

Анализа на Т клеточните одговори кај пациенти со ковид-19 во Северна Македонија

Невенка Ридова¹, Симона Стојановска-Јакимовска¹, Сања Трајкова¹, Марија Попова-Лабачевска¹, Душко Дуковски¹, Мартин Ивановски¹, Милена Стевановиќ², Татјана Стојаноска², Илир Демири², Александар Димовски^{3,4}, Димитар Ефремов⁵, Ирина Пановска – Ставридис^{*1}

1. Универзитетска клиника за хематологија – Скопје, Медицински факултет, Универзитет “Св. Кирил и Методиј” Скопје, Северна Македонија
2. Универзитетска клиника за инфективни болести и фебрилни состојби – Скопје, Медицински факултет, Универзитет “Св. Кирил и Методиј” Скопје, Северна Македонија
3. Центар за биомолекуларни фармацевтски анализи, Фармацевтски факултет, Универзитет “Св. Кирил и Методиј” Скопје, Северна Македонија
4. Истражувачки центар за генетско инженерство и биотехнологија „Георги Д. Ефремов“, Македонска академија на науките и уметностите
5. Меѓународен центар за генетски инженеринг и биотехнологија во Трст

Апстракт

Вовед: Лимфопенијата е еден од најконзистентните хематолошки абнормалности при инфекција со новиот корона вирус (SARS-CoV-2). Особено се засегнати Т-клетките, пред сè цитотоксичните Т-лимфоцити. Освен промените во бројот, овие клетки експримираат и инхибиторни рецептори, како PD-1, што сугерира функционална исцрпеност.

Цел на студијата: Ги анализиравме лимфоцитните супсети кај пациенти со различна форма на ковид-19 и експресијата на PD1 на Т-клетките, во корелација со тежината и исходот од болеста.

Материјали и метод: Во периодот помеѓу 06/2020 и 06/2022, анализиравме 410 пациенти, од кои 326 хоспитализирани на Клиниката за инфективни болести; 220 со тешка и 106 со критична болест. Останатите 84 пациенти беа следени амбулантски со лесна/умерена форма на болест. Апсолутните вредности на CD45+, CD19+, CD3+, CD4+, CD8+, CD16+56+ лимфоцитите во периферна крв 10-20 дена од инфекција и експресијата на PD-1 на CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитите беа анализирани со мултипараметриска точна цитометрија на Универзитетската клиника за хематологија. Вредностите беа споредени кај различните форми на

болест, како и помеѓу преживеаните и починатите пациенти во двете групи.

Резултати: Значајно пониски вредности на CD45+, CD3+, CD4+, CD8 и CD16+56+ лимфоцити беа забележани кај пациентите со тешка и критична форма на болест, споредено со лесно болните. Исто така, значајна разлика во сите супсети, освен кај цитотоксичните Т-лимфоцити беше покажана помеѓу починатите и преживеаните со тешка болест, но не и кај критично болните. Не докажавме значајна разлика во експресијата на PD-1 на CD4+ и CD8+ Т-клетки помеѓу различните групи на болни, нити помеѓу преживеаните и починатите во двете групи.

Заклучок: Нашите резултати ја потврдуваат асоцијацијата на Т- лимфоцитите со клиничкиот тек и исходот од болеста кај пациентите со тешка форма на COVID-19. Истото не беше забележано кај критично болните, што води до заклучок дека други фактори го детерминираат исходот кај овие пациенти. Експресијата на PD1 на Т-лимфоцитите е многу чест наод кај пациентите со ковид-19, независно од формата на болест.

