

In-vitro-Reduktion von Hämoglobin durch Hämotherapie mittels Cytosorb®-Adsorber

Von Kathrin Else Spiegel

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

In-vitro-Reduktion von Hämoglobin durch Hämo-perfusion
mittels Cytosorb[®]-Adsorber

Von Kathrin Else Spiegel

Aus Waldshut-Tiengen

München 2026

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig–Maximilians–Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Priv.–Doz. Dr. René Dörfelt

Mitbetreuung durch: Dr. Florian Sängler, Univ.–Prof. Dr. Katrin Hartmann

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. René Dörfelt

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Alexandra Rieger

Tag der Promotion: 07.02.2026

Meiner Familie und George

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG.....	1
II. LITERATURÜBERSICHT	2
1. Hämoglobin.....	2
1.1. Aufbau und physiologische Funktion von Hämoglobin	2
1.2. Abbau von Hämoglobin	5
1.3. Entstehung von zellfreiem Hämoglobin.....	5
1.4. Toxizität von zellfreiem Hämoglobin	8
2. Extrakorporale Blutreinigungsverfahren	11
2.1. Geschichte und Entwicklung.....	11
2.2. Extrakorporale Blutreinigungsverfahren in der Tiermedizin	12
2.3. Aufbau des extrakorporalen Kreislaufs und Antikoagulation.....	13
2.3.1. Komponenten des extrakorporalen Kreislaufs	13
2.3.2. Antikoagulation.....	13
2.4. Klassifikation der extrakorporalen Blutreinigungsverfahren.....	15
2.5. Hämo-perfusion	16
2.5.1. Hämo-perfusion in der Tiermedizin	17
2.5.2. Verschiedene Adsorber in der Hämo-perfusion	17
2.5.3. Immunadsorption	19
2.5.4. Cytosorb®-Adsorber	20
III. PUBLIKATION: ORIGINALARTIKEL	23
IV. DISKUSSION.....	36
V. ZUSAMMENFASSUNG	48
VI. SUMMARY	50
VII. LITERATURVERZEICHNIS	51
VIII. DANKSAGUNG	65

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ARDS	Acute respiratory distress syndrome, Akutes Atemnotsyndrom
APT	Adenosintriphosphat
aPTT	Aktivierte Thrombinzeit
BAC	Bilirubin Adsorption Column, Bilirubin Adsorptionssäule
cfHb	Zellfreies Hämoglobin
CO ₂	Kohlendioxid
Covid-19	SARS CoV-2 Erkrankung 2019
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECLS	extrakorporale Lebensunterstützung
Fe ²⁺	Zweiwertiges Eisenatom
Fe ³⁺	Dreiwertiges Eisenatom
Hb	Hämoglobin
HIV	Humanes-Immundefizienz-Virus
I.E.	Internationale Einheiten
IL	Interleukin
IMHA	Immunmedierte hämolytische Anämie
LDH	Laktatdehydrogenase
MABF	Microbind Affinity Blood Filter; Microbind-Affinitäts-Blutfilter
MHb	Methämoglobin
NLRP3	Nod-like-Rezeptor-Familienpyrin-Domänen enthaltende 3 Protein
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff Molekül
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PD	Peritonealdialyse
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TPE	Therapeutischer Plasma Austausch
ZVK	Zentraler Venenkatheter

I. EINLEITUNG

Zellfreies Hämoglobin (cfHb) entsteht durch die Lyse von Erythrozyten und kann toxische Wirkungen entfalten, indem es unter anderem zu oxidativem Stress, Entzündungsreaktionen und vaskulärer Dysfunktion führt. Als Folge können Bluthochdruck und Organschäden entstehen (ASCENZI et al., 2005; BORETTI et al., 2009; GLEASON et al., 2019; VALLELIAN et al., 2022). CfHb kann durch verschiedene Faktoren freigesetzt werden, wie etwa Autoimmunerkrankungen, zum Beispiel bei der immunmedierten hämolytischen Anämie (IMHA), aber auch durch Infektionen mit beispielsweise Babesien (GARDEN et al., 2019). Die Hämo-perfusion ist ein Verfahren, bei dem toxische Substanzen durch Adsorption aus dem Blut entfernt werden (SCHWEIGHAUSER & FRANCEY, 2017). In der Humanmedizin wird dieses Verfahren unter anderem zur Behandlung von Vergiftungen angewendet (GRÄFE et al., 2023). Auch in der Veterinärmedizin findet sie zunehmend Anwendung (COWGILL & GUILLAUMIN, 2013; SCHWEIGHAUSER et al., 2017; GROOVER et al., 2022a). Der in dieser Studie eingesetzte Cytosorb[®]-Adsorber besteht aus biokompatiblen Polymerkügelchen, die eine hohe Adsorptionskapazität aufweisen. In der Folge kann eine Vielzahl von Molekülen effektiv aus dem Blutkreislauf entfernt werden (MALARD et al., 2018; HUBER et al., 2019). In der Humanmedizin zeigte der Cytosorb[®]-Adsorber positive Ergebnisse bei der Entfernung von Cytokinen, bei der Behandlung von Sepsis, Trauma und anderen kritischen Zuständen (CALABRO et al., 2019; GLEASON et al., 2019; POLI et al., 2019a; MEHTA et al., 2020; PENG et al., 2022; PIERI et al., 2022). In der Veterinärmedizin befindet sich die Forschung noch in einer frühen Phase, liefert jedoch vielversprechende Resultate in Bezug auf die Behandlung schwerkranker Tiere (MEAGHER et al., 2023; OHREM et al., 2023; SÄNGER et al., 2024). Die vorliegende Studie zielte darauf ab, die in-vitro-Adsorptionskapazität von cfHb aus hämolysiertem Hundeblood mit dem Cytosorb[®]-Adsorber zu evaluieren. Ergebnismäßig positive Ausprägungen könnten folglich als Grundlage für weitere klinische Studien dienen und letztlich zu einer neuen Therapieoption für Hunde mit hohen cfHb-Konzentrationen beitragen. Dies könnte sich positiv auf die Überlebensrate sowie die Lebensqualität auswirken. Die spezifische Anwendung bei Hunden sowie das Entfernen von cfHb sind derzeit jedoch noch nicht umfassend untersucht.

II. LITERATURÜBERSICHT

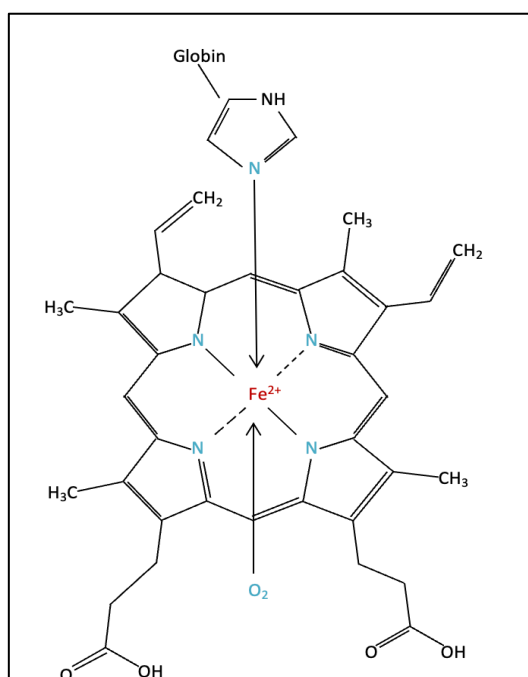
1. Hämoglobin

Der Transport von Sauerstoff (O_2) im Blut ist die Hauptaufgabe der Erythrozyten. Dies erfolgt durch eine reversible Bindung des Sauerstoffs an das Hämoglobin in den Erythrozyten (BREVES et al., 2022).

1.1. Aufbau und physiologische Funktion von Hämoglobin

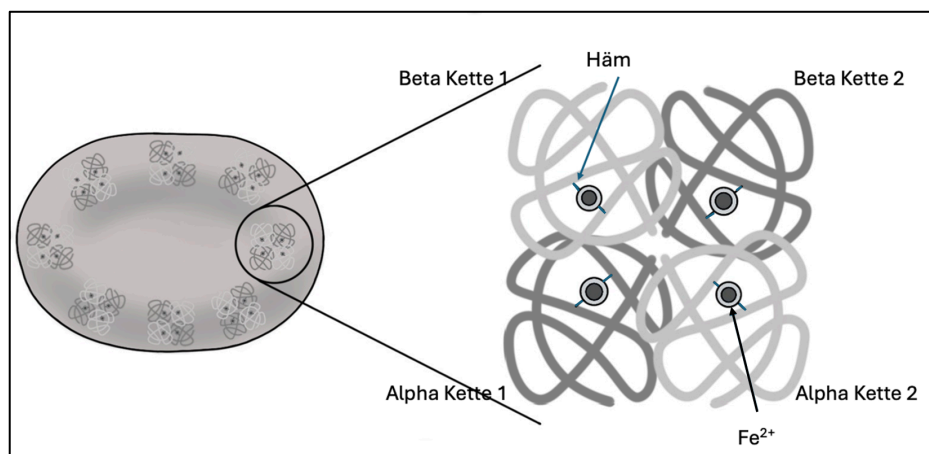
Hämoglobin (Hb) setzt sich aus einer sauerstofftragenden prosthetischen Gruppe (Häm) und einem tierartspezifischen Proteinanteil (Globin) zusammen. Das Häm, welches auch die Ursache für die rote Farbe des Blutes ist, besteht aus einem zweiwertigen zentralen Eisenatom (Fe^{2+}) und vier substituierten Pyrrolringen, die einen Protoporphyrinring um das Eisen bilden. Es sind sechs Koordinationsstellen des zentralen Fe^{2+} zu verzeichnen. Vier werden von dem Protoporphyrinring besetzt, eine von der Seitenkette des Globins und eine kann das Sauerstoffmolekül binden. Die Bindung von Sauerstoff erfolgt mittels einer lockeren, koordinativen Bindung an das Fe^{2+} -Ion (THOMAS & LUMB, 2012).

Abbildung 1: Strukturformel eines Häm-Moleküls: Porphyrinring mit zentral gebundenem Eisen



Hämoglobin ist ein Tetramer, welches sich aus vier Untereinheiten zusammensetzt. Hämoglobin besteht aus 4 Häm-Molekülen, die jeweils zwei Alpha- und Beta-Polypeptidketten enthalten. Demnach kann ein Hämoglobin-Molekül maximal vier Sauerstoffmoleküle reversibel binden und transportieren (RANNEY & SHARMA, 2000; SCHECHTER, 2008; THOMAS & LUMB, 2012; KUES W, 2020; SCHWENDENSCHWEIN I, 2020; BREVES et al., 2022).

Abbildung 2: Quartärstruktur des Hämoglobins und schematische Darstellung von Hämoglobin Molekülen in einem Erythrozyten



Die Bindung von Sauerstoff an das Hämoglobin wird maßgeblich durch die Konformation und die Integrität der umgebenden Polypeptidketten beeinflusst. Nur in Anwesenheit dieser Proteinketten ist das zentrale Eisenatom des Häms in der Lage, Sauerstoff reversibel zu binden. Der resultierende Komplex wird als Oxyhämoglobin bezeichnet, wobei es sich um das Produkt der Oxygenierung handelt. Dabei wird das Eisenatom im zweiwertigen Zustand (Fe^{2+}) erhalten. Demzufolge findet keine Oxidation zu dreiwertigem Eisen (Fe^{3+}) statt, sodass die Sauerstoffbindung am Hämoglobin als physiologische Oxygenierung und nicht als Oxidation zu verstehen ist. Die Transportfähigkeit des Hämoglobins bleibt folglich vollständig erhalten (THOMAS & LUMB, 2012; BREVES et al., 2022).

Es gibt einen signifikanten Unterschied in der Struktur von sauerstofffreiem Hb und zur Gänze oxygeniertem Hb. Die Alpha- und Beta-Dimere liegen bei sauerstofffreiem Hb über Kreuz aufeinander. Der sauerstofffreie Zustand wird als T-Stellung bezeichnet. In dieser ist die Sauerstoffaffinität niedrig. Bei der Oxygenierung ändert sich die innere Struktur der Dimere nur geringfügig. Die Dimere rotieren um ca. 15 Grad relativ zueinander. Bei der Oxygenierung nimmt

es die R-Stellung ein und die Sauerstoffaffinität ist erhöht (RANNEY & SHARMA, 2000; SCHECHTER, 2008; KUES W, 2020).

Die Beladung des Hämoglobins mit Sauerstoff, die Oxygenierung, ist im Wesentlichen von dem Sauerstoff- und CO₂-Partialdruck im Blut abhängig. Zusätzlich sind die Temperatur, der pH-Wert, der Gehalt an 2,3-Biphosphoglycerat und die Anzahl der bereits gebundenen Sauerstoffmoleküle Einflussfaktoren (RANNEY & SHARMA, 2000; KUES, 2020).

Ein niedriger pH-Wert bedingt eine Stabilisierung des Hb in der T-Stellung, was zu einer Reduktion der Sauerstoffaffinität führt. Dies begünstigt die Abgabe von Sauerstoff in den peripheren Geweben. In der Lunge herrscht ein höherer pH-Wert, wodurch die Stabilisierung in der T-Stellung aufgehoben wird. Dies hat eine erhöhte O₂-Affinität des Hbs zur Folge und erleichtert die Aufnahme von O₂ in der Lunge (SCHECHTER, 2008; KUES, 2020).

