвищена порівняно з контрольною групою осіб середнього віку.
2. Експресія Fas-ліганду CD178+ на NK клітинах постковідних пацієнтів статистично достовірно підвищена порівняно з обидвома контрольними групами. Достовірно зниження експресії Fas-рецептора CD95+ на CD56-позитивних клітинах постковідних пацієнтів старшого віку порівняно з контрольною групою осіб середнього віку свідчить про диспропорцію у системі Fas-FasL, внаслідок чого апоптоз клітин, експресуючих Fas, не відбувається повноцінно.
3. Експресія рецептора запрограмованої смерті PD1 CD279+, який пригнічує активацію та проліферацію T-клітин, та його ліганду PD1L CD274+ на цитотоксичних CD8 клітинах постковідних пацієнтів статистично вірогідно знижена порівняно з контрольною групою осіб літнього віку та контрольною групою осіб середнього віку, що свідчить про збереження цими клітинами активованого стану.

Список літератури

1. Stearns SC, Ackermann M, Doebeli M. The experimental evolution of aging in fruitflies. *Exp Gerontol.* 1998;33(7-8):785–92. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(98\)00021-7](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(98)00021-7)
2. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell.* 2023;186(2):243–78. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>
3. Vitorino R, Silva GM, Vogel C, Duarte AC, Rocha-Santos T. A synopsis on aging—Theories, mechanisms and future prospects. *Ageing Res Rev.* 2016;29:90–101. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.06.005>
4. Effros RB. Roy Walford and the immunologic theory of aging. *Immun Ageing.* 2005;2:7. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-2-7>
5. Lian J, Yue Y, Yu W, Zhang Y. Immunosenescence: a key player in cancer development. *J Hematol Oncol.* 2020;13(1):1–8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7653700/>
6. Alt EU, Senst C, Murthy SN, Slakey DP, Dupin CL, Chaffin AE, et al. Aging alters tissue-resident mesenchymal stem cell properties. *Stem Cell Res.* 2012;8(2):215–25.

Therefore, immunosuppressive and inflammatory factors gradually decrease immunity and the system's capacity to combat latent and new infections and produce appropriate vaccine responses. They also encourage the development of pro-inflammatory phenotypes, affecting an individual's susceptibility to coronavirus infection. A deeper understanding of these factors is essential for tailoring therapies and vaccine strategies toward personalized medicine, particularly for lethal diseases like COVID-19, which is causing a global pandemic.

In Conclusions:

1. In post-COVID patients, the number of CD3, CD4 lymphocytes, and NK cells was significantly reduced, and the number of CD8 and CD19 cells was significantly increased compared to the control group of middle-aged participants.
2. The expression of Fas-ligand CD178+ on NK cells of post-COVID patients was statistically significantly increased compared to both control groups. A significant decrease in the expression of Fas-receptor CD95+ on CD56-positive cells of older post-COVID patients compared to the control group of middle-aged participants indicates a disproportion in the Fas-FasL system, as a result of which apoptosis of cells expressing Fas does not occur fully.
3. The expression of the programmed death receptor PD1 CD279+, which inhibits T-cell activation and proliferation, and its ligand PD1L CD274+ on cytotoxic CD8 cells of post-COVID patients is statistically significantly reduced compared to the control group of older adults and the control group of middle-aged people, which indicates that these cells maintain an activated state.

