

Abschlussbericht

Forschungsprojekt:

Untersuchungen zur Pathogenese des Eisen- und Hämoglobinstoffwechsels in Patienten mit akuter und chronischer COVID-19 Erkrankung

Projekt: 03/22

Laufzeit: 01.10.2022 – 30.09.2024

Verlängerung: 01.10.2024-31.12.2024

1. Forschungsvorhaben

COVID-19, verursacht durch das SARS-CoV-2-Virus, ist in erster Linie eine Erkrankung der Atemwege, kann aber auch andere Organsysteme, wie das hämatologische Kompartiment, betreffen. Mehrere Studien berichteten über eine Zunahme der Leukozyten, einen Rückgang der Erythrozyten und des Hämoglobinspiegels, einen Anstieg der Ferritin- und D-Dimer-Werte sowie anderer Gerinnungsmarker [1]. Dabei können die Symptome dieser Erkrankung sehr stark variieren und umfassen neben Fieber, Husten, Kurzatmigkeit und Müdigkeit auch diffuse Körperschmerzen, Geschmacks- oder Geruchsverlust sowie Halsschmerzen [2]. Unabhängig von der Schwere der Erkrankung können diese Symptome bei etwa 6-35 % aller COVID-19-Patienten auch noch Monate nach der Erstinfektion mit SARS-CoV-2 auftreten [3]. Die pathophysiologischen Mechanismen einer solchen Long-COVID-Erkrankung werden immer noch diskutiert und umfassen die Auswirkungen von Viruspersistenz, Entzündung, übermäßiger Blutgerinnung und Autoimmunität [4]. Es gibt Berichte, dass bei Long-COVID das hämatologische System verändert ist, da bei Patienten niedrigere Hämoglobinwerte, erhöhte D-Dimere, Anämie, Thrombozytopenie und Lymphopenie festgestellt wurden [5-7]. Darüber hinaus wurden bei Long-COVID Veränderungen in der Größe und Morphologie der Erythrozyten nachgewiesen, die zu einer beeinträchtigten Sauerstoffdiffusion beitragen können [8]. Wir und andere identifizierten erythroide Vorläuferzellen als direktes Ziel von SARS-CoV-2 und demonstrierten, dass SARS-CoV-2 Dysregulationen im Hämoglobin- und Eisenstoffwechsel hervorruft [9]. Da Hämoglobin die Hauptkomponente der Erythrozyten darstellt und diese Zellen den größten Anteil am Blut ausmachen, lassen sich pathologische Veränderungen des Hämoglobinstoffwechsels und Eisenmetabolismus am besten mit Blutproben untersuchen. Mit dieser Studie sollen verschiedene labordiagnostische, hämatologische sowie immunologische und molekulare Parameter aus dem Blut von COVID-19- sowie Long-COVID-Patienten analysiert werden, die Rückschlüsse auf die Veränderung des Hämoglobin- sowie Eisenstoffwechsels liefern können. Deshalb sollten im vorliegenden Projekt die Ergebnisse aus der routinemäßig erfolgten klinischen Untersuchung mit Hilfe der nach klinischer Routine entnommenen Blutproben um weitere studienbedingte Analysen wie spezielle laborchemische, molekulare und immunologische Tests ergänzt werden. Unsere Forschungsbestrebungen zielten dabei langfristig auf eine Verbesserung der Therapiefähigkeit von Long-COVID-Patienten ab.

2. Planung und Ablauf des Forschungsvorhabens

Bei der geplanten Studie handelt es sich um eine Kooperation mit der Abteilung für Pneumologie der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikum Carl Gustav Carus und dem DRK-Blutspendedienst Nord-Ost gGmbH. Dabei wurde den Long-COVID-Patienten zeitgleich mit Routinelaboruntersuchungen, die im Rahmen der klinischen Behandlung zur Kontrolle von Werten wie Blutbildparameter, Blutgasanalyse und Entzündungsmarker erfolgten, ein EDTA-Röhrchen entnommen. Vergleichend zu den Patienten erfolgte die Analyse bei gesunden Kontrollprobanden. Der Proband wurde über die Art der in der Studie entnommenen Proben aufgeklärt. Die Proben wurden pseudoanonymisiert weiterverarbeitet. Im Studienzeitraum konnten 66 Long-COVID-Patienten und ca. 40

gesunde Probanden rekrutiert werden. Die Diagnose von Long-COVID wurde gemäß der deutschen nationalen Leitlinie für Long-COVID gestellt und umfasste die Dokumentation einer vorangegangenen SARS-CoV-2-Infektion, eine standardisierte Symptom- und Funktionsbeurteilung sowie den standardisierten Ausschluss anderer Ursachen. Die Rekrutierung erfolgte anhand eines Fragebogens und der Symptome (Fatigue, Husten, Kurzatmigkeit und andere kognitive Veränderungen). Um auszuschließen, dass die erhaltenen Daten aufgrund eines geringeren durchschnittlichen Alters der gesunden Kohorte zustande kamen [10], wurden die Kohorten später nochmal auf Alter und Geschlecht gematched, wodurch sich die Kohorte der Patienten auf 42 reduziert hatte und die gesunden auf 22 (**Tab. 1**). Auch der Raucherstatus wurde erfasst, zeigte aber in beiden Kohorten keine Unterschiede.