ВОВЕД:

Три години по пандемијата со новиот корона вирус (SARS-CoV-2), сè уште ризик факторите за развој на тешка форма на болест не се јасно дефинирани. Во литературата се наведуваат машкиот пол, возраста над 65 години и коморбидитетите како фактори поврзани со пациентот, кои значајно влијаат врз текот на болеста ⁽¹⁾. Лимфопенијата е еден од првите забележани лабораториски наоди асоцирани со SARS-CoV-2 инфекцијата, најконзистентен хематолошки параметар кој корелира со тежината на болеста и ризикот од прогресија ⁽²⁾. Уште во првите месеци на пандемијата се постави хипотезата дека аналогно на останатите вирусни инфекции, Т-клеточно посредуваните имуни реакции имаат есенцијална улога во одбраната од вирусот ⁽³⁾. Оптималниот Т-клеточен имунитет треба да обезбеди брз вирален клиренс и инактивација со цел, рана контрола на инфекцијата. Но, податоците од литературата се контроверзни. Ако од една страна дисфункционалниот и супоптимален Т-клеточен одговор води до неадекватна антивирусна заштита, од друга страна претераната Т-клеточна активација води до пренагласен имунолошки одговор, цитокинска бура и клеточни и ткивни оштетувања ⁽⁴⁾.

Неколку студии покажаа значаен пад во вкупниот број на Т-лимфоцити, а особено на цитотоксичните CD3+CD8+ Т-лимфоцити кај лицата инфицирани со SARS-CoV-2 ^(4,5). Понизок број на CD3+CD8+ Т-лимфоцити е забележан кај пациентите со тешка и критична форма на болест и е асоци-

ран со негативен исход од лекувањето⁽⁶⁾. Освен промените во бројот, цитотоксичните Т-лимфоцити се здобиваат со квалитативни промени што се докажува преку експресијата на високи нивоа на инхибиторни рецептори, како што е Programmed cell death 1 (PD1) и TIM-3, имунофенотип којшто е асоциран со „функционална исцрпеност или истоштеност“ (functional exhaustion) на антивирусните клетки. PD1 или CD279 е маркер од CD28 фамилијата на рецептори, чија улога е периферна толеранција и down-регулација (гасење) на пролиферативниот клеточен капацитет, но исто така се зголемува неговата експресија при антиген-посредувана Т-клеточна активација. Значајно зголемена експресија на PD1 е документирана кај голем број акутни вирусни инфекции, но и кај хронични вирусни инфекции, како што се: лимфоцитен хориоменингитис вирусот, вирусот на хумана имунодефициенција, Хепатит Б и Хепатит Ц вирусите. Исто така, зголемена експресија се забележува и кај пациентите со малигни болести⁽⁷⁾. Функционалната исцрпеност не е ексклузивна карактеристика само за цитотоксичните Т-лимфоцити, бидејќи одредени автори ја поврзуваат зголемената експресија на PD1 на помошничките CD3+ CD4+ Т-клетки со намалена до изгубена ефикасност при одбраната со хроничните вирусни инфекции⁽⁸⁾.

ЦЕЛ НА СТУДИЈАТА:

Во нашата ретроспективна студија, ги анализиравме лимфоцитните супсетови и експресијата на PD1 на CD8+ и CD4+ Т-лимфоцити во периферната крв, кај лица заболени од ковид-19 од Република Северна Македонија, во корелација со тежината и исходот од болеста.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ:

Во студијата беа вклучени вкупно 410 пациенти со корона вирусна инфекција, во периодот помеѓу јуни 2020 и јуни 2022. Кај сите пациенти, болеста беше потврдена со позитивен полимераза верижна реакција (polymerase chain reaction - PCR) тест. Вкупно 84 пациенти се следени амбулантски, со лесна/умерена форма на болеста, а останатите 326 пациенти се лекувани хоспитално на ЈЗУ Универзитетска клиника за инфективни болести и фебрилни состојби – Скопје. Од нив, 220 пациенти имале тешка, а 106 пациенти критична болест. Болеста е дефинирана во време на прием, според критериумите на Американскиот национален институт за здравје (National Institutes of Health – NIH). Во групата на пациенти со тешка болест се сместени пациентите со сатурација на амбиентален воздух < 94% или >30 респирации во минута или белодробна инфилтрација во >50% од паренхим. Како критична болест се дефинира болеста со знаци на респираторен дистрес и инсуфициенција, сепса и септичен шок или знаци за мултиорганско засегање⁽⁹⁾. Овие пациенти беа поделени во две групи: 1) преживевани и отпуштени од болница и 2) починати за време на хоспитализација.