References

1. Stearns SC, Ackermann M, Doebeli M. The experimental evolution of aging in fruitflies. *Exp Gerontol.* 1998;33(7-8):785–92. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(98\)00021-7](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(98)00021-7)
2. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell.* 2023;186(2):243–78. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>
3. Vitorino R, Silva GM, Vogel C, Duarte AC, Rocha-Santos T. A synopsis on aging—Theories, mechanisms and future prospects. *Ageing Res Rev.* 2016;29:90–101. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.06.005>
4. Effros RB. Roy Walford and the immunologic theory of aging. *Immun Ageing.* 2005;2:7. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-2-7>
5. Lian J, Yue Y, Yu W, Zhang Y. Immunosenescence: a key player in cancer development. *J Hematol Oncol.* 2020;13(1):1–8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7653700/>
6. Alt EU, Senst C, Murthy SN, Slakey DP, Dupin CL, Chaffin AE, et al. Aging alters tissue-resident mesenchymal stem cell properties. *Stem Cell Res.* 2012;8(2):215–25.
7. Devitt A, Marshall LJ. The innate immune system and the clearance of apoptotic cells. *J Leukoc Biol.* 2011;90(3):447–57.
8. Gupta S, Agrawal A, Agrawal S, Su H, Gollapudi S. A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis. *Immun Ageing.* 2006;3:5.
9. Salvioli S, Monti D, Lanzarini C, Conte M, Pirazzini C, Bacalini MG, et al. Immune system, cell senescence, aging and longevity--inflamm-aging reappraised. *Curr Pharm Des.* 2013;19(9):1675–79.
10. Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(4):507–13.
11. Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med.* 2010;16(5):238–46. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.03.003>
12. Kril I, Chopyak V, Melnykova N, Bazylevych A, Shakhovska N. Post-COVID effects and immunological markers of aging. *Proc Shevchenko Sci Soc Med Sci.* 2024;2(76). <https://doi.org/10.25040/ntsh2024.02.11>
13. World Health Organization. A clinical case definition of post-COVID-19 condition by a Delphi consensus. Geneva: WHO; 2021. Available from: https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Post_COVID-19_condition-Clinical_case_definition-2021.
14. Cutler DM. The costs of long COVID. *JAMA Health Forum.* 2022;3(5):e221809. <https://doi.org/10.1001/jamahealthforum.2022.1809>
15. National Institute for Health and Care Excellence (NICE). COVID-19 rapid guideline: managing the long-term effects of COVID-19. NICE guideline [NG188]. 2020. Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng188>

7. Devitt A, Marshall LJ. The innate immune system and the clearance of apoptotic cells. *J Leukoc Biol.* 2011;90(3):447–57.
8. Gupta S, Agrawal A, Agrawal S, Su H, Gollapudi S. A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis. *Immun Ageing.* 2006;3:5.
9. Salvioli S, Monti D, Lanzarini C, Conte M, Pirazzini C, Bacalini MG, et al. Immune system, cell senescence, aging and longevity--inflamm-aging reappraised. *Curr Pharm Des.* 2013;19(9):1675–79.
10. Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(4):507–13.
11. Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med.* 2010;16(5):238–46. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.03.003>
12. Kril I, Chopyak V, Melnykova N, Bazylevych A, Shakhovska N. Post-COVID effects and immunological markers of aging. *Proc Shevchenko Sci Soc Med Sci.* 2024;2(76). <https://doi.org/10.25040/ntsh2024.02.11>
13. World Health Organization. A clinical case definition of post-COVID-19 condition by a Delphi consensus. Geneva: WHO; 2021. Available from: https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Post_COVID-19_condition-Clinical_case_definition-2021.
14. Cutler DM. The costs of long COVID. *JAMA Health Forum.* 2022;3(5):e221809. <https://doi.org/10.1001/jamahealthforum.2022.1809>
15. National Institute for Health and Care Excellence (NICE). COVID-19 rapid guideline: managing the long-term effects of COVID-19. NICE guideline [NG188]. 2020. Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng188>
16. Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell.* 2009;8(3):311–23. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00481.x>
17. Malaquin N, Martinez A, Rodier F. Keeping the senescence secretome under control: molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype. *Exp Gerontol.* 2016;82:39–49. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.05.010>
18. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature.* 2011;479(7372):232–6. <https://doi.org/10.1038/nature10600>
19. Krzyzowska M, Kowalczyk A, Skulska K. Fas/FasL contributes to HSV1 brain infection and neuroinflammation. *Front Immunol.* 2021;12:714821. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.714821>
20. Zubchenko S, Kril I, Nadizhko O, et al. Herpesvirus infections and post-COVID-19 manifestations: a pilot observational study. *Rheumatol Int.* 2022;42:1523–30. <https://doi.org/10.1007/s00296-022-05146-9>
21. Diaz Arguello OA, Haisma HJ. Apoptosis-inducing TNF superfamily ligands for cancer therapy. *Cancers (Basel).* 2021;13(7):1543. <https://doi.org/10.3390/cancers13071543>
22. Dollemore D. Aging under the microscope: a biological quest. Bethesda, MD: National Institutes of Health, National Institute on Aging; 2002.
23. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature.* 2006;444(7119):633–7. <https://doi.org/10.1038/nature05268>
24. Bajaj V, Gadi N, Spihlman AP, Wu SC, Choi CH, Moulton VR. Aging, immunity, and COVID-19: how age influences the host immune response to coronavirus infections? *Front Physiol.* 2020;11:571416. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.571416>
25. Oryshchyn N, Ivaniv Y. Cardiovascular complications in COVID-19: case report and concise review. *Proc Shevchenko Sci Soc Med Sci.* 2020 Sep.27;62(2). <https://doi.org/10.25040/ntsh2020.02.08>
26. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;908:244–54. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x>
27. Fulop T, Larbi A, Dupuis G, Le Page A, Frost EH, Cohen AA, et al. Immunosenescence and inflamm-aging as two sides of the same coin: friends or foes? *Front Immunol.* 2017;8:1960. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01960>
28. Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021;22(2):75–95. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00314-w>
29. Campisi J. Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. *Exp Gerontol.* 2003;38(1–2):5–11. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(02\)00152-3](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(02)00152-3)

16. Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell*. 2009;8(3):311–23. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00481.x>
17. Malaquin N, Martinez A, Rodier F. Keeping the senescence secretome under control: molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype. *Exp Gerontol*. 2016;82:39–49. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.05.010>
18. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. 2011;479(7372):232–6. <https://doi.org/10.1038/nature10600>
19. Krzyzowska M, Kowalczyk A, Skulska K. Fas/FasL contributes to HSV1 brain infection and neuroinflammation. *Front Immunol*. 2021;12:714821. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.714821>
20. Zubchenko S, Kril I, Nadizhko O, et al. Herpesvirus infections and post-COVID-19 manifestations: a pilot observational study. *Rheumatol Int*. 2022;42:1523–30. <https://doi.org/10.1007/s00296-022-05146-9>
21. Diaz Arguello OA, Haisma HJ. Apoptosis-inducing TNF superfamily ligands for cancer therapy. *Cancers (Basel)*. 2021;13(7):1543. <https://doi.org/10.3390/cancers13071543>
22. Dollema D. *Aging under the microscope: a biological quest*. Bethesda, MD: National Institutes of Health, National Institute on Aging; 2002.
23. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*. 2006;444(7119):633–7. <https://doi.org/10.1038/nature05268>
24. Bajaj V, Gadi N, Spihlman AP, Wu SC, Choi CH, Moulton VR. Aging, immunity, and COVID-19: how age influences the host immune response to coronavirus infections? *Front Physiol*. 2020;11:571416. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.571416>
25. Oryshchyn N, Ivaniv Y. Cardiovascular complications in COVID-19: case report and concise review. *Proc Shevchenko Sci Soc Med Sci*. 2020 Sep.27;62(2). <https://doi.org/10.25040/ntsh2020.02.08>
26. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;908:244–54. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x>
27. Fulop T, Larbi A, Dupuis G, Le Page A, Frost EH, Cohen AA, et al. Immunosenescence and inflamm-aging as two sides of the same coin: friends or foes? *Front Immunol*. 2017;8:1960. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01960>
28. Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021;22(2):75–95. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00314-w>
29. Campisi J. Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. *Exp Gerontol*. 2003;38(1–2):5–11. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(02\)00152-3](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(02)00152-3)