Bei hohen pCO₂-Werten ist auch eine kovalente Bindung von CO₂ an Hb möglich (KUES, 2020). Dies resultiert in einer verminderten Sauerstoffaffinität des Hbs und einer erleichterten Abgabe von Sauerstoff an stoffwechselaktive Gewebe. In der Lunge findet eine Freisetzung des CO₂ statt, was wiederum die Aufnahme von Sauerstoff erleichtert (SCHECHTER, 2008; KUES, 2020).

2,3-Biphosphoglycerat wirkt synergistisch zu CO₂. Auch das stabilisiert die T-Stellung. Dadurch kommt es wie bereits erwähnt zu einer verminderten Sauerstoffaffinität des Hämoglobins und damit zu einer erleichterten Abgabe des Sauerstoffs (SCHECHTER, 2008; KUES, 2020).

Unter physiologischen Bedingungen wird nur verhältnismäßig wenig Fe²⁺ zu dreiwertigem Eisen (Fe³⁺) oxidiert. Wenn dies dennoch der Fall ist, entsteht Methämoglobin (MHb), welches mit dem Fe³⁺ keinen Sauerstoff an seine Polypeptidketten anlagern kann. Das heißt, es wird inaktiv für den Transport von Sauerstoff (SCHECHTER, 2008; BREVES et al., 2022). Normalerweise wird dann durch das MHb-Reduktase-System Fe³⁺ zu Fe²⁺ reduziert. Es kann jedoch auch durch äußere Faktoren zu einer vermehrten Oxidation kommen. Erwähnenswert sind hier vor allem oxidative Stressoren bei Entzündungen oder Hypoxie, aber auch Chemikalien und Medikamente können dazu beitragen. In diesem Zusammenhang sind insbesondere Lidocain und Sulfonamide zu nennen. Zudem kann dies durch Intoxikationen verstärkt werden, insbesondere durch Nitrit-Vergiftungen beim

Tier (IOLASCON et al., 2021; LUDLOW J. T., 2023). Die Methämoglobinreduktase ist deswegen ein Schlüsselenzym, um das MHB gering zu halten, indem sie das Fe^{3+} -Ion wieder zum Fe^{2+} reduziert. Methämoglobin tritt in physiologischer Menge daher nur zu 1–2 % auf (BREVES et al., 2022).

Hb kommt im Blut in sehr hoher Konzentration in den Erythrozyten vor, es bildet ca. 95 % der Trockensubstanz der Erythrozyten, da eine große Menge freien Hämoglobins zur Erhöhung der Blutviskosität führen würde (KUES, 2020; SCHWENDENSCHWEIN I, 2020; BREVES et al., 2022).

1.2. Abbau von Hämoglobin

Erythrozyten verbleiben ca. 120 Tage in der Blutbahn und werden dann in Leber, Milz oder Knochenmark durch Makrophagen im retikuloendothelialen System eliminiert (PETER WOHLSEIN, 2020).

Direkt in der Blutbahn freigesetztes cfHb bildet mit dem Glykoprotein Haptoglob(ul)in einen Komplex und wird dann in die Leber transportiert, um dort abgebaut zu werden. Die durch den Abbau freigesetzten Häm-Gruppen können nicht wieder verwendet werden. Daher werden die Ringsysteme gespalten und letztendlich zu Bilirubin abgebaut. Die verbleibende Kette mit den vier Pyrrolringen ist dann Biliverdin und verfärbt sich blaugrün. Dies wird dann zu Bilirubin reduziert und hat dann eine orange-gelbliche Farbe. Das Bilirubin wird anschließend in die Galle verbracht und letztendlich über den Darm ausgeschieden. Dabei wird das Fe^{2+} freigesetzt, welches in Zellen an Ferritin gebunden wird und erneut dem Eisenstoffwechsel beigeführt wird (KUES, 2020).

1.3. Entstehung von zellfreiem Hämoglobin

Zellfreies Hämoglobin (cfHb) entsteht im Rahmen einer Hämolyse. Dabei werden Erythrozyten auch intravasal, also direkt in der Blutbahn zerstört und es fällt so viel cfHb an, dass dieses nicht mehr gebunden und abtransportiert werden kann (ANKAWI et al., 2019; VALLELIAN et al., 2022)

Für die Hämolyse gibt es unterschiedliche Ursachen. Zum einen kann diese infektiös bedingt sein. Beim Hund sind als parasitäre Erreger vor allem *Babesia spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Hepatozoon spp.* und *Dirofilaria spp.* zu nennen, als bakterielle Erreger vor allem *Leptospiren* (MACKIN, 2020). Dabei kommt es entweder zu einer direkten Zerstörung der Erythrozyten durch die Parasiten beziehungsweise

Bakterien oder zu einer sekundären, immunmedierten Zerstörung, wodurch cfHb freigesetzt wird. Dies führt zur nächsten möglichen Ursache, den immunmedierten Ursachen. Diese können in assoziiert oder nicht-assoziiert unterteilt werden (GARDEN et al., 2019). Eine nicht assoziierte immunmedierte Hämolyse kann beispielsweise durch eine immunmedierte hämolytische Anämie (IMHA) verursacht werden. Dabei erkennt das eigene Immunsystem fälschlicherweise Erythrozyten als körperfremd und zerstört diese durch die Bindung von Immunglobulinen oder Komplementen an die Erythrozyten-Oberfläche (GARDEN et al., 2019; MACKIN, 2020). Die assoziierte immunmedierte Hämolyse entsteht dagegen durch verschiedene exogene Faktoren, die zu einer immunvermittelten Zerstörung der Erythrozyten führen. Zum einen sind hier bakterielle Erreger zu nennen, wobei beim Hund vor allem die verschiedenen *Leptospiren* erwähnenswert sind, sowie Parasiten wie *Babesia spp.*, *Anaplasma spp.* oder *Ehrlichia spp.* (GARDEN et al., 2019; MACKIN, 2020). In dem Consensus Statement von 2019 werden auch Fälle erwähnt, in denen Medikamente, vor allem Cephalosporine, eine assoziierte IMHA auslösen können. Es fehlen jedoch noch ausführliche Studien zu diesem Thema (GARDEN et al., 2019).

Es gibt jedoch auch andere Noxen, die beim Hund zur Zerstörung von Erythrozyten und somit zur Freisetzung von cfHb führen können. Zu den potenziellen Wirkstoffen zählen, wie bereits erwähnt, unter anderem Arzneimittel, die eine medikamentenassoziierte hämolytische Anämie auslösen können. Dies ist aber verhältnismäßig selten und auch hier ist die Evidenzlage noch gering, es sind aber vor allem verschiedene Antibiotika erwähnt (GARRATTY, 2010; GARDEN et al., 2019). Hierbei sind verschiedene Wirkmechanismen beteiligt. Zum einen können sie arzneimittel-antikörperabhängig sein oder auch durch Autoantikörper, die eventuell durch das Medikament induziert werden, entstehen. Zudem können Hapten-Mechanismen auftreten, bei denen das Medikament sich dann an Erythrozyten anheftet und dann durch Antikörper erkannt und zerstört wird (GARRATTY, 2010). Weitere nennenswerte Noxen sind Ethylenglykol, das eine vergleichbare toxische Wirkung aufweist wie Zwiebeln, Knoblauch, Schlangengift und auch Schwermetallintoxikationen. Zur Hämolyse kommt es hierbei durch oxidative Schäden an den Erythrozyten. Diese oxidativen Prozesse destabilisieren die Zellmembranen der Erythrozyten, was zur Zerstörung der Erythrozyten führt (SCHWEIGHAUSER & FRANCEY, 2016; MACKIN, 2020). Schlangengifte

hingegen, insbesondere solche, die Phospholipasen enthalten, greifen direkt die Phospholipide der Zellmembranen an. Dies hat eine Destabilisierung der Zellmembranen zur Folge und führt zur Hämolyse (CONDREA, 1979; SLAGBOOM et al., 2017). CfHb kann auch im Rahmen eines paraneoplastischen Prozesses, beispielsweise bei einer Leukämie oder einem Hämangiosarkom, freigesetzt werden. Dieser Prozess wird durch die Zerstörung von Erythrozyten verursacht (GARDEN et al., 2019). Allerdings kann sich auch durch eine Sepsis und disseminierte intravasale Gerinnung (BOTTARI et al.) eine hochgradige Hämolyse entwickeln (BOTTARI et al., 2023). Dieser Prozess wird durch die Bildung von Mikrothromben in den Blutgefäßen verursacht. Diese zerstören die Erythrozyten durch mechanische Schädigung. Zusätzlich tragen die systemische Entzündungsreaktion und die freigesetzten toxischen Substanzen zur Schädigung der Erythrozyten bei und können auch eine assoziierte IMHA auslösen (LEVI & VAN DER POLL, 2004; GARDEN et al., 2019).

Bei extremer Hitze, zum Beispiel bei einem Hitzschlag, können die Zellmembranen der Erythrozyten geschädigt werden. Dies kann zur Zerstörung der Erythrozyten und in der Folge zu einer Hämolyse führen. Darüber hinaus kann eine erhöhte Hitzebelastung eine Schädigung des Endothels und eine Aktivierung des Gerinnungssystems verursachen. Dies führt zur Bildung von Mikrothromben und zu mechanischen Schäden an den Erythrozyten (BOUCHAMA & KNOCHEL, 2002). Eine weitere nennenswerte Ursache ist die Hypophosphatämie. Diese beeinträchtigt die Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) in den Erythrozyten. ATP ist der universelle Energieträger biologischer Systeme (WIEDER & LANG, 2010). Dies resultiert in einer eingeschränkten Energieversorgung der Zellen und einer Destabilisierung der Membranen der Erythrozyten, was wiederum eine Hämolyse begünstigen kann. Die Instabilität der Erythrozyten erhöht ihre Anfälligkeit für mechanische und oxidative Schäden. Dies hat eine verstärkte Zerstörung zur Folge (MILLER & SLOVIS, 2000).

Tabelle 1: Auflistung verschiedener Ursachen für eine Hämolyse mit Beispielen (GARDEN et al., 2019; MACKIN, 2020)

Ursachen	Beispiele
Infektiös	<i>Leptospirose</i>
	<i>Babesiose</i>
Immunmediert: Nicht assoziiert (idiopathisch)	IMHA
Immunmediert: Assoziiert (Auslöser vorhanden)	<i>Leptospirose</i>
	<i>Babesiose.</i>
	<i>Ehrlichiose</i>
	<i>Anaplasmosen</i>
	<i>Hepatozoonose</i>
	<i>Dirofilariose</i>
Toxisch	<i>Leishmaniose</i>
	Knoblauch
	Schlangengifte
	Ethylenglykol
	Schwermetalle
Physikalische Schädigung	Zwiebeln
	mechanisch
Metabolisch	thermisch
	Hypophosphatämie
paraneoplastisch	Leukämie
	Hämangiosarkom

1.4. Toxizität von zellfreiem Hämoglobin

CfHb kann auf verschiedene Weisen toxisch für den Körper werden. Zum einen hat sich cfHb als verstärkend für die Aktivierung und Infiltration von Phagozyten erwiesen. Eine Studie bei Meerschweinchen hat gezeigt, dass es in der Folge zu Myokardverletzungen mit Endotoxämie führen kann (BAEK et al., 2014). Des Weiteren erhöht es die Eisenablagerung im Myokard und eine erhöhte Expression

von Häm-Oxygenase-1. Durch Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) kommt es zu oxidativen Desoxyribonucleinsäure (DNA)-Schäden und Apoptose. Darüber hinaus wurden in Studien an Meerschweinchen und Hunden eine Störung der Integrität der endothelialen Barriere sowie eine Verringerung des intrazellulären Ascorbat-Gehalts beobachtet. Die endotheliale Barriere übernimmt eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der vaskulären Hämostase und reguliert den kontrollierten Austausch verschiedener Substanzen und Moleküle zwischen Blut und Gewebe. Eine Störung dessen kann Ödeme, Entzündungen, Thrombose bis hin zu Gewebeschäden und auch Organversagen hervorrufen. Ascorbat ist insofern relevant, da es ein starkes Antioxidans ist und auch die Bildung von Methämoglobin verringern kann, wodurch unter anderem die Sauerstofftransportkapazität reduziert werden kann (BAEK et al., 2014; SCHIEBER & CHANDEL, 2014; KUCK et al., 2018).