Die Patienten wurden auf der Grundlage mehrerer Parameter rekrutiert. Zunächst wurde ein Post-COVID-Fragebogen ausgefüllt. Nur Patienten mit mindestens Grad 2 (d. h. leichter Funktionsbeeinträchtigung) wurden in unsere Studie aufgenommen. Darüber hinaus wurden mehrere Fragebögen ausgefüllt, um den Schweregrad des Müdigkeitssyndroms (Fatigue-Severity-Scale, Fatigue-Assessment-Scale), der obstruktiven Schlafapnoe (Epworth-Sleepiness-Scale) und der Tagesschläfrigkeit (Stop-Bang-Score) zu ermitteln. Die psychologischen Tests wurden mit dem Patients Health Questionnaire durchgeführt. Schließlich wurden die Lungenfunktion und das Herz-Kreislauf-System mit Hilfe der Spiroergometrie und der Borg-Skala untersucht.

Tab. 1: Demografische Daten der Kohorten. Die Patienten und die gesunden Spender waren hinsichtlich Alter und Geschlecht identisch. P-Werte wurden mit dem Chi-Quadrat-Test berechnet, und p-Werte von weniger als 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

| | Healthy control (HC) | Long-COVID (LC) | p value |
|--------------------------|----------------------|-----------------|---------|
| Number of samples | 22 | 42 | |
| age, years | | | |
| mean (SD) | 39.23 ± 12.7 | 40.07 ± 9.5 | 0.595 |
| range | 18-64 | 17-55 | |
| sex | | | 0.491 |
| female | 15 (68.2.0%) | 32 (76.2%) | |
| male | 7 (31.8%) | 10 (23.8%) | |
| number of smokers | | | 0.375 |
| never | 6 (27.3%) | 17 (41.5%) | |
| non-smoker | 11 (50.0%) | 13 (31.7%) | |
| former | 2 (9.1%) | 6 (14.6%) | |
| current | 3 (13.6%) | 2 (4.9%) | |
| unknown | 0 (0.0%) | 4 (7.3%) | |

Zusätzlich wurden klinische Symptome abgefragt (**Tab. 2**), wobei die Patienten fast alle eher milde Verläufe der Corona-Erkrankung hatten mit nur wenigen Ausnahmen.

Tab. 2: Klinische Symptome, die von den Long-COVID-Patienten berichtet wurden.

| symptom | numbers of Long-COVID patients |
|--|---------------------------------------|
| chronic fatigue | 33 (78.6%) |
| shortness of breath | 31 (73.8%) |
| cough | 24 (57.1%) |
| cognitive dysfunction | 18 (42.9%) |
| hospitalization | 2 (4.76%) |
| ventilation | 0 (0.0%) |
| ECMO | 0 (0.0%) |
| total number of patients with reported symptoms | 42 |

Sowohl die Patienten als auch die gesunden Probanden wurden zur Blutabnahme in die Pneumologische Abteilung der Medizinischen Klinik I geleitet, wo zunächst die Aufklärung erfolgte, sowie die Befragung. Im Anschluss erfolgte die Blutentnahme sowie die Blutgas-Analyse. Alle Werte wurden in anonymer Form an die Abteilung für Experimentelle Transfusionsmedizin weitergeleitet. Nach Erhalt der Blutproben erfolgte zunächst die Raman-Messung der roten Blutzellen am Vollblut zur Analyse von Veränderungen der Hämoglobinstruktur sowie die durchflusszytometrische Analyse von Monozyten-Subpopulationen und der T-, B- und NK-Zellen. Danach wurden Plasma und Blutzellen aufgearbeitet und für die Bestimmung des Eisenstoffwechsels, RNA-Isolation, DNA-Isolation, Westernblot und Massenspektrometrie gelagert.

3. Wissenschaftliche Ergebnisse des Projektes

In einem ersten Schritt analysierten wir den Häm- und Eisenstoffwechsel in Blutproben von Long-COVID-Patienten und gesunden Spendern. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Hämoglobingehalt, der Menge der roten Blutkörperchen und den Hämatokritwerten in den Blutproben von Long-COVID-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern. Dagegen konnte eine signifikante Abnahme des Plasma-Eisenspiegels sowie der Transferrinsättigung nachgewiesen werden (**Tab. 3**).

Tab. 3: Hämatologische, Eisenstoffwechselfparameter sowie Blutgasanalyse bei Long-COVID-19-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die Tests wurden zweiseitig durchgeführt. Für die statistischen Analysen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die fettgedruckten Einträge stellen signifikante Unterschiede zwischen den Proben Gruppen dar. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

| | Healthy control (HC) | Long-COVID (LC) | p value |
|---|------------------------------------|------------------------------------|------------------------|
| iron metabolism | n = 22 | n = 42 | |
| plasma ferritin [$\mu\text{g/l}$] | 109.0 \pm 25.7 | 110.8 \pm 25.9 | 0.653 |
| plasma iron [$\mu\text{mol/l}$] | 16.74 \pm 2.08 | 11.04 \pm 0.91 | 0.012* |
| plasma transferrin [g/l] | 2.70 \pm 0.15 | 2.43 \pm 0.08 | 0.233 |
| transferrin saturation [%] | 25.6 \pm 2.75 | 18.6 \pm 1.6 | 0.039* |
| blood gas analysis parameters | n = 22 | n = 42 | |
| pH value | 7.28 \pm 0.15 | 7.44 \pm 0.01 | 0.559 |
| pCO₂ [kPa] | 5.08 \pm 0.10 | 4.43 \pm 0.13 | 0.0014** |
| pO₂ [kPa] | 11.59 \pm 0.27 | 12.32 \pm 0.18 | 0.0379* |
| O₂Hb [%] | 96.0 \pm 0.26 | 95.3 \pm 0.16 | 0.01* |
| HbCO [%] | 1.34 \pm 0.22 | 2.06 \pm 0.1 | < 0.0001**** |
| Bicarbonate value [mmol/L] | 25.5 \pm 0.30 | 23.7 \pm 0.28 | < 0.0001**** |
| base excess value [mmol/L] | 1.22 \pm 0.35 | -0.91 \pm 0.35 | < 0.0001**** |
| Lactat [mmol/L] | 0.64 \pm 0.08 | 1.73 \pm 0.38 | 0.0002*** |
| glucose [mmol/L] | 5.74 \pm 0.22 | 6.27 \pm 0.20 | 0.102 |
| Na ⁺ | 139.3 \pm 0.33 | 140.4 \pm 0.44 | 0.063 |
| K ⁺ | 4.27 \pm 0.05 | 4.39 \pm 0.09 | 0.989 |