За анализа на лимфоцитни супсетови беа користени примероци од периферна крв (5мл крв со EDTA антикоагуланс), земено во период од 10 до 20 дена од почетокот на болеста. Кај сите пациенти со мултипараметриска проточна цитометрија беа одредени апсолутниот и релативниот број на:

CD45+ (вкупни лимфоцити), CD19+ (Б-лимфоцити), CD3+ (Т-лимфоцити), CD3+CD4+ (помошнички Т-лимфоцити), CD3+CD8+ (цитотоксични Т-лимфоцити) и CD16+56+ (Клетки природни убијци – Natural Killer (NK) lymphocytes). Се користеше FACSCanto II проточен цитометар и FACSDiva Software. Дополнително, CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитите беа анализирани за експресија на PD1. Анализата се изведуваше на ЈЗУ Универзитетска клиника за хематологија – Скопје. Клеточниот имунофенотип беше одреден со користење на моноклонални антитела насочени кон мембрански клеточни маркери на диференцијација. Користениот панел е прикажан во табела 1. Ги споредивме апсолутните вредности на лимфоцитите и лимфоцитните супсетови на пациентите со лесна/умерена болест наспроти оние на пациентите со тешка и критична болест. Исто така, во втората група на пациенти, овие вредности беа споредувани помеѓу преживеваните и починати пациенти со Mann-Whitney U-test. ChiSquare тестот беше користен за споредба на експресијата на PD1 експресијата на CD8+ и CD4+ Т-лимфоцитите помеѓу пациентите со лесна/умерена форма и тешка и критична форма на болест. За статистички значајна вредност е земена P – вредност <0.05. За статистичката анализа, беше користен MedCalc software.

Тест епрувета (ТЕ)	Моноклонални антитела
ТЕ 1	Негативна контрола
ТЕ 2	CD45 ^{PerCP} , CD19 ^{APC} , CD3 ^{FITC} , CD16+56+ ^{PE}
ТЕ 3	CD3 ^{APC} , CD4 ^{FITC} , CD8 ^{PE}
ТЕ 4	CD3 ^{APC} , CD8 ^{FITC} , CD279 ^{PE}
ТЕ 5	CD3 ^{APC} , CD4 ^{FITC} , CD279 ^{PE}

Табела бр 1 – Панел за одредување на лимфоцитни супсетови кај пациенти со ковид-19 со проточна цитометрија

РЕЗУЛТАТИ

Во однос на демографските карактеристики, во сите групи со различна тежина на болест, машките пациенти беа доминантни: 59,5% со лесна/умерена форма, 69% со тешка форма и 64,1% со критична форма. Беа вклучени пациенти на возраст од 16 до 87 години; со средна возраст од 37, 56 и 61 во различните клинички форми, соодветно. Очекувано, најголем дел пациенти со коморбидитети имаше во групата на критично болни, односно 89,6% од нив имале барем 1 коморбидитет, а 78,3% имале 2 или повеќе болести. За споредба, кај тешко болните пациенти, овие вредности изнесуваа 70,5%, односно 44%. Во групата на амбулантски мониторирани пациенти, 15% имале ≥1 коморбидитет. Најчести коморбидни состојби се од кардиоваскуларно потекло (артериска хипертензија, срцева слабост, коронарна артериска болест), по што следуваат дијабетес и хронична опструктивна белодробна болест. Во однос на исходот од болеста, 16,4% од тешко болните и 66% од критично болните пациенти резултирале со смртен исход.