Darüber hinaus kann es zu sauerstoffbezogener Toxizität kommen, da cfHb in den Geweben zu einem unphysiologisch hohen Sauerstoffvorkommen führt. Eine physiologische Schutzreaktion darauf ist die Vasokonstriktion, was wiederum zu Hypertension und Ischämie führt (BORETTI et al., 2009; WINSLOW, 2013; SCHIEBER & CHANDEL, 2014). Die Folgen der oxidativen Toxizität können bis hin zu Endorganversagen führen, wie zum Beispiel zu akutem Nierenversagen mit Zerstörung der proximalen Tubuli (OLSSON et al., 2012; DEUEL et al., 2016; KUCK et al., 2018; SHAVER et al., 2019). Ein weiterer Weg, der zur Schädigung von Endorganen und auch akuten Nierenschädigungen führt, ist die Ablagerung von Hämoglobinkonglomeraten. Diese können eine Deregulierung der Tubulusbarriere auslösen. Hämopexin, ein Häm-Fänger, sammelt Hämoglobin an, das dann im distalen Nephronsegment ausfällt. Die Ausfällungen bilden intratubuläre obstruktive Konglomerate und können in der Folge zu einem akuten Nierenversagen führen (OLSSON et al., 2012; DEUEL et al., 2016; SHAVER et al., 2017; SHAVER et al., 2019). Häm, das Abbauprodukt von Hb, ist in der Lage, die Bildung freier Radikale zu katalysieren, da es die Produktion von freiem NO ermöglicht. Häm ist zudem eine bedeutende Eisenquelle für pathogene Organismen wie gramnegative Bakterien. Diese sind in der Lage, das Häm gebundene Eisen durch Sekretion eines Häm-Eisen-Liganden zu binden. Dieser Ligand trennt das Eisen vom Häm und transportiert es in die Bakterien. Es ist auch eine Quelle für freies Eisen, was eine Verschlimmerung der Eisentoxizität in verschiedenen

Organen bedingt (ASCENZI et al., 2005).

Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass hohe Konzentrationen von cfHb, durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen, als endogener Mediator für eine erhöhte Sterblichkeit bei Sepsis, systemischen Entzündungen sowie Lungenentzündungen und auch endotheliale Verletzungen verantwortlich sind. Dieser Effekt beruht auf der Erhöhung der endothelialen Permeabilität durch Apoptose. Dies wurde unter anderem in Mäusen nachgewiesen (BAEK et al., 2014; KUCK et al., 2018; MEEGAN et al., 2020).

Erhöhte Spiegel von cfHb, erneut vor allem durch die Bildung von ROS, können zudem die vaskuläre Permeabilität und die Permeabilität von mikrovaskulären Endothelzellen in isoliert perfundierten menschlichen Lungen erhöhen. In der Folge kann dies zu einem nicht-kardiogenen Lungenödem und akutem Atemnotsyndrom (ARDS) führen. Erhöhte cfHb-Konzentrationen können Entzündungen der Atemwege und eine Dysfunktion der alveolokapillären Barriere induzieren. Daher korrelieren hohe Spiegel von cfHb (bis zu 250 mg/dl) in Ödem-Flüssigkeit der Lungen auch nachweislich mit schwerem akutem Lungenversagen und ARDS bei Menschen. Grund dafür ist, dass sie induziert (SCHIEBER & CHANDEL, 2014; KUCK et al., 2018; MEEGAN et al., 2020).

Es konnte in Studien bei Menschen gezeigt werden, dass cfHb einen Einfluss auf den Stickstoffmonoxid (NO) Haushalt hat. NO spielt eine grundlegende Rolle in der Aufrechterhaltung eines normalen vasomotorischen Tonus. Das cfHb weist die Fähigkeit auf, vom Endothel stammendes NO sechshundertmal schneller abzufangen als Hb. Dies führt zu einer Störung der NO-Homöostase und kann zu verschiedenen pathologischen Konsequenzen führen, wie beispielsweise Vasokonstriktion, vermindertem Blutfluss, Thrombozyten-Aktivierung, erhöhter Endothelin-1-Expression und Endorganschäden. Es konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden, dass sowohl das Hämoglobin (Hb) als auch die Erythrozyten nicht nur als NO-Fänger bei der physiologischen Regulierung der NO-abhängigen Vasodilatation eine Rolle spielen, sondern auch die Fähigkeit besitzen, NO abzugeben, wenn das Hb desoxygeniert ist. Eine empirische Untersuchung kommt zu dem Schluss, dass eine Reduktion von desoxygeniertem Hämoglobin (Hb) zu Nitrit (NO) und in der Folge zu einer Gefäßerweiterung entlang des physiologischen Sauerstoffgradienten führt (GLADWIN et al., 2004).

CfHb stimuliert zudem das Nod-like-Rezeptor-Familienpyrin-Domänen enthaltende 3 Protein (NLRP3), ein zytoplasmatisches Protein. Dies ist ein Inflammasom in Makrophagen. Es führt zu einer erhöhten Lungenapoptose, Ödembildung und Entzündungsreaktion in der Lunge (MEEGAN et al., 2020).

2. Extrakorporale Blutreinigungsverfahren

Extrakorporale Blutreinigungsverfahren sind in der Lage, endogene und exogene Giftstoffe zu eliminieren, wenn körpereigene Prozesse nicht mehr ausreichend sind. Sie stellen damit eine wichtige therapeutische Option dar, um Endorganschäden zu verhindern und den Verlauf schwerer Krankheitsbilder günstig zu beeinflussen (VIENKEN, 2011).

2.1. Geschichte und Entwicklung

Der Ursprung der extrakorporalen Blutreinigungsverfahren begann 1854 durch den schottischen Chemiker Thomas Graham. Er demonstrierte, dass eine Diffusion von Molekülen durch semipermeable Membranen möglich ist. Diese Erkenntnis wurde zur späteren Grundlage für die Dialysetechnologie (WETZELS et al., 1986). John Jacob Abel begann, basierend auf der Grundlage des Chemikers Thomas Graham, einen Dialyseapparat zu entwickeln. In einem Artikel, der in der Londoner Times am 11.08.1913 erschien, bezeichnete er den Apparat selbst als künstliche Niere. Daher wird er gemeinhin als Erfinder der Dialyse bezeichnet, obwohl er damit keine Nierenerkrankungen behandeln, sondern künstlichen Urin produzieren wollte. Der deutsche Arzt Georg Haas führte 1913 die erste erfolgreiche Dialyse am Tier und dann am Menschen durch, indem er eine experimentelle Dialysemaschine verwendete. Es handelte sich um den ersten reproduzierbaren Dialyseapparat, den Vividdiffusionsapparat (ABEL et al., 1990; VIENKEN, 2011, 2017). Dieser hatte viele Ähnlichkeiten mit den heute üblichen Kapillardialysatoren. Das Gerät bestand aus einem Hohlzylinder, in dem das einströmende Blut über einen Kopf mit acht beziehungsweise 32 gläsernen Verteilungsröhrchen durch etwa 20 Zentimeter lange Membranschläuche aus Collodium strömte. Diese wurde dann wieder zusammengeführt (VIENKEN, 2011, 2017). Im Jahr 1943 gelang dem niederländischen Arzt Willem Kolff die Entwicklung des ersten funktionstüchtigen Dialyseapparats. Dieser wurde als rotierender Trommeldialysator bezeichnet und verwendete Zellophan-Dialyseschläuche als Membran (VIENKEN, 2011). In den 1950ern wurde das Design Kolffs von zahlreichen Forschern weiterentwickelt. Es

wurden tragbare und effizientere Dialysemaschinen entwickelt. Baxter International war einer der ersten Hersteller von kommerziellen Dialysemaschinen. Die Einführung des „Scribner-Shunts“ in den 1960ern durch Belding Scribner ermöglichte die Langzeit-Hämodialyse. Diese Methode erlaubte es den Patienten, regelmäßig dialysiert zu werden, ohne dass jedes Mal eine neue Venenpunktion notwendig war. Die Peritonealdialyse (PD) wurde als Alternative zur Hämodialyse in den 1970ern entwickelt. PD nutzt das Peritoneum als semipermeable Membran, um Abfallstoffe und überschüssiges Wasser aus dem Blut zu entfernen. Baxter International übernahm eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung und Vermarktung von PD-Produkten. In den 1980er und 1990er Jahren wurden signifikante Fortschritte in der Dialysetechnologie erzielt, welche die Entwicklung verbesserter Dialysatoren, Maschinen und Dialyselösungen umfassten. Die Verwendung von biokompatiblen Materialien und optimierten Membranen resultierte in einer Effektivitäts- und Schonungssteigerung der Dialysebehandlungen (VIENKEN, 2011, 2017).

Zusätzlich zur kontinuierlichen Weiterentwicklung der Dialyse wurden weitere extrakorporale Blutreinigungsverfahren entwickelt. Dabei gibt es verschiedene Ansätze bei den extrakorporalen Blutreinigungsverfahren, aber auch gewisse Übereinstimmungen. Das Ziel dieser Verfahren bestand und besteht in der Reinigung des Blutes von verschiedenen Giftstoffen. Dabei variieren die Wirkmechanismen der eingesetzten Verfahren jedoch erheblich (GROOVER et al., 2022b).

2.2. Extrakorporale Blutreinigungsverfahren in der Tiermedizin

Extrakorporale Blutreinigungsverfahren wurden zwar experimentell schon am Anfang des letzten Jahrhunderts bei Tieren eingesetzt, fanden allerdings erst in den 1990er-Jahren eine klinische Relevanz in der Tiermedizin. Im Unterschied zur Humanmedizin liegt der Fokus hier auf Kurzzeittherapien wie beispielsweise der Hämodialyse bei akutem Nierenversagen. Auch für schwere Intoxikationen werden die extrakorporalen Blutreinigungsverfahren zunehmend eingesetzt, um gezielt die Giftstoffe zu eliminieren (GROOVER et al., 2022a). Eine Langzeittherapie, wie sie in der Humanmedizin bei einem chronischen Nierenversagen praktiziert wird, ist aufgrund des Aufwandes und der Kosten für den Tierbesitzer in den meisten Fällen nicht realisierbar (SCHWEIGHAUSER & FRANCEY, 2017).

2.3. Aufbau des extrakorporalen Kreislaufs und Antikoagulation

2.3.1. Komponenten des extrakorporalen Kreislaufs

Extrakorporale Blutreinigungsverfahren basieren auf einem geschlossenen extrakorporalen Zirkulationskreislauf, der das Blut des Patienten außerhalb des Körpers durch eine spezialisierte Filter- oder Adsorptionseinheit leitet und anschließend in den Blutkreislauf des Patienten zurückführt. Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Behandlung ist die Anlage eines adäquaten Gefäßzugangs. In der Tiermedizin wird hierfür in der Regel ein großlumiger zentralvenöser Katheter (ZVK) in die *Vena jugularis* des Tieres implantiert. Vor Beginn der Therapie ist eine sorgfältige Vorbereitung des extrakorporalen Systems erforderlich. Hierzu zählt das Spülen des gesamten extrakorporalen Kreislaufs inklusive der Schlauchsysteme mit isotoner Kochsalzlösung, um die Luft aus dem System zu entfernen, das Risiko von Gerinnungsreaktionen zu reduzieren und somit eine reibungslose Zirkulation zu gewährleisten. Der Blutfluss wird durch ein Pumpensystem, gewährleistet, das entweder auf dem Prinzip peristaltischer Rollenpumpen beruht und einen konstanten sowie kontrollierten Blutfluss sicherstellt. Nachgeschaltet befindet sich die eigentliche Blutreinigungseinheit, die – je nach gewähltem Verfahren – für die Elimination toxischer Substanzen zuständig ist. Hämoperfusionssysteme können zudem mit anderen extrakorporalen Verfahren kombiniert werden, um die Effizienz der Giftstoffe- oder Metaboliten-Elimination zu optimieren. Nach Abschluss der adäquaten Vorbereitung erfolgt die Verbindung des Systems mit dem Patienten. Moderne Geräte sind mit komplexen Systemen zur Gewährleistung der Sicherheit sowie zur Messung und Überwachung verschiedener physikalischer Größen ausgestattet. Zu den zentralen Parametern, die kontinuierlich überwacht werden, zählen der intraluminalen Druck, der Blutfluss sowie die Detektion von Luftblasen. Parallel dazu ist eine engmaschige Überwachung physiologischer Parameter wie Blutdruck, Körpertemperatur und Gerinnungsstatus des Patienten erforderlich, um die Therapie sicher und effektiv zu gestalten (COWGILL & GUILLAUMIN, 2013; SCHWEIGHAUSER et al., 2017).

2.3.2. Antikoagulation

Im Kontext extrakorporaler Blutkreisläufe ist die Antikoagulation von entscheidender Bedeutung, um eine Gerinnung des Blutes während des Aufenthalts im extrakorporalen System zu verhindern. Ein signifikantes Risiko bei

extrakorporalen Blutreinigungsverfahren ist die Thrombosierung in den Schlauchsystemen des extrakorporalen Kreislaufs (SEELIGER et al., 2020). Das Blut fließt mehrere Minuten außerhalb des Körpers durch das Schlauchsystem, was die Aktivierung des Gerinnungssystems anregt. Deshalb sind Antikoagulanzen erforderlich. Wichtig zu erwähnen ist, dass die Antikoagulation bereits zu Behandlungsbeginn wirksam sein muss (SCHWEIGHAUSER et al., 2017).