Als Nächstes führten wir klinische Blutgasanalysen durch, um Veränderungen der Sauerstoffbindung an Hämoglobin und des Säure-Basen-Gleichgewichts bei Long-COVID-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern zu ermitteln. Interessanterweise ging dies mit einem gleichzeitigen Anstieg der Kohlenmonoxidbindung einher. Der pCO₂ (Kohlendioxidpartialdruck) war im arteriellen Blut von Long-COVID-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern deutlich niedriger, während der pO₂ signifikant höher war. Obwohl der pH-Wert des Blutes in beiden Gruppen innerhalb physiologischer Grenzen lag, waren die Werte für den Basenüberschuss und das Bikarbonat bei Long-COVID-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern signifikant niedriger (**Tab. 3**).

Wir fanden außerdem Signifikante Veränderungen im Spin-Zustand des Eisens im Hb, von denen einige mit gepackten, 42 Tage lang gelagerten Erythrozyten vergleichbar waren (**Abb. 1**; grüne Linie). Es wurde u. a. eine Zunahme der Banden 396 und 551 cm⁻¹ beobachtet, was auf die Bildung von Disulfidbrücken im Hämoglobin von Long-COVID-Patienten hinweisen könnte. Zusammen mit den erhöhten Lactat-Werten (**Tab. 3**), lässt dies darauf schließen, dass im venösen Blut von Long-COVID-Patienten erhöhte Mengen von Sauerstoff-gebundenem Hämoglobin vorhanden sind, da der Sauerstoff offensichtlich nicht gut ins Gewebe abgegeben werden kann, was u. a. die Kurzatmigkeit der Patienten erklären könnte.

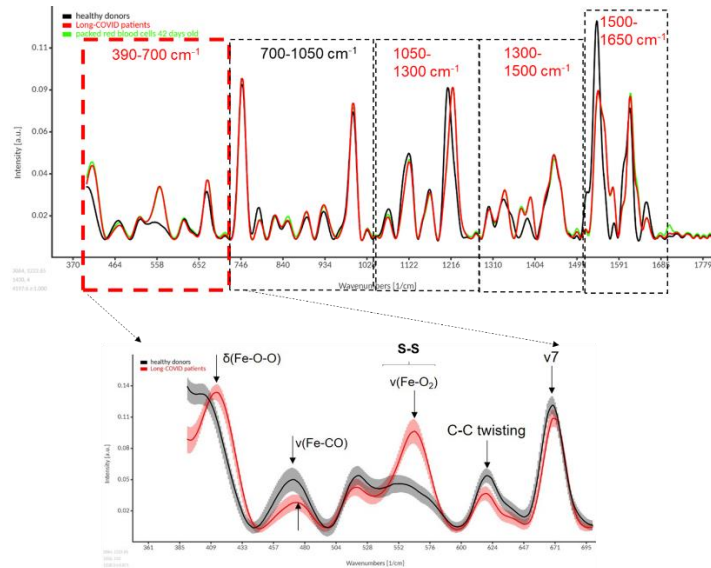


Abb. 1: Raman-Spektren von Erythrozyten von Long-COVID-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.

Auf der Grundlage unserer Raman-Daten, die auf eine Hämoglobin-Dysfunktion hindeuten, analysierten wir als Nächstes die Stoffwechselzwischenprodukte, die an der Hämoglobin-Synthese und dem Häm-Abbau beteiligt sind, mittels Massenspektrometrie (**Abb. 2**). Dabei fanden wir eine deutliche Zunahme der toxischen Zwischenmetaboliten Koproporphyrin I und III, Uroporphyrin III, aber auch Koproporphyrinogen III und Heme- CO_2 , während Fe-Heme keinen Unterschied zu gesunden Probanden zeigte. Diese Daten deuten auf die Entstehung einer möglichen sekundären Koproporphyrurie als Folge einer SARS-CoV-2-Infektion hin.