Речиси сите анализирани пациенти имаа лимфопенија. Сепак, пациентите со лесна до умерена форма на болеста имаа сигнификантно повисоки вкупни лимфоцити (средна вредност 1268,2, ранг: 212-3027 клетки/μl) во споредба со

пациентите со тешка болест (средна вредности 754,8; ранг: 97-4032 клетки/ μL) и во споредба со пациентите со критична болест (средна вредност 607; ранг: 93-1880 клетки/ μL). Починатите пациенти со тешка болест имаа значајно пониски лимфоцити од преживеаните (590,1 vs. 797,6 клетки/ μL), но оваа разлика не беше забележана во групата на критично болни. Исто како и вкупните лимфоцити, починатите пациенти со тешка болест имаа значајно пониски вредности на CD19 лимфоцити, во однос на оздравените пациенти.

Вкупните Т-лимфоцити беа значајно пониски кај пациентите со тешка и критична болест, споредено со оние со лесна/умерена форма на болеста. Истите разлики беа забележани и кај Т-клеточните суппопулации. Пациентите со лесна до умерена форма на болест имаа значајно повисоки вредности на помошнички CD4+ Т-лимфоцити (средна вредност 476,3, ранг: 82-1217 клетки/ μL) и од пациентите со тешка (средна вредност 281,6, ранг: 37-1053 клетки/ μL) и од пациентите со критична болест (средна вредност 227,7, ранг: 18-723 клетки/ μL). Во однос на цитотоксичните CD8+ Т-лимфоцити, најниски вредности имаа пациентите со критична болест (средна вредност 139,1, ранг: 21-546 клетки/ μL), а незначајно повисоки нивоа имаа пациентите со тешка болест (средна вредност 183,4 ранг: 7-1011 клетки/ μL). Овие вредности, кај двете форми на болеста, се значајно пониски од бројот на цитотоксични Т-лимфоцити кај нехоспитализираните пациенти (средна вредност 320,6, ранг: 41-909 клетки/ μL). На фигура број 1 е прикажан пример од проточно цитометриската анализа кај болен со лесна и тешка форма на болест. Статистички значајна разлика беше нотирана во бројот на CD3+, како и CD3+CD4+ лимфоцитите помеѓу преживеаните и починатите хоспитализирани пациенти со тешка болест.

Слични резултати беа добиени и за NK-лимфоцитите. Пациентите со тешка (средна вредност: 121,4, ранг: 1-1472 клетки/ μL) и критична болест (средна вредност: 71,1; range: 5-381 клетки/ μL) имаа значајно пониски вредности споредено со пациентите со лесна/умерена форма на болест (средна вредност: 215,7; ранг: 47-1003 клетки/ μL). Резултатите се подетално прикажани во табела бр. 2.

Експресија на PD1 од CD8+ Т-лимфоцитите во >20% беше нотирана кај сите пациенти, односно кај 97,6% од пациентите со лесна болест и 96,7% од хоспитализираните пациенти. Како што очекувавме, CD4+ Т-лимфоцитите покажуваа експресија на PD1 во помала мера, односно кај 65,4% од пациентите со лесна болест и 56,4% кај пациентите со тешка и критична болест. Оваа разлика не е статистички значајна. Овие вредности се прикажани во табела бр. 3.

Варијабли		Лесна/умерена болест	Тешка болест	Критична болест	p ¹	p ²	p ³	p ⁴	p ⁵
CD45+ $10^6/\text{L}$	Сите	1268 (212-3027)	754,8 (97-4032)	607 (93-1880)	P<0,05				
	Ж П		797,6 590,1	676,6 580,3					
CD19+ $10^6/\text{L}$	Сите	134,2 (33-453)	138,2 (3-621)	139,4 (61-1373)	P=н.с				
	Ж П		148 78,8	144 125,9					
CD3+ $10^6/\text{L}$	Сите	858,3 (156-2242)	494,3 (37-2271)	375,4 (61-1373)	P<0,05			P<0,05	
	Ж П		1430,4 370,5	426,2 350,4					
CD3+ CD4+ $10^6/\text{L}$	Сите	476,3 (82-1217)	281,6 (37-1053)	227,7 (18-723)	P<0,05				P=н.с
	Ж П		295 212,2	256,2 214,4					
CD3+ CD8+ $10^6/\text{L}$	Сите	320,6 (41-909)	183,4 (7-1011)	139,1 (21-546)	P<0,05			P=н.с	
	Ж П		187,9 170	145,6 127,7					
CD16+CD56 $10^6/\text{L}$	Сите	215,7 (47-1003)	121,4 (1-1472)	71,1 (5-381)	P<0,05				
	Ж П		122,4 113,5	77,5 71,1					