Grundsätzlich existieren zwei Möglichkeiten, die Antikoagulation durchzuführen. Die erste Möglichkeit besteht in einer systemischen Antikoagulation mittels Heparin. Die initiale Verabreichung erfolgt als intravenöser Bolus und wird anschließend als Dauertropfinfusion, während der Behandlung, fortgeführt. Im Rahmen der Behandlung ist eine regelmäßige Kontrolle der Gerinnungszeiten erforderlich. Ziel ist hierbei eine Verlängerung der aktivierten Thromboplastinzeit (aPTT) um das Eineinhalb- bis Zweifache. Dieses Zielintervall gewährleistet eine ausreichende antikoagulatorische Wirkung zur Vermeidung thromboembolischer Komplikationen, ohne dabei das Risiko schwerwiegender Blutungen unverhältnismäßig zu erhöhen (ACIERNO & LABATO, 2011; SCHWEIGHAUSER & FRANCEY, 2017). Der Nachteil dieser Methode ist, dass der Patient auch mehrere Stunden nach der extrakorporalen Behandlung noch antikoaguliert ist. Dies kann zu einer Verschlimmerung von Blutungen führen. Zudem besteht die Möglichkeit, dass neue, auch kleine, Läsionen, beispielsweise durch das Legen eines Venenkatheters oder einer Zystozentese, letal verlaufen können (SCHWEIGHAUSER et al., 2017).

Die zweite Möglichkeit besteht in einer regionalen Antikoagulation mit Zitrat. Dieses wird ausschließlich dem extrakorporalen Blutkreislauf zugesetzt. In der Folge wird das im Blut befindliche Kalzium gebunden und steht dem Gerinnungssystem nicht zur Verfügung. In diesem Kontext ist es von signifikanter Relevanz, dass das gebundene Kalzium ersetzt wird. Dieser Prozess findet unmittelbar, bevor das Blut wieder in den Körper zurückfließt, statt. Eine Hypokalzämie stellt einen potenziell lebensgefährlichen Zustand dar, da Kalzium eine zentrale Rolle in der neuromuskulären Erregungsübertragung, der myokardialen Erregungsleitung und der Kontraktilität sowie als Kofaktor in der plasmatischen Gerinnung einnimmt. Ein Absinken der Kalziumkonzentration kann daher zu Muskelkrämpfen, Krampfanfällen, schweren kardialen Arrhythmien bis hin zum Herzstillstand sowie zu Störungen der Hämostase führen (LANG, 2019).

Deswegen muss dies engmaschig überwacht werden (SCHWEIGHAUSER et al., 2017; FRANCEY & SCHWEIGHAUSER, 2018).

2.4. Klassifikation der extrakorporalen Blutreinigungsverfahren

Extrakorporale Blutreinigungsverfahren können nach verschiedenen Kriterien unterschieden werden. Zum einen unterscheidet man kontinuierliche von intermittierenden Verfahren. Es wird aber auch nach dem physikalischen Wirkprinzip unterschieden. Hierbei kann man zwischen Dialyse (Diffusion), Filtration (Konvektion) und Perfusion (Adsorption) unterscheiden. Außerdem gibt es noch den therapeutischen Plasmaaustausch (TPE) sowie Mischformen der eben aufgeführten Varianten (STUMMVOLL, 1993; SCHWEIGHAUSER et al., 2017).

Die Hämodialyse stellt das wohl bekannteste extrakorporale Blutreinigungsverfahren dar. Dieses Verfahren basiert auf einer membranbasierten Separation, also Diffusion. Im Dialysator wird das Blut entlang einer semipermeablen Membran geleitet, während auf der Gegenseite ein Dialysat (Dialyselösung) strömt. Der Konzentrationsgradient zwischen beiden ermöglicht die Diffusion von harnpflichtigen Substanzen wie Harnstoff und Kreatinin aus dem Blut in das Dialysat, welches kontinuierlich erneuert wird (BLOOM & LABATO, 2011; SCHWEIGHAUSER et al., 2017). Darüber hinaus werden durch Osmose eine Ultrafiltration sowie eine Volumenregulation induziert, wobei überschüssiges Wasser durch ein transmembranöses Druckgefälle eliminiert wird. Dies ist dann die Konvektion. Dadurch ist eine Ultrafiltration möglich und eine Stabilisierung des Volumenhaushaltes kann erreicht werden. In der Humanmedizin wird die Hämodialyse bei einem chronischen Nierenversagen regelmäßig, das heißt bis zu dreimal die Woche, eingesetzt. Zudem wird sie auch bei akuten Nierenschädigungen sowie bei Elektrolytstörungen und Intoxikationen mit beispielsweise Methanol oder Lithium eingesetzt (WIZEMANN, 1993; LONNEMANN, 2007).

Ein alternativer Ansatz dazu ist die therapeutische Plasmapherese (TPE), bei der eine Separation der Blutzellen und des Plasmas erfolgt, um das Plasma anschließend zu reinigen oder teilweise auszutauschen (PATTEN & BERKMAN, 1986; CRUMP & SESHADRI, 2009). Indikationen hierfür sind vor allem Immunerkrankungen, wie zum Beispiel Myasthenia gravis, eine IMHA oder auch ein Hyperviskositätsyndrom, wie es unter anderem bei Leishmaniose auftreten

kann. Des Weiteren werden proteingebundene Giftstoffe wie beispielsweise Fliegenpilzintoxikationen als Indikationen angesehen, da diese auch im Plasma vorliegen (SCHUTT et al., 2012; SCHWEIGHAUSER et al., 2017).

2.5. Hämo-perfusion

Eine andere Funktionsweise liegt bei der Hämo-perfusion vor. Hierbei werden Adsorber verwendet, die Giftstoffe aus dem Vollblut adsorbieren. Daher wird die Hämo-perfusion teils auch Hämo-adsorption genannt. Das Prinzip basiert auf dem direkten Kontakt mit den Adsorptionsmitteln anstelle des Auftrennens von Blut. Dieses Adsorptionsmittel ist dazu fähig, gelöste Stoffe oder Giftstoffe mit einer spezifischen chemischen Zusammensetzung im Blutkreislauf entweder selektiv oder nicht selektiv zu binden. Die Hämo-perfusion wird vor allem zur Beseitigung von hochmolekularen, proteingebundenen oder auch lipidlöslichen Giftstoffen sowie Arzneimitteln eingesetzt, die durch eine Hämodialyse oder Hämo-filtration, also Diffusion und Konvektion, nur mäßig oder gar nicht entfernt werden können (COWGILL & GUILLAUMIN, 2013; RONCO & BELLOMO, 2022).

Hämo-perfusion–Adsorbenzien sollten eine hohe Adsorptionskapazität für die Ziellösungsstoffe aufweisen und zudem nicht toxisch und hämo-kompatibel sein. Darüber hinaus sollten sie, auch im Kontakt mit Vollblut, nur eine minimale Adsorption für physiologische Blutkomponenten aufweisen und nicht kanzerogen sein sowie eine stabile Zusammensetzung aufweisen (COWGILL & GUILLAUMIN, 2013). Zudem sind weitere wichtige Eigenschaften, dass sie einen geringen Totraum aufweisen, um Koagelbildung zu vermeiden, eine geringe Blutflussresistenz aufzeigen, mit einem kleinen Blutvolumen funktionieren und eine adäquate Größe haben. Auch chemische und thermische Stabilität sind zu berücksichtigen (GRÄFE et al., 2023).

Die verschiedenen Adsorber ähneln sich in ihrem Aufbau. Essenziell dabei ist, dass sie eine große Oberfläche im Verhältnis zu ihrem Volumen haben und eine große Kapazität aufweisen, bestimmte Moleküle zu binden. Dabei werden beispielsweise schwache Ionen-Verbindungen, aber auch Van-der-Waals-Kräfte und stark hydrophobe Verbindungen genutzt. Das Adsorbermaterial ist als Granula, Perlen oder aber auch Fasern erhältlich. Diese müssen dann in Kartuschen so eingebaut werden, dass ein Blutfluss hindurch noch möglich ist (RONCO & TETTA, 2007).

Lange Zeit wurden Aktivkohle-Adsorber benutzt, wobei jedoch ein selektives

Herausfiltern nicht möglich war und die Patienten dadurch teilweise Panzytopenien, also einen Mangel an Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten, entwickelt haben. Daher wird das Blut heute durch beispielsweise eine vorangegangene Plasmaseparation oft so aufgetrennt, dass die Blutzellen gar nicht mehr in Kontakt mit den Adsorbern kommen. Alternativ wird der Adsorber durch verschiedene biomechanische Mechanismen so optimiert, dass nur eine festgelegte Menge der gewünschten Zielsubstanz entfernt wird (RONCO & TETTA, 2007; COWGILL & GUILLAUMIN, 2013). Im Allgemeinen besteht die Möglichkeit, die Hämo-perfusion mit alternativen extrakorporalen Blutreinigungsverfahren, wie etwa der Hämodialyse oder der Hämo-filtration, zu kombinieren (RONCO & TETTA, 2007; COWGILL & GUILLAUMIN, 2013).

2.5.1. Hämo-perfusion in der Tiermedizin

Hämo-perfusion ist auch in der Tiermedizin ein wichtiges Verfahren zur Behandlung von akuten Vergiftungen bei Tieren. Die Hämo-perfusion kann auch beim Tier endogene sowie exogene Giftstoffe und Substanzen eliminieren (COWGILL & GUILLAUMIN, 2013). Akute exogene Vergiftungen können zum Beispiel durch Medikamentenüberdosierungen auftreten. Ursache hierfür kann die akzidentelle Aufnahme von Humanarzneimitteln wie Schmerzmitteln, Herzmedikamenten oder Antidepressiva sein, aber auch Vergiftungen mit Tierarzneimitteln kommen immer wieder vor. Die Hämo-perfusion kann helfen, diese Medikamente aus dem Blut des Tieres zu entfernen und die Toxizität zu reduzieren (COWGILL & GUILLAUMIN, 2013; SCHWEIGHAUSER et al., 2017). Weitere exogene Giftstoffe sind beispielsweise toxische Pflanzen, Chemikalien oder Schadstoffe wie Reinigungsmittel, Pestizide oder Schwermetalle, die zu Vergiftungen führen können (SCHWEIGHAUSER et al., 2017). Aber die Hämo-perfusion kann auch dazu eingesetzt werden, um endogene Giftstoffe aus dem Körper zu eliminieren. Beispiele hierfür sind große Mengen an Bilirubin, Myoglobin oder zellfreiem Hämoglobin (COWGILL & GUILLAUMIN, 2013; SCHWEIGHAUSER et al., 2017; GLEASON et al., 2019).

2.5.2. Verschiedene Adsorber in der Hämo-perfusion

Bei der Hämo-perfusion werden verschiedene Absorber verwendet, um Giftstoffe aus dem Blut zu entfernen.

Zuerst ist der Adsorber aus Aktivkohle zu nennen, der bereits oben erwähnt wurde.

Aktivkohle ist ein poröses Material mit einer großen Oberfläche, das eine effektive Adsorption von Giftstoffen ermöglicht. Der Aktivkohle-Adsorber wurde häufig zur Entfernung von lipophilen (fettlöslichen) Substanzen wie Phenolen und Barbituraten verwendet. Hier muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich um eine nicht-selektive Adsorption handelt. Das heißt, auch essenzielle Moleküle wie zum einen Erythrozyten und Leukozyten sowie Thrombozyten, aber auch Vitamine und Elektrolyte, werden ungefiltert aus dem Blut adsorbiert. Dies führt oft zu unerwünschten Nebenwirkungen (COWGILL & GUILLAUMIN, 2013; SCHWEIGHAUSER et al., 2017).

Als Nächstes sind selektive Adsorber zu nennen. Diese bestehen aus speziell entwickelten Materialien, die bestimmte Giftstoffe selektiv binden und entfernen können, ohne andere nützliche Substanzen im Blut zu beeinträchtigen (SCHWEIGHAUSER & FRANCEY, 2017).

Ein Beispiel hierfür ist Toraymyxin[®], der Firma Toray[®] zur Endotoxinentfernung bei Patienten mit gramnegativer Sepsis. Es besteht aus Polystyrol und Polypropylenfasern, an die kovalent Polymyxin B gebunden ist. Dieses wiederum kann die Endotoxine binden und dadurch dauerhaft aus dem Blut entfernen (SHIMOKAWA et al., 2013; SEELIGER et al., 2020; GRÄFE et al., 2023).

Ein weiteres Beispiel sind Resinsäuren, die in der Bilirubin Adsorption Column (BAC) Adsorbern eingesetzt werden. Dieser ist darauf spezialisiert, Bilirubin aus dem Blut zu adsorbieren (HAWCHAR et al., 2022). Der BAC besteht aus einem speziellen Harz, das Bilirubin selektiv bindet und aus dem Blutstrom entfernt, während andere Blutbestandteile, wie Zellen und auch Proteine, unbeeinflusst bleiben. Die Verwendung von selektiven Adsorbern wie dem BAC erfordert eine genaue Dosierung und Überwachung, um sicherzustellen, dass sie effektiv und sicher angewendet werden. Diese Technologie ist ein Beispiel dafür, wie selektive Adsorber in der Hämotherapie eingesetzt werden können, um spezifische Giftstoffe oder Substanzen gezielt aus dem Blut zu entfernen, ohne andere wichtige Blutbestandteile zu beeinträchtigen (TAKENAKA, 1998; NAKAJI & HAYASHI, 2003).