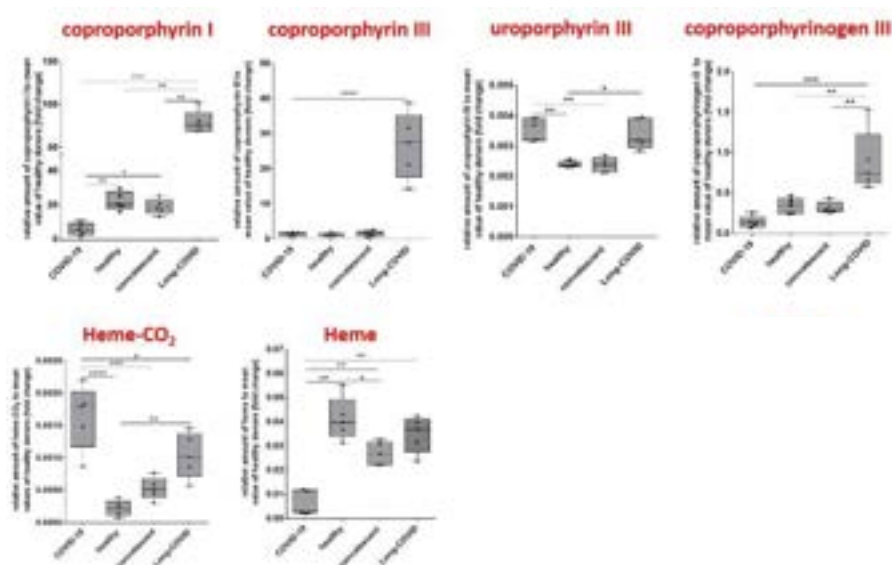


Abb. 2: Massenspektrometrische Analyse der metabolischen Zwischenprodukte der Häm-Biosynthese. Die Erythrozytenporphyrine wurden aus plasmareduzierten Vollblutproben extrahiert. Dargestellt sind die relativen Expression zum Mittelwert der gesunden Spender. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, One-Way-ANOVA

Wir analysierten zudem auch die Lymphozyten und Monozyten-Anzahl und stellten fest, dass die Gesamt-Lymphozytenzahl bei Long-COVID-Patienten signifikant niedriger war im Vergleich zu den gesunden Probanden ($1,88 \times 10^9/l$ vs. $2,25 \times 10^9/l$). Die verringerte Lymphozytenzahl bei Long-COVID-Patienten lässt sich möglicherweise durch eine Erschöpfung des Immunsystems erklären, ein Phänomen, das häufig mit chronischen Virusinfektionen einhergeht [11]. Sowohl in lungenresidenten als auch in zirkulierenden T-Zellen von COVID-19-Patienten wurde ein Anstieg der Expression von Erschöpfungsmarkern beobachtet [12, 13]. Es gibt Hinweise darauf, dass SARS-CoV-2, ähnlich wie andere chronische Virusinfektionen, die funktionellen Untergruppen von CD4+ und CD8+ T-Zellen stark beeinträchtigt [14]. So könnte eine Schwächung des Immunsystems die Ausbreitung von SARS-CoV-2 begünstigen, was wiederum noch unbekannt langfristige Auswirkungen haben und ein Auslöser für Long-COVID sein könnte. Darüber hinaus kann die Reaktivierung latenter Erreger, einschließlich Herpesviren und anderer, zu Long-COVID beitragen [15].

Auch hinsichtlich der Monozyten-Subpopulationen ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Proben der Long-COVID-Patienten und der gesunden Kohorte (**Abb. 3**). Die Intermediären Monozyten (IM) sowie die CD56+-Monozyten waren bei Long-COVID-Patienten signifikant mehr vorhanden, während die nicht-klassischen Monozyten (NCM) verringert waren, obwohl es in der Gesamtmenge an Monozyten keine Unterschiede gab (**Abb. 3A**). Auffällig war auch, dass die nicht-klassischen Monozyten bei Long-COVID-Patienten mit kognitiven Dysfunktionen deutlich erhöht waren im Vergleich zu Patienten ohne kognitive Dysfunktionen (**Abb. 3B**). Patienten mit Husten zeigten dagegen eine erhöhte Anzahl klassischer Monozyten (CM) und Cd56+-Monozyten.

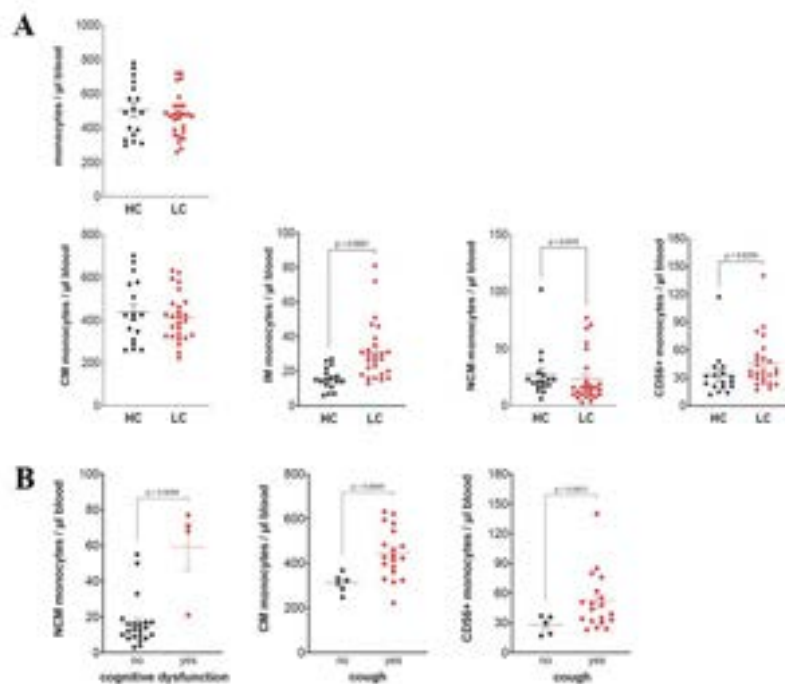


Abb. 3: Analyse der unterschiedlichen Monozyten-Populationen in Long-COVID-Patienten (LC) im Vergleich zur gesunden Kohorte (HC). CM = classical monocytes; IM = intermediäre Monozyten; NCM = non-classical monocytes. **A.** Vergleich der einzelnen Monozyten-Populationen zwischen Long-COVID-Patienten und gesunden Probanden. **B.** Vergleich der Monozyten-Populationen von Long-COVID-Patienten in Abhängigkeit der Symptome.