Табела 2 – Лимфоцитни супсетови анализирани со проточна цитометрија

Ж – живи пациенти; **П** – починати пациенти

p1 – Mann-Whitney U вредност од споредба на лесна/умерена форма со тешка форма на болест

p2 – Mann-Whitney U вредност од споредба на пациенти со лесна/умерена форма со критична форма на болест

p3 – Mann-Whitney U вредност од споредба на пациенти со лесна/умерена форма со тешка + критична форма болест

p4 – Mann-Whitney U вредност од споредба на живи и починати пациенти со тешка болест

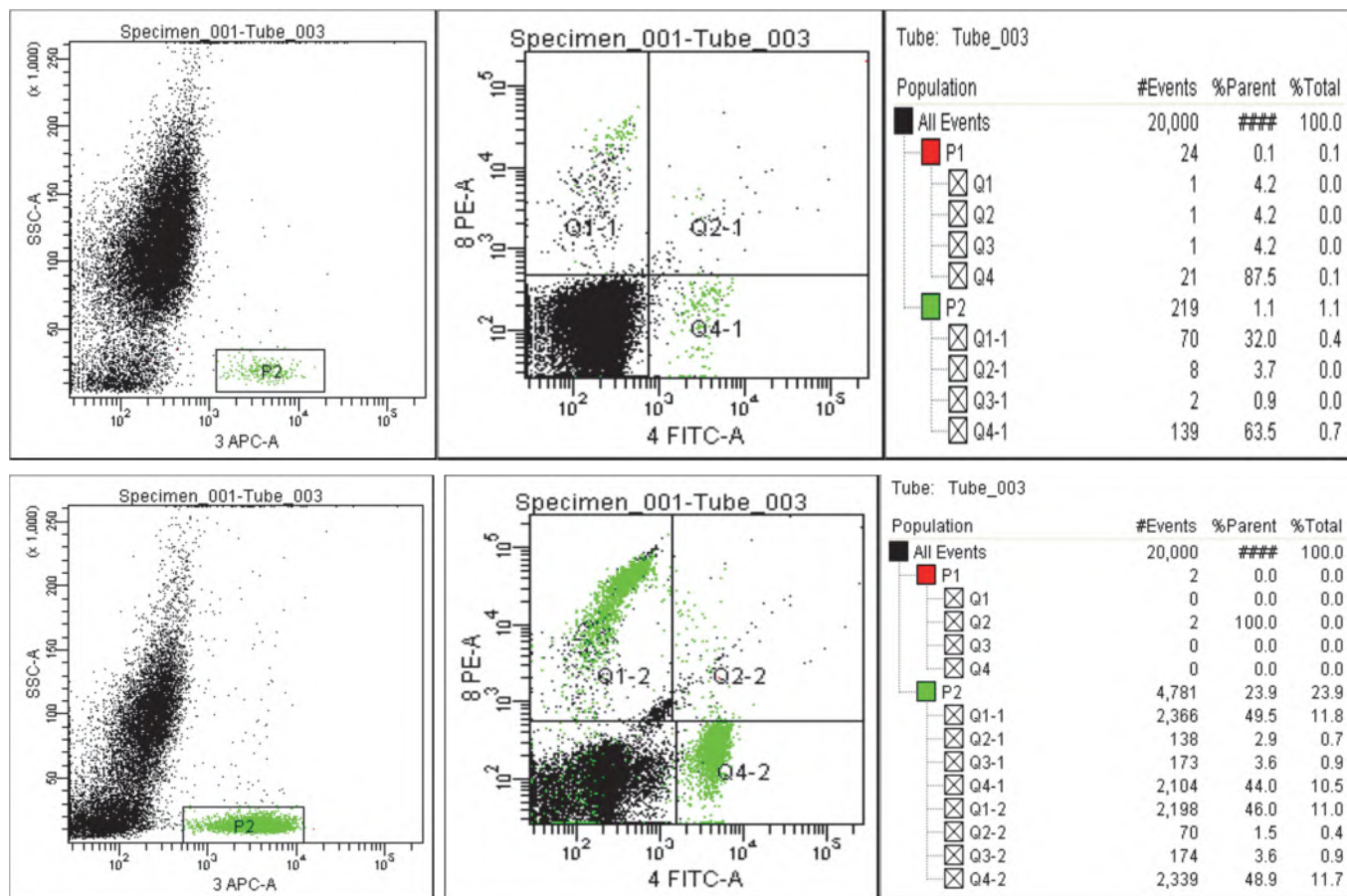
p5 – Mann-Whitney U вредност од споредба на живи и починати пациенти со критична болест