Der SERAPH 100[®]-Adsorber hat einen anderen Ansatz. Er ist ein biometrischer Pathogen-adsorber, der zur Entfernung von Viren, Bakterien und anderen

pathogenen Partikeln aus dem Blut verwendet wird. Er basiert auf der Microbind Affinity Blood Filter® (MABF)-Technologie. Die MABF®-Technologie nutzt speziell entwickelte Liganden, die auf der Oberfläche des Adsorbers immobilisiert sind. Diese Liganden haben eine hohe Affinität für bestimmte Zielmoleküle, wie zum Beispiel virale Partikel, bakterielle Toxine oder inflammatorische Botenstoffe. Wenn das Blut durch den SERAPH 100®-Adsorber geleitet wird, binden diese Liganden selektiv die Zielmoleküle an ihre Oberfläche, wodurch sie aus dem Blut entfernt werden. Der SERAPH 100®-Adsorber ist so konzipiert, dass er eine breite Palette von pathogenen Partikeln entfernen kann, einschließlich Viren wie das Humanes-Immundefizienz-Virus (HIV), Hepatitis-C-Virus und Influenzaviren sowie Bakterien und bestimmter inflammatorischer Botenstoffe. Es ist wichtig zu beachten, dass der SERAPH 100®-Adsorber nur als Ergänzung zur Standardtherapie eingesetzt wird und nicht als Ersatz. Er wird in der Regel in klinischen Situationen verwendet, in denen eine schnelle und effektive Entfernung von pathogenen Partikeln aus dem Blut erforderlich ist, wie z.B. bei schweren Infektionen oder bei Patienten mit Sepsis (OLSON et al., 2020; EDEN et al., 2022; BECKER et al., 2023).

2.5.3. Immunadsorption

Zusätzlich ist noch die Immunadsorption als ein Verfahren der Hämo-perfusion zu nennen. Die Immunadsorption bezeichnet ein Verfahren, bei dem spezifische schädliche Substanzen oder Moleküle aus dem Blut entfernt werden, indem sie gezielt an spezifische Liganden oder Adsorptionsmaterialien gebunden werden. Diese Liganden oder Adsorptionsmaterialien haben eine hohe Affinität für die zu entfernenden Substanzen und können selektiv mit ihnen interagieren. Die Immunadsorption wird häufig in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt, bei denen das Immunsystem körpereigene Zellen attackiert. Ein Beispiel hierfür ist die immunmedierte hämolytische Anämie (IMHA) (MACKIN, 2020). Durch die Entfernung von IgG- und IgM-Antikörpern aus dem Blut kann die Immunadsorption dazu beitragen, die Entzündungsreaktionen zu reduzieren und das Fortschreiten der Krankheit zu verlangsamen. Erwähnenswert ist, dass es im Unterschied zur Humanmedizin in der Veterinärmedizin zum jetzigen Zeitpunkt keine Standardtherapie ersetzt, sondern in schweren Fällen helfen kann, die autoimmunen Antikörper akut so zu reduzieren, sodass nachfolgend die Standardtherapie wirksam werden kann. In der Humanmedizin ist das Ziel, ohne

Immunsuppressiva arbeiten zu können; daher wird eine Heilung mittels der Immunadsorption angestrebt (TOEPFER et al., 1999; FELIX et al., 2008; RESHETNIK & TÖLLE, 2020).

2.5.4. Cytosorb®-Adsorber

Der Cytosorb®-Adsorber ist ein Vollblut-Adsorber. Dieser basiert auf der Hämo-perfusion, die speziell für die Entfernung von Zytokinen, beispielsweise Interleukin 2 (IL-2) und Interleukin 6 (IL-6), Bilirubin und Myoglobin in der Humanmedizin zugelassen ist (ANKAWI et al., 2019; HUBER et al., 2019; MEHTA et al., 2020; KRENN & STELTZER, 2021b). Er wird außerdem für die intraoperative Entfernung von Ticagrelor und Rivaroxaban bei einer kardiopulmonalen Bypass-Operation verwendet. Beides sind Medikamente zur Hemmung der Blutgerinnung (HASSAN et al., 2019; HARKY & BADRAN, 2021; MORESCO et al., 2023). Es werden vor allem hydrophobe Moleküle entfernt, mit einer Größe von bis zu ca. 60 Kilodalton (SCHUBERT, 2023). Es ist bereits in der Humanmedizin bekannt, dass auch noch weitere exogene Giftstoffe adsorbiert werden können, wie zum Beispiel Aflatoxin und verschiedene Medikamente (FRIESECKE et al., 2017; LANG et al., 2020; MASMOUEI et al., 2021; PALAND, 2021; PIERI et al., 2022; OHREM et al., 2023; SCHUBERT, 2023). Der Cytosorb®-Adsorber wurde auch bei kritischen Patienten mit einer Sepsis sowie bei Patienten, die an Coronavirus SARS-CoV-2 Disease 2019 (COVID-19) litten, eingesetzt (FRIESECKE et al., 2017; PENG et al., 2022; PIERI et al., 2022; BOTTARI et al., 2023).

Der Cytosorb®-Adsorber besteht aus hoch porösen High-Tech-Polymerbeads, die durch ihre Struktur eine große Bandbreite an verschiedenen Molekülen binden können. Die Beads bestehen aus vernetztem Divinylbenzol mit Polyvinylpyrrolidonbeschichtung. Die Jafron-HA-330-Trägersubstanz basiert auf einem neutralen makroporösen Harz mit Kollodiumbeschichtung (KRENN & STELTZER, 2021b). Das Biosun-MG350-Adsorptionsmaterial basiert auf einem neutralen makroporösen synthetischen Harz. Durch die Polymeren beträgt die Gesamtoberfläche innerhalb eines Adsorbers ca. 45.000 Quadratmeter (SEELIGER et al., 2020). Der Cytosorb®-Adsorber arbeitet mithilfe eines Konzentrationsgradienten. Die genaue physiochemische Funktionsweise ist dabei noch nicht zur Gänze geklärt (HOUSCHYAR et al., 2018). Es werden verschiedene Interaktionen, darunter hydrophobe Wechselwirkungen, elektrostatische

Anziehung oder auch van der Waals-Kräfte, in Betracht gezogen (WINCHESTER et al., 2003). In Bezug auf die Zytokin-Entfernung ist es das Ziel, die Zytokine nur auf ein physiologisches Level zu reduzieren, sodass diese nicht mehr toxisch sind, aber das Immunsystem intakt bleibt. Dies gilt ebenso für andere endogene Substanzen wie beispielsweise cfHb (HOUSCHYAR et al., 2018; ANKAWI et al., 2019; HUBER et al., 2019; SCHULTZ et al., 2021).

Der Cytosorb[®]-Adsorber wurde 2011 in der Humanmedizin in Europa zugelassen (HOUSCHYAR et al., 2017). In Amerika hat dieser von der Food and Drug Autorisation (FDA) in der Humanmedizin bis zum jetzigen Zeitpunkt nur die Emergency Use Autorisation (EUA) und darf somit nur in Notfallsituationen angewendet werden (SONG et al., 2021). Der Adsorber kann mit standardmäßigen Hämodialyse-, Hämofiltrations- sowie Herz-Lungen-Maschinen verwendet und kombiniert werden (TRAEGER K., 2016; ANKAWI et al., 2019).

In der Tiermedizin ist der Cytosorb[®]-Adsorber bisher nur einige Male eingesetzt worden. Eine Fallserie von fünf Hunden unter Verwendung des Cytosorb[®]-Adsorbers demonstrierte dessen Wirksamkeit zur Senkung des Serum-Bilirubins, wobei die Adsorptionskapazität für cfHb jedoch unbekannt bleibt (OHREM et al., 2023). Zudem gibt es einen Fallbericht aus der Veterinärmedizin, der den erfolgreichen Einsatz des Cytosorb[®]-Adsorbers bei einem Hund zeigt. Dieser wurde in Kombination mit einer Immunadsorption bei einem Hund mit Leishmaniose und Glomerulopathie angewendet (SÄNGER et al., 2024). Zudem wurde der Cytosorb[®]-Adsorber erfolgreich in Kombination mit TPE zur Behandlung einer Ibuprofen-Intoxikation bei einem Hund eingesetzt. Die Ibuprofen-Konzentration im Blut konnte dadurch um 82 % reduziert werden (GIANI et al., 2023).

Der ebenfalls von der Firma CytoSorbents[®] entwickelte VetResQ[®]-Adsorber hat den gleichen Aufbau und Wirkmechanismus wie der Cytosorb[®]-Adsorber. Der VetResQ[®]-Adsorber ist in verschiedenen Größen mit geringeren Blutvolumina als der Cytosorb[®]-Adsorber erhältlich. Dadurch ist eine bessere Anpassung an die verschiedenen Gewichte der Patienten in der Veterinärmedizin möglich. Der VetResQ[®]-Adsorber ist seit 2017 auf dem Markt, derzeit jedoch nur in Nordamerika erhältlich. Dort ist er ausschließlich für die Veterinärmedizin zugelassen (HOBBS et al., 2024c).

Der Effekt des VetResQ[®]-Adsorbers ist, bis auf einige publizierte Fallberichte, bisher kaum erforscht. Dieser wurde beispielsweise in Kombination mit einer TPE bei drei Hunden mit einer IMHA angewandt (MEAGHER et al., 2023). Ein weiterer Fallbericht zeigt den erfolgreichen Einsatz des VetResQ[®]-Adsorbers in Kombination mit einer Dialyse bei einem Hund mit Leptospirose (NECTOUX et al., 2020). Außerdem gibt es einen Fallbericht über einen Hund mit Hitzschlag, der an den daraus resultierenden Elektrolytentgleisungen sowie einer akuten Nierenschädigung litt. Dort wurden mehrere Dialyse-Sitzungen teils mit dem VetResQ[®]-Adsorber kombiniert (TRACY et al., 2022). Zusätzlich beschreibt ein Fallbericht den Fall, wo der VetResQ[®]-Adsorber bei einem Pferd, das an einer perakuten *Clostridium difficile*-Kolitis litt, eingesetzt wurde. Dazu zeigte es eine schwere systemische Entzündungsreaktion und akute Nierenschädigung. Aus diesem Grund wurden zwei Hämo-perfusion-Sitzungen innerhalb von 48 Stunden durchgeführt, wodurch sich die klinischen Parameter stabilisierten (HOBBS et al., 2024a). In einem anderen ex-vivo-Modell am Pferd reduzierte der VetResQ[®]-Adsorber pro- und antiinflammatorische Zytokine signifikant. Zugleich wurden jedoch auch geringe Mengen von Albumin sowie therapeutisch relevante Wirkstoffe wie Gentamicin mitadsorbiert (HOBBS et al., 2024b).

III. PUBLIKATION: ORIGINALARTIKEL



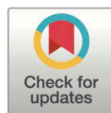
RESEARCH ARTICLE

Pilot study: *In vitro* reduction of hemoglobin from canine blood with hemoperfusion using the Cytosorb® adsorber

Kathrin Spiegel, René Dörfelt*, Katrin Hartmann, Florian Säger

LMU Small Animal Clinic, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, LMU München, Munich, Germany

* r.doerfelt@lmu.de



Abstract

Cell-free hemoglobin (cfHb) can be toxic and lead to kidney injury. This study assessed the *in vitro* reduction of cfHb from canine hemolyzed blood using hemoperfusion with a Cytosorb® cytokine adsorber. Canine whole blood was processed in linear and circular setups, with three runs each, at 100 mL/min. Hemolysis and osmolarity adjustments were performed with distilled water and hypertonic saline. Anticoagulation was optimized with heparin (10,000 IU/L). A median of 3.38 L of hemoglobin solution was processed in the linear setup. Samples were collected after the adsorber and from the waste bag. In the circular setup, a median of 2.09 L was processed, with samples taken before and after the adsorber. CfHb concentration was measured using the XT-2000iV® hematology analyzer (Sysmex). A control setup without an adsorber was run for 24 hours to assess cfHb stability. In the linear setup, cfHb concentration decreased by a median of 17.8% (14.7–26.8%), from 1.7 mmol/L to a minimum of 0.9 mmol/L, with 12.1 g (11.9–23.5 g) of cfHb removed. The median cfHb concentration after the adsorber displayed a logarithmic increase from 0.9 mmol/L (0.8–1.2 mmol/L) to 1.6 mmol/L (1.4–2.1 mmol/L). After processing 2.4 L, no further reduction occurred. In the circular setup, cfHb was reduced by a median of 41.3% (46.1–45.0%), representing 17.4 g (14.6–19.0 g) removed after 13.0 L (13.0–14.0 L). The reduction plateau was reached after 13 L. The hemoglobin reduction ratio in the circular setup at 3 L processed cfHb-solution was 25.0% (23.1–33.3%) and was not different from the linear setup ($p=0.400$). The cfHb clearance decreased in both setups over time. CfHb concentration in the control setup was stable for 24 hours. Hemoperfusion with the Cytosorb® adsorber reduced cfHb *in vitro* from a canine blood solution.

OPEN ACCESS

Citation: Spiegel K, Dörfelt R, Hartmann K, Säger F (2025) Pilot study: *In vitro* reduction of hemoglobin from canine blood with hemoperfusion using the Cytosorb® adsorber. PLoS One 20(7): e0328306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0328306>

Editor: Abbas Farmany, Hamadan University of Medical Sciences, IRAN, ISLAMIC REPUBLIC OF

Received: February 9, 2025

Accepted: June 29, 2025

Published: July 28, 2025

Copyright: © 2025 Spiegel et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data availability statement: Data are available at figshare: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.29264507>.