Eine weitere Frage, die es galt zu untersuchen war: Warum können die Patienten den Sauerstoff nicht so gut ins Gewebe abgeben? Ein weiterer Regulator für die Bindungsaffinität von Sauerstoff an Hämoglobin ist 2,3-Diphosphoglycerat (DPG). Dieses wird über den Rapoport-Luebering-Zyklus, einem Nebenweg der Glykolyse, in den Erythrozyten aus dem anfallenden 1,3-Bisphosphoglycerat durch das Enzym 2,3-Bisphosphoglycerat-Mutase gebildet. 2,3-DPG bindet nicht-kovalent an die β -Untereinheit von Desoxyhämoglobin, nicht aber an oxygeniertes Hämoglobin. Es setzt die Sauerstoffaffinität von Hämoglobin herab, indem es die T-Form von Hämoglobin stabilisiert. Dies führt zu einer vereinfachten Abgabe von Sauerstoff in das Gewebe, gleichzeitig allerdings auch zu einer erschwerten Sauerstoffaufnahme im Lungenkreislauf. Daher ist es unerlässlich, dass dieses System sich im Gleichgewicht befindet. Um zu untersuchen, ob möglicherweise ein Ungleichgewicht vorliegt, haben wir zum einen die Expression der Bisphosphatglycerat-Mutase (BPGM) mittels Westernblot analysiert und zum anderen die DPG-Konzentration im Plasma mittels Massenspektrometrie gemessen. Dafür wurden die Proben so exakt wie möglich gematched, um Alter und Geschlecht als mögliche Einflussfaktoren auszuschließen. In beiden Kohorten wurden jeweils 9 Männer (mit einem Durchschnittsalter von ca. 55 Jahren) und 11 Frauen mit ca. 45 Jahren Durchschnittsalter ausgewertet. Die Ergebnisse (**Abb. 4**) zeigen sowohl eine deutlich verminderte Expression der BPGM als auch des 2,3-Diphosphoglycerates bei den Long-COVID-Patienten gegenüber den gesunden Spendern, wobei das bei Frauen und Männern gleichermaßen zu sehen ist. Blau dargestellt die Männer und schwarz die Frauen.

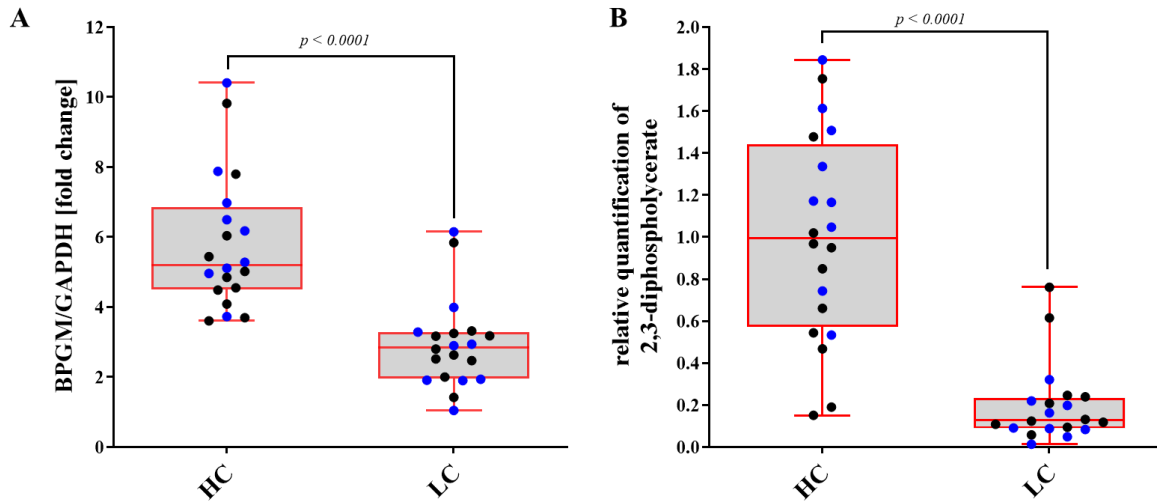


Abb. 4: Störung des Rapoport-Luebering-Zyklus in Long-COVID-Patienten. **A.** Quantitativer Nachweis der BPGM-Expression mittels Westernblot-Analyse im plasmadepletierten Vollblut. **B.** Massenspektrometrische Analyse der 2,3-DPG-Expression im Plasma. HC = gesunde Spender, LC = Long-COVID-Patienten. Mann-Whitney-U-Test

Anders als bei den gesunden Probanden, scheint bei Long-COVID-Patienten durch die verminderte DPG-Bindung die Sauerstoffaffinität erhöht zu werden, so dass weniger Sauerstoff ans Gewebe abgegeben werden kann.

Zusätzlich wurde auch die Plasmakonzentration von Adenosinnukleotiden mit Hilfe der Massenspektrometrie gemessen und ein starker Rückgang von ATP, aber auch von ADP und AMP festgestellt (**Abb. 5**).