p=n.s – статистички несигнификантна разлика

Клеточна линија и форма на болест	Експресија на PD1 (број на пациенти)	Отсутна експресија на PD1 (број на пациенти)	Chi square тест (лесна/тешка + критична)
CD3+ CD8+ лесна форма	82	2	P=n.s
CD3+CD8+ тешка и критична	315	11	
CD3+ CD4+ лесна форма	55	29	P=n.s
CD3+CD4+ тешка и критична	178	137	

Табела 3 – Експресија на PD1 на Т-лимфоцити кај различни форми на болеста

пресија на PD1 во помала мера, односно кај 65,4% од пациентите со лесна болест и 56,4% кај пациентите со тешка и критична болест. Оваа разлика не е статистички значајна. Овие вредности се прикажани во табела бр. 3.



Фигура бр. 1 - На горната слика е покажан пациент со тешка форма на COVID-19. На долната слика е покажан пациент со лесна форма на болест. Со P2 границиците се опфатени сите T-клетки, односно CD3+ лимфоцити. Q1-1 и Q1-2 квадрантите со зелено ги прикажуваат T-цитотоксичните клетки, односно CD8 позитивните, а CD4 негативни T-лимфоцити. Q4-1 и Q4-2 квадрантите со зелено ги прикажуваат T-помошничките клетки, односно CD4 позитивните, а CD8 негативни T-лимфоцити. Во статистичката анализа, #events го означува бројот на анализирани клетки. Процентуалната застапеност на лимфоцитната супопулација од вкупните T-лимфоцити е прикажана во %Parent, додека застапеноста од сите клетки е означена со %Total.

ДИСКУСИЈА

Од првите месеци на пандемијата со ковид-19, беа објавени голем број научни и ревијални трудови и мета-анализи за промените во хематолошките параметри кај инфекцијата со SARS-CoV-2 и нивното прогностичко значење. Податоците од нив укажуваат на асоцијација помеѓу бројот на леукоцитите, како и на мајорните лимфоцитни супсетови со тежината на клиничка слика и исходот од болеста и се очекуваат пониски вредности кај пациентите со тешка и критична форма на болест^(10,11). Лимфопенијата, во основа, се должи на намалениот број на T-лимфоцити и се смета дека постои позитивна корелација на бројот со времето од појавата на симптомите (10). Нашите резултати се во склад со овие податоци и покажуваат на значајно пониски вредности на CD45+, CD3+, CD4+, CD8+, CD16+CD56+ лимфоцити кај пациентите со тешка и критична болест, кои биле хоспитализирани, во споредба со пациентите со лесна инфекција.