Funding: The author(s) received no specific funding for this work.



Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Diseases associated with severe hemolysis, such as babesiosis or immune-mediated hemolytic anemia, can lead to fatal hemolysis in humans and animals. Physiologically, cell-free hemoglobin (cfHb) from hemolysis is bound by different binding agents, such as haptoglobin. However, in cases of severe intravascular hemolysis, the binding capacity is exhausted, and cfHb circulates freely in the vascular system, becoming toxic to the organism in various ways [1–4]. CfHb exerts detrimental effects on different physiological processes. It contributes to myocardial injuries, endothelial barrier disruption, and oxidative DNA damage. In guinea pigs with endotoxemia in combination with lipopolysaccharide, enhanced phagocyte activation, myocardial iron deposition, and heme-oxygenase-1 expression were demonstrated as a consequence of hemolysis [5,6]. Uncontrolled heme-oxygenase-1 expression leads to increased iron deposition, which in turn exacerbates oxidative stress and immunosuppression. Conversely, enhanced expression of heme-oxygenase-1 can lead to accelerated destruction of erythrocytes [7,8]. At the same time, cfHb depletes intracellular ascorbate and reduces nitrite to nitric oxide (NO), resulting in vasodilation, increased blood flow, platelet activation and end-organ injury [9]. Oxygen-related toxicity of cfHb leads to elevated oxygen partial pressure in the terminal vessels, triggering vasoconstriction, hypertension, and ischemia [4,10]. These oxidative effects can result in organ failure, particularly acute kidney injury, due to proximal tubule destruction. Hemoglobin deposits in the kidneys can also lead to tubular barrier destruction, causing acute kidney injury [11–14]. High levels of cfHb (up to 38.76 mmol/L) can cause enhanced vascular permeability, promoting non-cardiogenic pulmonary edema and acute respiratory distress syndrome (ARDS) [13,15]. Elevated cfHb concentrations are also associated with higher mortality rates in sepsis, systemic and pulmonary inflammation, and endothelial injury [13,16].

Blood purification techniques, such as hemodialysis, plasmapheresis, and hemoperfusion, have been developed to eliminate endogenous and exogenous substances. Some of these techniques are increasingly applied to veterinary patients [17,18]. Most of these extracorporeal blood purification techniques are insufficient to remove cfHb. Hemodialysis primarily targets smaller molecules, such as urea and creatinine. High-molecular-weight substances, such as hemoglobin, are too large to pass through the dialysis membrane. The molecular weight decreases the efficacy of conventional dialyzers to eliminate cell-free hemoglobin from circulation. Also, high-flux dialyzers, which process larger molecules, are still unsuitable for cfHb elimination [19].

During plasmapheresis, plasma is separated from blood cells and replaced with donor plasma and other substitute solutions, such as synthetic colloids and albumin. It aims to eliminate protein-bound toxins from the circulation but requires large amounts of donor plasma. Plasmapheresis has limited efficacy for removing cfHb from the circulation, primarily due to the non-selective nature of the procedure [20]. Plasmapheresis typically removes around 60–70% of substances within the plasma during a single plasma exchange session, with an exchange of 1.5 times the plasma volume. However, this efficiency diminishes with each additional plasma volume



treated, which is insufficient for significantly reducing cfHb levels, especially in severe hemolysis where cfHb is present in high concentrations. Moreover, during plasmapheresis, a dilution of plasma proteins and coagulation factors with replacement fluids occurs, which makes the complete removal of cfHb even more challenging [21,22].

Hemoperfusion utilizes an extracorporeal circuit with an adsorber, designed for toxin elimination [23]. One recent adsorber is the Cytosorb[®] adsorber, which was developed to eliminate inflammatory mediators and other toxins from the circulation. It has received emergency use authorization (EUA) from the FDA in the United States for cytokine removal [24], and anticoagulants (Ticagrelor and Rivaroxaban) elimination for emergent cardiopulmonary bypass surgery [25–27]. The Cytosorb[®] adsorber has been approved in the European Union since 2011 [28]. The device is a whole blood adsorber containing polystyrene-divinylbenzene polymer beads, providing a surface area of over 45,000 square meters. A concentration gradient of the adsorbed substance and biomechanical mechanisms promote adsorption and ensure that a physiological amount of endogenous molecules remain in the circulation [29–31]. The Cytosorb[®] adsorber primarily binds hydrophobic molecules with a molecular weight of 5–60 kilodaltons (kDa), encompassing both endogenous substances, such as bilirubin, myoglobin, or cfHb, and exogenous substances, such as drugs or toxins (e.g., aflatoxin) [18,32–38]. Its efficacy in removing cfHb has been demonstrated in humans during complex cardiac surgery and in critically ill patients [1,39]. It was also used in humans with severe sepsis, [40,41] systemic inflammation due to COVID-19 [42,43], and cardiovascular surgery to clear the blood of cfHb and inflammatory mediators, preventing post-surgical organ dysfunction [25]. A case report highlighted the reduction of cfHb with the Cytosorb[®] adsorber during extracorporeal life support (ECLS) in humans within 48 and 87 hours, using multiple adsorbers [44].

Data concerning the application of the Cytosorb[®] adsorber in veterinary medicine are limited. The VetResQ[®] adsorber, a veterinary brand of the Cytosorb[®] adsorber, combined with therapeutic plasma exchange, was successfully used to treat immune-mediated hemolytic anemia in three dogs [45]. A case series of five dogs demonstrated the efficient reduction of serum bilirubin using the Cytosorb[®] adsorber, surpassing the effect of hemodialysis alone [46]. However, the adsorption capacity of the Cytosorb[®] adsorber on cfHb remains unknown.

This pilot study aimed to evaluate the *in vitro* adsorption capacity of cfHb from canine hemolyzed blood with the Cytosorb[®] adsorber during hemoperfusion.

Materials and methods

Ethical approval

This study was approved by the ethics committee of the Centre of Clinical Veterinary Medicine of the LMU Munich (approval no. AZ 335-19-10-2022).

Study design

Expired canine blood from the in-house veterinary blood bank was used to prepare the cfHb solutions. This decision was made based on ethical and resource management considerations, not to withhold blood from patients urgently requiring blood transfusions. Expired blood was still sufficient for the *in vitro* experimental setup, as only hemoglobin, but not coagulation factors or intact red blood cells, were required. Blood was collected and processed in accordance to the in-house blood banking standards. A commercial blood bag (Compoflex[®] CPDA blood bag, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Germany) with an attached 16-gauge needle was used to collect a maximum of 12 mL/Kg of blood, gravity-driven from the jugular vein of the donor dogs.

The expired canine whole blood, which was stored with Citrate-Phosphate-Dextrose-Adenine at –30°C, was thawed and mixed with distilled water (aqua ad injectabilia, B. Braun Vet Care AG, Melsungen, Germany) at a 1:3 ratio to achieve complete hemolysis, which was confirmed through microscopic evaluation before initiating the procedure. To normalize the osmolarity of the cfHb solution, 7.5% hypertonic saline (hypertonic NaCl 7.5 g/100 mL, B. Braun Vet Care AG, Melsungen, Germany) was added after hemolysis. Anticoagulation was achieved with 10,000 IU/L of heparin (Heparin-Natrium



25,000 I.E./5 mL Inj. Lsg., B. Braun Vet Care AG, Melsungen, Germany). The cfHb solution was prepared before each test run, resulting in different starting concentrations of cfHb. The resulting cfHb solution was stored in a 5-liter bag (Haemotronic S.p.A., Modena, Italy). CfHb content was analyzed using the XT-2000iV[®] blood analysis device (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Germany).

Hemoperfusion was performed using the blood purification platform Pure Adjust[®] (Nikkiso Europe GmbH, Langenhagen, Germany) with a blood tubing line for apheresis[®] (Nikkiso Europe GmbH, Langenhagen, Germany) and the Cytosorb[®] adsorber (CytoSorbents Inc., New Jersey, United States of America). The extracorporeal circuit was primed with 200 mL of isotonic saline (NaCl 0.9%, B. Braun Vet Care AG, Melsungen, Germany).

Two distinct experimental setups, linear and circular, were applied. Each of them was conducted three times. Additionally, one run with the circular setup but without the Cytosorb[®] adsorber was performed to prove the stability of the cfHb concentration.

The linear setup was the basic setup of the experiment. The aim was to determine the adsorption capacity of the cfHb with the Cytosorb[®] adsorber until a stable cfHb concentration was achieved. The cfHb solution underwent continuous processing through the adsorber with a flow rate of 100 mL/min in the linear setup (Fig 1). This setup mimics a patient with a stable cfHb concentration due to a large blood volume and/or ongoing hemolysis. Samples were collected after the adsorber every 0.1 L of processed cfHb solution volume for the first liter, every 0.2 L from one liter to 1.6 L, and every 0.4 L from 1.6 L of processed blood volume.

The circular setup involved the recirculation of the cfHb solution into the storage bag, using a blood flow of 100 mL/min. It was designed to mimic hemoperfusion in a patient with a small blood volume and no ongoing hemolysis (Fig 2). Samples were collected every 0.2 liter, before and after the adsorber, during the first liter passing through the adsorber, and at 1.5 and 2 L. From 3 L on, samples were collected for every liter of processed cfHb solution. This setup was run until the cfHb concentration in the storage bag was stable for 10 L of processed cfHb solution.

The starting point for cfHb analysis during the procedure in both setups was defined as 0 when 0.2 liters of Hb solution filled the system, ensuring adequate cfHb concentration at collection ports, as the Cytosorb[®] adsorber contains a priming volume of 0.15 L and the tubing system 0.05 L of isotonic saline.

Additionally, a control setup, identical to the circular setup, but without the Cytosorb[®] adsorber, was run for 24 hours to exclude spontaneous degradation of cfHb (Fig 3). Samples were collected after 0.5 L, 1 liter, 5 L, 10 L, 20 L, 45 L, and 144 L of processed cfHb solution.

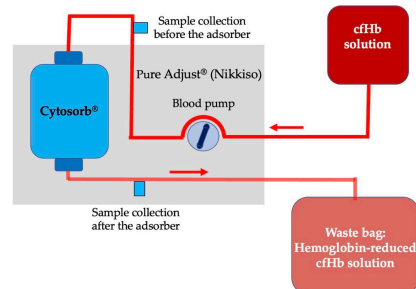


Fig 1. Illustration of the linear setup of a canine cell-free hemoglobin (cfHb) solution processed by hemoperfusion using the Cytosorb[®] adsorber. The cfHb solution is passed through the Cytosorb[®] adsorber of the Pure Adjust[®] (Nikkiso) blood purification platform and collected in a waste bag at a blood flow rate of 100 mL/min. Samples are collected at the sample collection port after the adsorber.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0328306.g001>

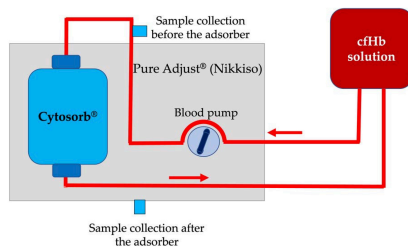


Fig 2. Illustration of the circular setup of a canine cell-free hemoglobin (cfHb) solution processed by hemoperfusion using the Cytosorb® adsorber. The cfHb solution is processed by the Pure Adjust® (Nikkiso) blood purification platform and the Cytosorb® adsorber and recirculated into the same storage bag, with a flow of 100 mL/min. Samples were collected at the collection ports before and after the adsorber.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0328306.g002>

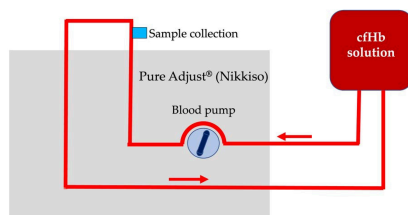


Fig 3. Illustration of the control setup: continuous circulation of canine cell-free hemoglobin (cfHb) solution without the Cytosorb® adsorber was performed. The cfHb solution was processed using the Pure Adjust® (Nikkiso) blood purification platform and recirculated into the same storage bag with a flow rate of 100 mL/min for 24 hours.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0328306.g003>

Statistical analysis

A commercial software (Microsoft Excel®, Microsoft® Corporation, Redmond, USA) was used for data documentation. Statistical analysis was performed using commercially available software (Prism 5 for Windows®; GraphPad Software, San Diego, CA). Data are presented as median and range (minimum–maximum). Clearance was calculated with the following formula: Clearance (mL/min) = flow (mL/min) x extraction coefficient. CfHb reduction ratio was compared using the Mann-Whitney U-test. The decrease and increase of the cfHb concentrations pre- and post-absorber were compared using the Friedman test with post-hoc Dunn's multiple comparison test. P-values < 0.05 were considered significant.

Results

Linear setup

The linear setup processed a median of 3.3 L (3.0–3.4 L) of cfHb solution. After calculating the dilutional effect of the priming solution, the initial cfHb concentration in the canine cfHb solution was reduced by a median of 17.8% (range 14.7–26.8%). A median cfHb reduction of 12.1 g (11.9–23.5 g) was achieved during the three runs (Table 1). The median cfHb concentration after the adsorber displayed a logarithmic increase from 0.9 mmol/L (0.8–1.2 mmol/L) to 1.6 mmol/L (1.4–2.1 mmol/L) up to a median blood volume of 2.4 liters of processed cfHb solution (Fig 4). After these 2.4 liters, no further reduction of the cfHb content was observed. The cfHb concentration differed significantly between the time points

Table 1. cfHb volume, hemoglobin concentration, and hemoglobin reduction of canine cell-free hemoglobin (cfHb) solution undergoing hemoperfusion, applying the Cytosorb® adsorber in the linear and the circular setup and control run without the adsorber. The end hemoglobin concentration refers to the hemoglobin concentration in the waste bag after processing the whole cfHb solution. The dilutional effect of saline used for priming was already addressed during the calculation of the hemoglobin reduction.