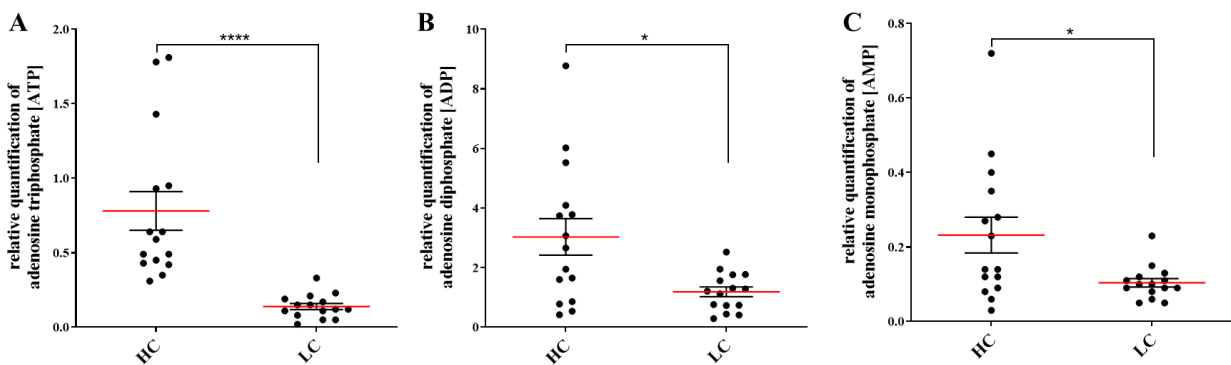


Abb. 5: Nachweis von Adenosinnukleotiden im Plasma mittels Massenspektrometrie. **A.** Relative Quantifizierung der ATP-Menge. **B.** Relative Quantifizierung der ADP-Menge. **C.** Relative Quantifizierung der AMP-Menge. HC = gesunde Spender, LC = Long-COVID-Patienten. Mann-Whitney-U-Test. $*$ $p < 0,05$, $****p < 0,0001$.

4. Abschließende Beurteilung des Projektes, Ausblick und Publikationen

Im Rahmen des vorgelegten Projektes, sollten verschiedene Parameter analysiert werden, um ein besseres Verständnis für die Ausbildung von Long-COVID zu erhalten und somit für die Entwicklung neuer Therapien zur Vermeidung schwerer Krankheitsverläufe oder ausgeprägten Langzeitfolgen. Aus diesem Grund wurden umfassende diagnostische Analysen durchgeführt, die helfen können, potenzielle adjuvante Interventionen zur Verbesserung der Hämoglobinfunktion, der Eisenüberlagerung und den allgemeinen hypoxischen Zustand zu entwickeln. Auch wenn die zugrundeliegenden Pathomechanismen in diesem Projekt noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnten und weitere klinische und experimentelle Studien notwendig sein werden, könnten ein möglicher Immundefekt und eine gestörte Erythrozytenfunktion, die zu einer Störung des Säure-Basen-Gleichgewichts führt, plausible Ursachen für Long-COVID sein. Erhöhte Carboxyhämoglobinwerte (COHb) treten häufig bei Sepsis, Hämolyse und schweren Entzündungen auf und können eine tiefgreifende Hypoxie verursachen und letztlich zu neurokognitiven Defiziten und Myokarddepression führen [16]. Darüber hinaus wurde vorgeschlagen, dass der Redoxzustand der Zelle und die metabolischen Anforderungen durch die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins und die Bindung von Desoxyhämoglobin an den zytosolischen N-Terminus von Band 3 (AE1) reguliert werden [17, 18]. AE1 ist bekanntlich das am häufigsten vorkommende Membranprotein in reifen Erythrozyten und spielt eine Rolle bei der Chloridverschiebung (Bikarbonat/Chlorid-Homöostase) und dient als Andockstelle für verschiedene Strukturproteine, die zur Membrintegrität beitragen [18, 19]. Erhöhte COHb-Werte können die Integrität der Erythrozyten durch eine Herabregulierung der Sauerstoffsättigung beeinträchtigen. Bei niedriger Sauerstoffsättigung verdrängt Desoxyhämoglobin die glykolytischen Enzyme, um an den N-Terminus von AE1 zu binden, wodurch die Glykolyse und die Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) und 2,3-DPG begünstigt werden, um die weitere Sauerstofffreisetzung und die Oxygenierung des Gewebes zu fördern und so die Hypoxie zu lindern. Daher könnte die Analyse der 2,3-DPG- und ATP-Konzentration ein wichtiger diagnostischer Biomarker für die Ausbildung von Long-COVID sein und wurden im weiteren Verlauf der Studie in unsere Untersuchungen eingeschlossen. Long-COVID-Patienten leiden regelmäßig unter Kurzatmigkeit, was wiederum zu einer kompensatorischen Erhöhung der Atemfrequenz führt, die wiederum eine respiratorische Alkalose verursachen kann. Dies wird zum Teil durch den nierenabhängigen Abbau von zirkulierendem Bikarbonat kompensiert [20], was niedrigere Bikarbonatwerte und einen Basenüberschuss im arteriellen Blut von Long-COVID-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern erklären könnte. Dies wird auch durch den beobachteten niedrigeren $p\text{CO}_2$ -Wert bei Long-COVID-Patienten bestätigt, obwohl der pH-Wert im Vergleich zu gesunden Spendern unverändert blieb. Obwohl die arteriellen Plasma- $[\text{H}^+]$ -Veränderungen keine Auswirkungen auf den O_2 -Fluss von der Lunge zu den peripheren Geweben haben, sind sie wichtige Indikatoren für den tatsächlichen Grad einer systemischen Säure-Basen-Störung [21]. Der in dieser Studie festgestellte mäßige Plasmaeisenmangel und die Transferrinsättigung könnten auf ein gewisses Maß an Hämolyse hinweisen. Unter hämolytischen Bedingungen, die sich auf einen unkontrollierten Abbau der Erythrozyten beziehen, wird Eisen freigesetzt und geht über den Urin verloren, so dass die Transferrinsättigung aufgrund des daraus resultierenden Eisenmangels niedrig sein kann [22].

Wir konnten bereits eine beträchtliche Anzahl an Long-COVID-Patienten rekrutieren und werden auch über die Förderung hinaus weitere Patienten rekrutieren um das finale Ziel von 200 Patienten zu erreichen. Der Anteil der gesunden Probanden wird ebenfalls weiter erhöht, um ein weiteres Matching bzgl. Alter und Geschlecht zu gewährleisten. Zu diesem Zweck wird über den DRK-Blutspendedienst Nord-Ost gGmbH ein eigenes Radiometer angeschafft, was die Rekrutierung um ein Vielfaches erleichtern wird. Leider haben wir während der Projektlaufzeit keine weiteren schwer erkrankten Patienten rekrutieren können, dass wir zum Vergleich auf die alte Patienten-Kohorte zurückgreifen mussten.