Оваа разлика не беше докажана само кај CD19+ B-лимфоцити, што зборува за тоа дека B-лимфоцитите се најмалку засегнати од акутната инфекција SARS-CoV-2, независно од формата на болест. Слични резултати се добиени од студија во Мексико, која ги евалуирала B-лимфоцитните кластери и супопулации кај ковид-19, каде не е покажана разлика во апсолутниот број на B-лимфоцити помеѓу здрави индивидуи и заболени со ковид-19 од која било форма на болест⁽¹²⁾. Овие податоци може да бидат од особен интерес, бидејќи најголем дел од студиите се насочени кон T-лимфоцитните одговори во акутна фаза на ковид-19 инфекција и истите се добро опишани⁽¹³⁾. За разлика од нив, есенцијалната улога на B-лимфоцитите е во обезбедувањето на долготраен имунитет. Она што е интересно од нашите резултати е што преживеаните со тешка болест имаа повисоки B-лимфоцити од починатите, што не беше случај кај критично болните. Со ова се нагласува потребата од дополнителни студии коишто

ќе ја разјаснат улогата на Б-лимфоцитите во патогенезата и одбраната од ковид-19, како и доцни истражувања кај лица-та со одмината инфекција.

Уште најраните студии го идентификуваат почетниот број на Т-лимфоцити како предиктивен параметар за ризикот од прогресија до тешка болест и потребата од хоспитализација^(11, 13, 14). Изненадувачки, CD8+ Т-лимфоцитите беа пови-соки кај пациентите со тешка форма кои преживеале откол-ку кај починатите, но оваа разлика не беше статистички зна-чајна. Всушност, овој е единствениот лимфоцитен супсет кај кој не беше нотирана статистичка сигнификантност во оваа група. Првите студии на Т-клеточниот имунофенотип кај ковид-19 опишуваат т.н. имунофенотип на исцрпеност кај цитотоксичните Т-клетки со нарушена функција поради зго-лемена експресија на инхибиторни рецептори^(4,5,15). Од нив, PD1 има главна улога, но експресијата само на овој маркер не е доволна за докажување на ваков фенотип, бидејќи истиот е детерминиран од коекспресијата на неколку други инхибитори⁽¹⁵⁾. Спротивно на тоа, друга студија покажува дека PD1+ SARS-CoV-2 специфични CD8+ Т-лимфоцити имаат сочувана антивирусна активност и овие клетки секретираат повеќе интерферон- γ отколку PD1 негативните клетки⁽¹⁶⁾. Со тоа, оваа студија имплицира дека PD1+ CD8+ Т-клетки поверојатно претставуваат хиперфункционални клетки, отколку исцрпени Т-клетки. Во нашата студија, зго-лемена експресија на PD1 на CD8+ клетките беше покажана кај најголем дел од пациентите, независно од тежината на болеста и исходот.

Најголем дел од податоците во литературата го поврзу-ваат нискиот број на НК-лимфоцитите со потешка форма, подолго траење на болеста и намалена продукција на антитела кон вирусот^(17, 18). И во нашата група, НК-лимфоци-тите беа засегнати кај сите пациенти што се гледа преку на-малениот број кај сите форми на болеста, но значајно по-ниски вредности покажавме кај групите со тешка и критич-на форма на болест.

Нашата студија има неколку ограничувања. Интервалот во кој се собирани пациентите е широк (10 дена), а првата точка (10-ти ден од инфекција) е во момент кога постои веќе одмината инфекција. Исто така, станува збор за единечни мерења во само една временска точка, а промените во лим-фоцитите се транзиторни и осцилираат во различни точки во тек на инфекција⁽¹⁵⁾. И последно, во статистичката анали-за пациентите не беа поделени според возраст и пол, што би можело дополнително да влијае врз резултатите, прво поради самиот одговор кон инфекцијата а второ, бидејќи лимфоцитните супсетови се афектирани од полот и имуно-сенесценцијата⁽¹⁹⁾.

ЗАКЛУЧОК

Нашите резултати покажуваат дека вкупните лимфоцити, Т-лимфоцитите и НК лимфоцитите се во позитивна корела-ција со клиничкиот статус и исходот од болеста кај пациен-тите со тешка форма со ковид-19. Корелацијата помеѓу бро-јот на лимфоцитните супсетови, особено Т-клеточните попу-лации, и исходот од лекувањето не се забележува кај кри-тично болните пациенти, што ја поставува хипотезата дека

други ризик фактори го детерминираат исходот кај критич-но болните. Експресијата на PD1 на Т-лимфоцитите е многу чест наод кај пациентите со ковид-19, независно од форма-та на болест. Потребни се понатамошни студии кои ќе ги споредуваат овие наоди кај групи стратифицирани и според други ризик фактори.