Test run	Volume cfHb solution (L)	Starting hemoglobin concentration (mmol/L)	End hemoglobin concentration (mmol/L)	Hemoglobin reduction (%)	Total hemoglobin reduction (g)
Linear setup					
1	3.0	2.3	1.7	26.8	23.5
2	3.4	1.7	1.4	14.7	11.9
3	3.3	1.5	1.2	17.8	12.1
Circular setup					
1	2.1	1.3	0.7	36.1	14.6
2	2.0	1.2	0.6	45.0	17.4
3	2.2	1.2	0.7	41.3	19.0
Control setup					
1	2.1	0.6	0.6	0	0

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0328306.t001>

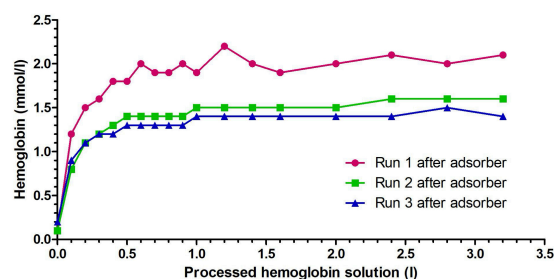


Fig 4. Hemoglobin concentration of three canine cell-free hemoglobin (cfHb) solutions undergoing hemoperfusion using the Cytosorb® adsorber with the linear setup, analyzed after the adsorber.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0328306.g004>

($p < 0.001$). Due to the low number of samples, no specific time point for the cfHb difference was found during the post-hoc analysis. The cfHb clearance decreased from 47.8 ml/min (40.0–52.9 ml/min) at 0.1 liters processed cfHb-solution to 6.7 ml/min (5.9–8.7 ml/min) at 3.2 liters processed cfHb solution (Fig 5).

Circular setup

A median of 2.1 L (2.0–2.2 L) of the canine cfHb solution was processed during the circular test runs. The cfHb concentration was reduced by a median of 41.3% (46.1–45.0%). The initial median cfHb concentration of the canine cfHb solution, of 1.2 mmol/L (1.2–1.3 mmol/L) before the first run, steadily decreased before and increased after passing through the Cytosorb® adsorber. This continuous reduction resulted in a minimal cfHb concentration of 0.7 mmol/L (0.6–0.7 mmol/L). This represented an absolute cfHb reduction after calculating the dilutional effect of the priming saline of 17.4 g (14.6–19.0 g; Table 1). This reduction was achieved after a median of 13.0 L (13.0–14.0 L) of processed cfHb solution (Fig 6). Thereafter, no further decrease in cfHb concentration was observed. The hemoglobin reduction ratio at 3 L processed cfHb-solution was 25.0% (23.1–33.3%) and did not differ from the linear setup ($p = 0.400$). The pre-adsorber

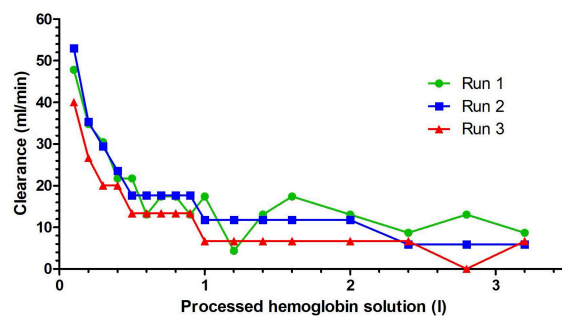


Fig 5. Hemoglobin clearance of three canine cell-free hemoglobin (cfHb) solutions undergoing hemoperfusion using the Cytosorb® adsorber with the linear setup.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0328306.g005>

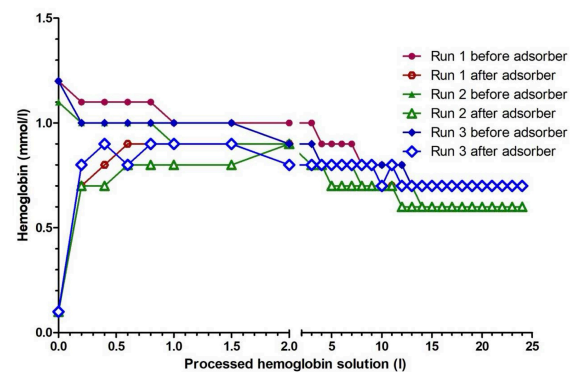


Fig 6. Hemoglobin concentration of three canine cell-free hemoglobin (cfHb) solutions undergoing hemoperfusion using the Cytosorb® adsorber with the circular setup, analyzed before and after the adsorber. In the circular setup, samples were taken more frequently for the first two L of processed cfHb solution. The scale on the x-axis is presented in different intervals, as most changes occurred in the first two L of processed cfHb solution.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0328306.g006>

cfHb concentration decreased, and the post-adsorber cfHb concentration increased significantly between the time points ($p < 0.001$). Due to the low number of samples, no specific time point for the cfHb difference was found during the post-hoc analysis. The cfHb clearance decreased from 30.0 mL/min (20.0–36.4 mL/min) at 0.2 L processed cfHb-solution to 11.1 mL/min (0.0–20.0 mL/min) at 3 L to 0.0 mL/min (0.0–0.0 mL/min) at 24 liters processed cfHb solution (Fig 7).

Control setup

A third setup using the circular setup but without a Cytosorb® adsorber was performed for 24 hours to ensure the stability of the cfHb solution. A volume of 2.1 L of the cfHb solution was used. The concentration of cfHb in the cfHb solution remained unchanged at 0.6 mmol/L within 24 hours.

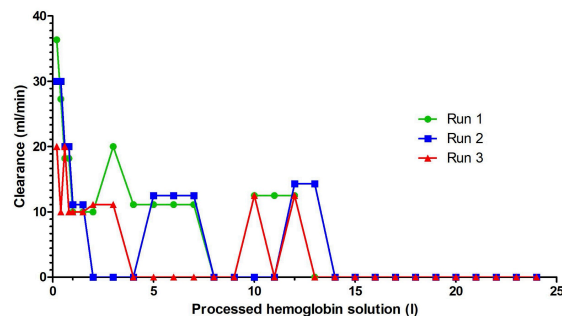


Fig 7. Hemoglobin clearance of three canine cell-free hemoglobin (cfHb) solutions undergoing hemoperfusion using the Cytosorb® adsorber with the circular setup.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0328306.g007>

Discussion

In the present *in vitro* pilot study, the capability and capacity of the Cytosorb® adsorber to reduce cfHb from canine cfHb solution were examined in two different setups. A median cfHb reduction of 17.8% and 41.3% was achieved in the linear and circular setups, respectively. The Cytosorb® adsorber appears suitable for cfHb reduction from canine cfHb solution.

The hemoglobin molecule is primarily hydrophilic, with some hydrophobic elements. The hydrophobic parts are especially responsible for oxygen binding. The hemoglobin's molecular weight of 64.5 kilodaltons is in the upper range of the adsorption spectrum of the Cytosorb® adsorber [47]. Thus, hemoglobin barely meets the requirements to be adsorbed by the Cytosorb® adsorber. The effect of the Cytosorb® adsorber of cfHb has been demonstrated in humans. One study in humans during prolonged cardiac surgery has proven a reduction of the cfHb with the Cytosorb® adsorber [1]. Another case series reported an effective reduction of cfHb in humans undergoing ECLS with the Cytosorb® adsorber over 24 hours and 4 days [44]. The findings indicate that the Cytosorb® hemoperfusion can effectively reduce cfHb concentrations in human patients.

In the linear setup of the present study, the strongest post-adsorber cfHb concentration changes occurred during the first liter of processed cfHb solution. Only minor changes in cfHb were observed after processing the first liter of cfHb solution. The cfHb clearance of 47.8 mL/min (40.0–52.9 mL/min) at 0.1 L of processed cfHb-solution decreased quickly after 0.4 L of processed cfHb-solution. This phenomenon can be attributed to the increasing concentration of cfHb within the Cytosorb® adsorber, resulting in a diminished concentration gradient between the cfHb solution and the adsorber. Consequently, although the cfHb concentration before the adsorber remained consistent, the adsorption rate gradually declined as the experiment progressed. The concentration of cfHb within the Cytosorb® adsorber increased as more cfHb solution was processed, further reducing the concentration gradient. Hence, despite the stable pre-adsorber concentration, the amount of cfHb adsorbed varied throughout the process. In the first test run of the linear setup, a higher starting concentration of 2.3 mmol/L was used compared to the other test runs with starting concentrations of 1.7 and 1.5 mmol/L. In the first test run, a significantly higher amount of cfHb was adsorbed compared to the other two runs. This suggests that higher starting concentrations and thus a higher concentration gradient of cfHb may lead to a higher adsorption rate. However, there is currently a lack of comparative studies employing a similar linear setup to substantiate these hypotheses.

The initial sharp decrease in cfHb concentrations suggests a short-term high efficacy of this method. However, the subsequent decrease of the cfHb clearance during Cytosorb® hemoperfusion highlights the necessity of periodic adsorber replacement to maintain low cfHb levels over a longer treatment duration, which was already presented in a case report in humans [44].



In the circular setup of the present study, the strongest decrease in cfHb concentration was observed within the first 2 liters. The circular setup achieved a greater and more sustained cfHb reduction during processing of 13 L of cfHb solution, before the stabilization of cfHb concentrations before and after the adsorber occurred. This suggests a saturation of the Cytosorb[®] adsorber in patients with smaller blood volumes without ongoing hemolysis. The steady decrease followed by stabilization indicates that adsorption efficiency is closely linked to the concentration gradient between cfHb and the adsorber, which diminishes over time. Unlike the linear setup, which was limited by rapid saturation of the adsorber, the circular setup benefited from continuous recirculation, mimicking more realistic *in vivo* conditions.

In humans undergoing ECLS over 24 hours up to four days, the cfHb concentration decreased within the first 12 hours but increased again thereafter. Therefore, a new Cytosorb[®] adsorber was integrated into the setup after 24, 48, 72, and 96 hours. After 36 hours, another hemoglobin increase was recorded. After that, a continuous cfHb decrease, with only a mild additional peak after 60 hours, was observed. The lowest cfHb concentration was reported after 84 hours [44].

Results of the circular setup in the present study, conducted over an extended duration, suggest that time also influences the adsorption process. A previous report in humans indicates that the Cytosorb[®] adsorber, integrated into an ECLS setup, maintains an effective adsorption of cfHb for up to 24 hours [44]. This prolonged operation duration could account for the diminished adsorption rate observed in the linear setup, since it was run for a shorter period compared to the circular setup. Meanwhile, the circular setup was continued until the concentration of cfHb stabilized before and after the Cytosorb[®] adsorber, and no changes were observed for 10 L. Initially, a rapid decline in cfHb concentration was evident in the circular setup until stabilization occurred. After 13 L of processed cfHb solution, no further cfHb reduction occurred. In this configuration, the adsorption rate diminished in parallel with the decreasing concentration of cfHb, reflecting the diminishing concentration gradient between the cfHb solution and the adsorber. Once the cfHb concentration before and after the Cytosorb[®] adsorber was stable, no further reduction occurred. Similar phenomena have been observed in studies involving lipopolysaccharides (LPS), interleukins, and tumor necrosis factor (TNF), as well as in human trials using cfHb in which concentrations declined rapidly initially before leveling off over time [31,44,48]. Additionally, *in vivo* trials, administering LPS to stimulate the immune response, revealed effective elimination of interleukins and TNF by the Cytosorb[®] adsorber, with concentrations aligning before and after the adsorber over time [31,44,48]. Also, a degradation of the adsorber beads or clogging of the adsorption material could be a reason for the lower adsorption rate [49].

The key distinctions between the setups were that the linear setup exhibited a rapid but limited cfHb reduction, reaching a plateau after 2.2 L of processed cfHb solution, demonstrating the adsorbers' saturation. The linear setup, designed to mimic conditions of ongoing hemolysis, showed an initial rapid reduction in cfHb concentration but quickly reached saturation, with no further removal after processing 2.2 L. This suggests that for applications where cfHb levels are consistently high, periodic replacement of the adsorber may be required to maintain efficacy. The rapid saturation in the linear setup also highlights the impact of high initial cfHb concentrations, where the adsorption rate declines as the concentration gradient diminishes. The circular setup's extended adsorption capacity suggests that continuous recirculation may be a more effective strategy for sustained cfHb removal.

In the control setup, the concentration of cfHb remained stable at 0.6 mmol/L for 24 hours. This leads to the conclusion that cfHb is stable without relevant self-degradation over a long period (24 hours) and demonstrates that the decrease in cfHb concentration is caused by the adsorber.