Erste Daten konnten bereits in der Zeitschrift *Hormone and Metabolic Research* erfolgreich veröffentlicht werden [10]. Ein weiteres Paper ist bereits in er Vorbereitung. Die Daten wurden zudem auf nationalen und Internationalen Kongressen in Form von Postern und Vorträgen vorgestellt.

56. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e.V. (DGTI) in Berlin 2023. „Long COVID patients show enhanced formation of COHb and changes in Raman spectra of Hemoglobin associated vibrational modes.“ – Vortrag

38. Internationaler ISBT (International Society of Blood Transfusion) Kongress in Barcelona 2024. „Long-COVID patients show enhanced formation of COHb and accumulation of toxic porphyrin intermediates in erythrocytes“ – Poster

57. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e.V. (DGTI) in Düsseldorf 2024. „Impaired RBC functionality in Long-COVID patients: enhanced formation of COHb and accumulation of toxic porphyrin intermediates as possible triggers of chronic fatigue and anemia“ – Poster (**Poster Award**)

5. Literatur

- [1] E. Al-Saadi, M.A. Abdulnabi, Hematological changes associated with COVID-19 infection, *J Clin Lab Anal* 36(1) (2022) e24064.
- [2] S. Gajendra, Spectrum of hematological changes in COVID-19, *Am J Blood Res* 12(1) (2022) 43-53.
- [3] C.C. Global Burden of Disease Long, S. Wulf Hanson, C. Abbafati, J.G. Aerts, Z. Al-Aly, C. Ashbaugh, T. Ballouz, O. Blyuss, P. Bobkova, G. Bonsel, S. Borzakova, D. Buonsenso, D. Butnaru, A. Carter, H. Chu, C. De Rose, M.M. Diab, E. Ekbom, M. El Tantawi, V. Fomin, R. Frithiof, A. Gamirova, P.V. Glybochko, J.A. Haagsma, S. Haghjooy Javanmard, E.B. Hamilton, G. Harris, M.H. Heijenbrok-Kal, R. Helbok, M.E. Hellemons, D. Hillus, S.M. Huijts, M. Hultstrom, W. Jassat, F. Kurth, I.M. Larsson, M. Lipcsey, C. Liu, C.D. Loflin, A. Malinowski, W. Mao, L. Mazankova, D. McCulloch, D. Menges, N. Mohammadifard, D. Munblit, N.A. Nekliudov, O. Ogbuoji, I.M. Osmanov, J.L. Penalvo, M.S. Petersen, M.A. Puhan, M. Rahman, V. Rass, N. Reinig, G.M. Ribbers, A. Ricchiuto, S. Rubertsson, E. Samitova, N. Sarrafzadegan, A. Shikhaleva, K.E. Simpson, D. Sinatti, J.B. Soriano, E. Spiridonova, F. Steinbeis, A.A. Svistunov, P. Valentini, B.J. van de Water, R. van den Berg-Emons, E. Wallin, M. Witzernath, Y. Wu, H. Xu, T. Zoller, C. Adolph, J. Albright, J.O. Amlag, A.Y. Aravkin, B.L. Bang-Jensen, C. Bisignano, R. Castellano, E. Castro, S. Chakrabarti, J.K. Collins, X. Dai, F. Daoud, C. Dapper, A. Deen, B.B. Duncan, M. Erickson, S.B. Ewald, A.J. Ferrari, A.D. Flaxman, N. Fullman, A. Gamkrelidze, J.R. Giles, G. Guo, S.I. Hay, J. He, M. Helak, E.N. Hulland, M. Kereselidze, K.J. Krohn, A. Lazzar-Atwood, A. Lindstrom, R. Lozano, D.C. Malta, J. Mansson, A.M. Mantilla Herrera, A.H. Mokdad, L. Monasta, S. Nomura, M. Pasovic, D.M. Pigott, R.C. Reiner, Jr.,