- Анализите се работени во состав на научноистражувачки проект за евалуација на клеточни и хуморални имуни одго-вори кај ковид-19, поддржан од Меѓународниот центар за генетски инженеринг и биотехнологија во Трст, Италија.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА:

1. Ou M, Zhu J, et al. Risk factors of severe cases with COVID-19: a meta-analysis. *Epidemiol Infect.* 2020 Aug 12;148:e175.
2. Huang, L., Pranata, R. Lymphopenia in severe coronavirus disease-2019 (COVID-19): systematic review and meta-analysis. *J intensive care* 8, 36 (2020).
3. Chen Z, John Wherry E. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat Rev Immunol.* 2020 Sep;20(9):529-536.
4. Zheng HY, Zhang M, et al. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol.* 2020 May;17(5):541-543.
5. Zheng, M., Gao, Y., Wang, G. et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol* 17, 533–535 (2020).
6. A. Mazzoni, L. Salvati, L. et al. Impaired immune cell cytotoxicity in severe COVID-19 is IL-6 dependent *J. Clin. Invest.*, 130 (2020), pp. 4694-4703
7. Yi JS, Cox MA, Zajac AJ. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology.* 2010;129(4):474-481.
8. Sester U, Presser D, Dirks J, Gärtner BC, Köhler H, Sester M. PD-1 expression and IL-2 loss of cytomegalovirus- specific T cells correlates with viremia and reversible functional anergy. *Am J Transplant.* 2008 Jul; 8(7):1486-97.
9. COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. National Institutes of Health. Available at <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>. Accessed [21.05.2023].
10. Zhang W, Li L, Liu et al. The characteristics and predictive role of lymphocyte subsets in COVID-19 patients. *Int J Infect Dis.* 2020 Oct;99:92-99.
11. Huang W, Berube J, McNamara M, et al. Lymphocyte Subset Counts in COVID-19 Patients: A Meta-Analysis. *Cytometry A.* 2020;97(8):772-776.
12. Sosa-Hernández VA, Torres-Ruiz J, et al. B Cell Subsets as Severity-Associated Signatures in COVID-19 Patients. *Front Immunol.* 2020 Dec 3;11:611004.
13. Iannetta, M., Buccisano, F., Fraboni, D. et al. Baseline T-lymphocyte subset absolute counts can predict both outcome and severity in SARS-CoV-2 infected patients: a single center study. *Sci Rep* 11, 12762 (2021).
14. Urra, J. M., Cabrera, C. M., Porras, L. & Ródenas, I. Selective CD8 cell reduction by SARS-CoV-2 is associated with a worse prognosis and systemic inflammation in COVID-19 patients. *Clin. Immunol.* 217, 108486 (2020).
15. Rha, MS., Shin, EC. Activation or exhaustion of CD8+ T cells in patients with COVID-19. *Cell Mol Immunol* 18, 2325–2333 (2021).
16. Rha MS, Jeong HW, et al. PD-1-Expressing SARS-CoV-2-Specific CD8+ T Cells Are Not Exhausted, but Functional in Patients with COVID-19. *Immunity.* 2021 Jan 12;54(1):44-52.e3.
17. Osman M, Faridi RM, et al. Impaired natural killer cell counts and cytolytic activity in patients with severe COVID-19. *Blood Adv.* 2020 Oct 27;4(20):5035-5039.
18. Bao, C., Tao, X., Cui, W. et al. Natural killer cells associated with SARS-CoV-2 viral RNA shedding, antibody response and mortality in COVID-19 patients. *Exp Hematol Oncol* 10, 5 (2021).
19. Bellei S, Metafuni E, et al Increased CD95 (Fas) and PD-1 expression in peripheral blood T lymphocytes in COVID-19 patients. *Br J Haematol.* 2020 Oct;191(2):207-211.