- G. Reinke, A.L.P. Ribeiro, D.F. Santomauro, A. Sholokhov, E.E. Spurlock, R. Walcott, A. Walker, C.S. Wiysonge, P. Zheng, J.P. Bettger, C.J.L. Murray, T. Vos, Estimated Global Proportions of Individuals With Persistent Fatigue, Cognitive, and Respiratory Symptom Clusters Following Symptomatic COVID-19 in 2020 and 2021, *JAMA* 328(16) (2022) 1604-1615.
- [4] H.E. Davis, L. McCorkell, J.M. Vogel, E.J. Topol, Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations, *Nat Rev Microbiol* 21(3) (2023) 133-146.
- [5] A. Lehmann, H. Prosch, S. Zehetmayer, M.R. Gysan, D. Bernitzky, K. Vonbank, M. Idzko, D. Gompelmann, Impact of persistent D-dimer elevation following recovery from COVID-19, *PLoS One* 16(10) (2021) e0258351.
- [6] E. Pasini, G. Corsetti, C. Romano, T.M. Scarabelli, C. Chen-Scarabelli, L. Saravolatz, F.S. Dioguardi, Serum Metabolic Profile in Patients With Long-Covid (PASC) Syndrome: Clinical Implications, *Front Med (Lausanne)* 8 (2021) 714426.
- [7] T. Sonnweber, P. Grubwieser, S. Sahanic, A.K. Bohm, A. Pizzini, A. Luger, C. Schwabl, S. Koppelstatter, K. Kurz, B. Puchner, B. Sperner-Unterweger, K. Hufner, E. Woll, M. Nairz, G. Widmann, I. Tancevski, J. Loffler-Ragg, G. Weiss, The Impact of Iron Dyshomeostasis and Anaemia on Long-Term Pulmonary Recovery and Persisting Symptom Burden after COVID-19: A Prospective Observational Cohort Study, *Metabolites* 12(6) (2022).
- [8] M. Grau, L. Ibershoff, J. Zacher, J. Bros, F. Tomschi, K.F. Diebold, H.G. Predel, W. Bloch, Even patients with mild COVID-19 symptoms after SARS-CoV-2 infection show prolonged altered red blood cell morphology and rheological parameters, *J Cell Mol Med* 26(10) (2022) 3022-3030.
- [9] **R. Kronstein-Wiedemann**, M. Stadtmuller, S. Traikov, M. Georgi, M. Teichert, H. Yosef, J. Wallenborn, A. Karl, K. Schutze, M. Wagner, A. El-Armouche, T. Tonn, SARS-CoV-2 Infects Red Blood Cell Progenitors and Dysregulates Hemoglobin and Iron Metabolism, *Stem Cell Rev Rep* 18(5) (2022) 1809-1821.
- [10] **R. Kronstein-Wiedemann**, K. Tausche, M. Kolditz, M. Teichert, J. Thiel, D. Koschel, T. Tonn, S.R. Kunzel, Long-COVID is Associated with Impaired Red Blood Cell Function, *Horm Metab Res* 56(4) (2024) 318-323.
- [11] R.K. Ramakrishnan, T. Kashour, Q. Hamid, R. Halwani, I.M. Tleyjeh, Unraveling the Mystery Surrounding Post-Acute Sequelae of COVID-19, *Front Immunol* 12 (2021) 686029.
- [12] B. Diao, C. Wang, Y. Tan, X. Chen, Y. Liu, L. Ning, L. Chen, M. Li, Y. Liu, G. Wang, Z. Yuan, Z. Feng, Y. Zhang, Y. Wu, Y. Chen, Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), *Front Immunol* 11 (2020) 827.
- [13] H.Y. Zheng, M. Zhang, C.X. Yang, N. Zhang, X.C. Wang, X.P. Yang, X.Q. Dong, Y.T. Zheng, Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients, *Cell Mol Immunol* 17(5) (2020) 541-543.
- [14] S.A. Vardhana, J.D. Wolchok, The many faces of the anti-COVID immune response, *J Exp Med* 217(6) (2020).
- [15] M.J. Peluso, T.M. Deveau, S.E. Munter, D. Ryder, A. Buck, G. Beck-Engeser, F. Chan, S. Lu, S.A. Goldberg, R. Hoh, V. Tai, L. Torres, N.S. Iyer, M. Deswal, L.H. Ngo, M. Buitrago, A. Rodriguez, J.Y. Chen, B.C. Yee, A. Chenna, J.W. Winslow, C.J. Petropoulos, A.N. Deitchman, J. Hellmuth, M.A. Spinelli, M.S. Durstenfeld, P.Y. Hsue, J.D. Kelly, J.N. Martin, S.G. Deeks, P.W. Hunt, T.J. Henrich, Chronic viral coinfections differentially affect the likelihood of developing long COVID, *J Clin Invest* 133(3) (2023).
- [16] H. Faisal, S.T. Ali, J. Xu, T. Nisar, M. Sabawi, E. Salazar, F.N. Masud, Carboxyhemoglobinemia in Critically Ill Coronavirus Disease 2019 Patients, *J Clin Med* 10(12) (2021).
- [17] K. Sun, Y. Zhang, A. D'Alessandro, T. Nemkov, A. Song, H. Wu, H. Liu, M. Adebisi, A. Huang, Y.E. Wen, M.V. Bogdanov, A. Vila, J. O'Brien, R.E. Kellems, W. Dowhan, A.W. Subudhi, S. Jameson-Van Houten, C.G. Julian, A.T. Lovering, M. Safo, K.C. Hansen, R.C. Roach, Y. Xia, Sphingosine-1-phosphate promotes erythrocyte glycolysis and oxygen release for adaptation to high-altitude hypoxia, *Nat Commun* 7 (2016) 12086.
- [18] T. Thomas, D. Stefanoni, M. Dzieciatkowska, A. Issaian, T. Nemkov, R.C. Hill, R.O. Francis, K.E. Hudson, P.W. Buehler, J.C. Zimring, E.A. Hod, K.C. Hansen, S.L. Spitalnik, A. D'Alessandro, Evidence for structural protein damage and membrane lipid remodeling in red blood cells from COVID-19 patients, *medRxiv* (2020).

- [19] T. Nemkov, J.A. Reisz, Y. Xia, J.C. Zimring, A. D'Alessandro, Red blood cells as an organ? How deep omics characterization of the most abundant cell in the human body highlights other systemic metabolic functions beyond oxygen transport, *Expert Rev Proteomics* 15(11) (2018) 855-864.
- [20] A.T. Taylor, High-altitude illnesses: physiology, risk factors, prevention, and treatment, *Rambam Maimonides Med J* 2(1) (2011) e0022.
- [21] S. Carlone, P. Serra, M.O. Farber, L. Roberts, F. Manfredi, Red blood cell alkalosis and decreased oxyhemoglobin affinity, *Am J Med Sci* 284(2) (1982) 8-16.
- [22] S. Killip, J.M. Bennett, M.D. Chambers, Iron deficiency anemia, *Am Fam Physician* 75(5) (2007) 671-8.