The flow rate of the cfHb solution used in the present pilot study was 100 mL/min. This is the minimal flow rate recommended by the Cytosorb[®] manufacturer. The flow rate might have influenced the adsorption efficiency in different ways. A higher flow rate leads to a decreased contact time between the cfHb solution and the adsorber, which could reduce the adsorbed cfHb per liter. On the other hand, a higher blood flow increases the processed cfHb solution volume.

Saturation of the adsorber can also be achieved by substances other than cfHb, such as bilirubin, myoglobin and cytokines (24). Given the analogous composition of the initial components, it is unlikely that a greater adsorption of other substances occurred in the second and third runs of the linear setup. If adsorption of other substances occurred, a similar



adsorption is assumed during all test runs. A higher cfHb starting concentration and therefore a higher concentration gradient are more likely to be the reason for the differences between the test runs.

Anticoagulation was achieved with 10,000 I.U./L of heparin. This is a 10-fold dose that would be administered to a clinical patient treated with extracorporeal therapies. The Cytosorb[®] adsorber binds different anticoagulants, such as ticagrelor or rivaroxaban (25, 26). The potential adsorption of heparin by the Cytosorb[®] adsorber is an important consideration, particularly in an *in vitro* setting where anticoagulation relies solely on external supplementation and no metabolism of heparin occurs. Although the adsorber is primarily designed to bind hydrophobic substances and is highly polar, its partial adsorption cannot be fully excluded. While the manufacturer does not list heparin as a common target molecule, clinical observations suggest that anticoagulation may be affected during extended Cytosorb[®] use [50]. Recent studies have shown a significant adsorption of the anticoagulant Argatroban by the device [51]. In the present study, a high heparin concentration (10,000 IU/L) was used to ensure adequate anticoagulation. However, as the effect of heparin was not controlled, adsorption of heparin and clotting of the cfHb solution remain possible influencing factors, despite clotting was not observed in the tubing system.

Currently, no veterinary study evaluates the effect of the Cytosorb[®] adsorber on cfHb. Two publications report the use of the Cytosorb[®] adsorber in veterinary patients. The first case series describes the use of the Cytosorb[®] adsorber in three dogs with immune-mediated hemolytic anemia (IMHA) receiving a combination of therapeutic plasma exchange (TPE) and hemoperfusion. The Cytosorb[®] adsorber could be a beneficial additional tool to control severe cases of IMHA [45]. Another case report used the Cytosorb[®] adsorber in combination with immunoabsorption and hemodialysis in a dog with Leishmaniosis-induced Glomerulopathy to reduce cytokines and light chain proteins [52].

The present study has some limitations. One is the low number of test runs. Given the most likely stable adsorption capacity of the adsorber, the authors assume the number of *in vitro* runs is sufficient to estimate the adsorber capacity. Further prospective *in vivo* studies are required to assess the adsorption capacity *in vitro* with larger numbers of runs and larger cohorts of different cfHb concentrations, as well as in clinical patients. Furthermore, the time point 0 represents the situation when the first milliliter of the cfHb solution had passed the sampling port. A dilution with residual priming solution might have led to false low cfHb concentrations during the first 2 sampling time points. The priming solution of a total of 200 ml was also mixed into the hemolyzed blood solution, which decreased the end concentration of the cfHb in the waste bag in the linear setup and in the reservoir bag in the circular setup. This represented about 10% of the volume of the cfHb solution in the circular setup and about 6% of the volume of the linear setup and contributed partially to the decrease of the cfHb concentrations.

The starting concentration of cfHb and the amount of the cfHb solution varied. This was caused by the different volumes and concentrations of the blood bags used to create the cfHb solution and decreases the comparability of the test runs more difficult. Additional studies with standardized blood volume and cfHb concentration would be beneficial for more accurate comparison. As a one-compartment model was used, the distribution dynamics of cfHb, as well as ongoing hemolysis in patients, cannot be addressed *in vitro*.

It is unclear if the presence of red blood cells, platelets and cytokines in the plasma influences the efficiency of the Cytosorb[®] adsorber. Nevertheless, the Cytosorb[®] adsorber does not affect the albumin concentration or platelet count *in vivo* [53–55]. As white and red blood cells are not adsorbed by the Cytosorb[®] adsorber, they most likely do not influence its efficiency [34]. On the other hand, the cfHb solution should not contain red or white blood cells. It cannot be excluded that cell detritus of the hemolyzed cells may influence adsorption capacity due to clogging of the adsorber.

This pilot study shows the potential of the Cytosorb[®] adsorber to reduce the cfHb concentration from canine blood. The Cytosorb[®] hemoperfusion for hemoglobin reduction could be clinically used in patients with intravascular hemolysis, due to immune-mediated hemolytic anemia or Babesiosis. Future studies should focus on *in vivo* applications, particularly assessing the effect of blood flow rates, ongoing hemolysis, and adsorption saturation on performance in clinical settings. Further investigation into optimizing flow rates and adsorber replacement intervals may provide insights into maximizing cfHb removal in veterinary and human medicine.^{1, 42}



Conclusions

Hemoperfusion using the Cytosorb[®] adsorber effectively reduced cfHb from a canine cfHb solution *in vitro*. Especially in the circular setup, cfHb-clearance decreased continuously. No further reduction in cfHb was observed after processing 13 L of cfHb solution. The circular setup provided superior and sustained clearance compared to the linear setup, with adsorption ceasing only after 13 L due to adsorber saturation. These results support the potential clinical utility of Cytosorb[®] in managing hemolytic diseases such as IMHA or Babesiosis in veterinary medicine. However, additional studies are needed to evaluate the *in vivo* efficacy of hemoperfusion using the Cytosorb[®] adsorber.

Author contributions

Conceptualization: Kathrin Spiegel, René Dörfelt, Katrin Hartmann, Florian Sängler.

Data curation: Kathrin Spiegel, Florian Sängler.

Formal analysis: Kathrin Spiegel, René Dörfelt.

Funding acquisition: René Dörfelt, Katrin Hartmann.

Investigation: Kathrin Spiegel.

Methodology: René Dörfelt.

Project administration: René Dörfelt.

Resources: René Dörfelt, Katrin Hartmann.

Software: Katrin Hartmann.

Supervision: René Dörfelt, Katrin Hartmann, Florian Sängler.

Validation: René Dörfelt, Florian Sängler.

Writing – original draft: Kathrin Spiegel.

Writing – review & editing: René Dörfelt, Katrin Hartmann, Florian Sängler.

References

- Gleason TG, Argenziano M, Bavaria JE, Kane LC, Coselli JS, Engelman RM, et al. Hemoadsorption to Reduce Plasma-Free Hemoglobin During Cardiac Surgery: Results of REFRESH I Pilot Study. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2019;31(4):783–93. <https://doi.org/10.1053/j.semtcvs.2019.05.006> PMID: 31085219
- Ascenzi P, Bocedi A, Visca P, Altruda F, Tolosano E, Beringhelli T, et al. Hemoglobin and heme scavenging. *IUBMB Life*. 2005;57(11):749–59. <https://doi.org/10.1080/15216540500380871> PMID: 16511968
- Vallelian F, Buehler PW, Schaer DJ. Hemolysis, free hemoglobin toxicity, and scavenger protein therapeutics. *Blood*. 2022;140(17):1837–44. <https://doi.org/10.1182/blood.2022015596> PMID: 35660854
- Boretti FS, Buehler PW, D'Agnillo F, Kluge K, Glaus T, Butt OI, et al. Sequestration of extracellular hemoglobin within a haptoglobin complex decreases its hypertensive and oxidative effects in dogs and guinea pigs. *J Clin Invest*. 2009;119(8):2271–80. <https://doi.org/10.1172/JCI39115> PMID: 19620788
- Kuck JL, Bastarache JA, Shaver CM, Fessel JP, Dikalov SI, May JM, et al. Ascorbic acid attenuates endothelial permeability triggered by cell-free hemoglobin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;495(1):433–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.058> PMID: 29129689
- Baek JH, Zhang X, Williams MC, Schaer DJ, Buehler PW, D'Agnillo F. Extracellular Hb enhances cardiac toxicity in endotoxemic guinea pigs: protective role of haptoglobin. *Toxins (Basel)*. 2014;6(4):1244–59. <https://doi.org/10.3390/toxins6041244> PMID: 24691127
- Larsen R, Gozzelino R, Jeney V, Tokaji L, Bozza FA, Japiassú AM, et al. A central role for free heme in the pathogenesis of severe sepsis. *Sci Transl Med*. 2010;2(51):51ra71. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001118> PMID: 20881280
- Kovtunovych G, Eckhaus MA, Ghosh MC, Ollivierre-Wilson H, Rouault TA. Dysfunction of the heme recycling system in heme oxygenase 1-deficient mice: effects on macrophage viability and tissue iron distribution. *Blood*. 2010;116(26):6054–62. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-272138> PMID: 20844238
- Gladwin MT, Crawford JH, Patel RP. The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Radic Biol Med*. 2004;36(6):707–17. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.032> PMID: 14990351



10. Winslow RM. Oxygen: the poison is in the dose. *Transfusion*. 2013;53(2):424–37. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03774.x> PMID: 22804568
11. Olsson MG, Allhorn M, Bülow L, Hansson SR, Ley D, Olsson ML, et al. Pathological conditions involving extracellular hemoglobin: molecular mechanisms, clinical significance, and novel therapeutic opportunities for $\alpha(1)$ -microglobulin. *Antioxid Redox Signal*. 2012;17(5):813–46. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4282> PMID: 22324321
12. Deuel JW, Schaer CA, Boretti FS, Opitz L, Garcia-Rubio I, Baek JH, et al. Hemoglobinuria-related acute kidney injury is driven by intrarenal oxidative reactions triggering a heme toxicity response. *Cell Death Dis*. 2016;7(1):e2064. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.392> PMID: 26794659
13. Shaver CM, Wickersham N, McNeil JB, Nagata H, Sills G, Kuck JL, et al. Cell-Free Hemoglobin-mediated Increases in Vascular Permeability. A Novel Mechanism of Primary Graft Dysfunction and a New Therapeutic Target. *Ann Am Thorac Soc*. 2017;14(Supplement_3):S251–2. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201609-693MG> PMID: 28945473
14. Shaver CM, Paul MG, Putz ND, Landstreet SR, Kuck JL, Scarfe L, et al. Cell-free hemoglobin augments acute kidney injury during experimental sepsis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2019;317(4):F922–9. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00375.2018> PMID: 31364379
15. Shaver CM, Upchurch CP, Janz DR, Grove BS, Putz ND, Wickersham NE, et al. Cell-free hemoglobin: a novel mediator of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016;310(6):L532–41. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00155.2015> PMID: 26773065
16. Meegan JE, Shaver CM, Putz ND, Jesse JJ, Landstreet SR, Lee HNR, et al. Cell-free hemoglobin increases inflammation, lung apoptosis, and microvascular permeability in murine polymicrobial sepsis. *PLoS One*. 2020;15(2):e0228727. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228727> PMID: 32012200
17. Groover J, Londoño LA, Tapia-Ruano K, Iacovetta C. Extracorporeal blood purification in acutely intoxicated veterinary patients: A multicenter retrospective study (2011–2018): 54 cases. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2022;32(1):34–41. <https://doi.org/10.1111/vec.13100> PMID: 34897946
18. Friessecke S, Stecher S-S, Gross S, Felix SB, Nierhaus A. Extracorporeal cytokine elimination as rescue therapy in refractory septic shock: a prospective single-center study. *J Artif Organs*. 2017;20(3):252–9. <https://doi.org/10.1007/s10047-017-0967-4> PMID: 28589286
19. Pstras L, Debowska M, Wojcik-Zaluska A, Zaluska W, Waniewski J. Hemodialysis-induced changes in hematocrit, hemoglobin and total protein: Implications for relative blood volume monitoring. *PLoS One*. 2019;14(8):e0220764. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220764> PMID: 31404089
20. Patten E, Berkman EM. Therapeutic plasmapheresis and plasma exchange. *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 1986;23(2):147–75.
21. Winters JL. Plasma exchange: concepts, mechanisms, and an overview of the American Society for Apheresis guidelines. *Hematology*. 2012;2012(1):7–12. <https://doi.org/10.1182/asheducation.v2012.1.7.3797920>
22. Cheng CW, Hendrickson JE, Tormey CA, Sidhu D. Therapeutic Plasma Exchange and Its Impact on Drug Levels: An ACLPS Critical Review. *Am J Clin Pathol*. 2017;148(3):190–8. <https://doi.org/10.1093/ajcp/axx056> PMID: 28821193
23. Ronco C, Bellomo R. Hemoperfusion: technical aspects and state of the art. *Crit Care*. 2022;26(1):135. <https://doi.org/10.1186/s13054-022-04009-w> PMID: 35549999
24. Song T, Hayanga J, Durham L, Garrison L, McCarthy P, Barksdale A, et al. CytoSorb Therapy in COVID-19 (CTC) Patients Requiring Extracorporeal Membrane Oxygenation: A Multicenter, Retrospective Registry. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:773461. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.773461> PMID: 34988092
25. Alarie M, Savelberg M, Vautour D, Ribeiro IB. Use of CytoSorb® hemoabsorption column during prolonged cardiopulmonary bypass in complex cardiac surgery patient. *J Cardiothorac Surg*. 2022;17(1):172. <https://doi.org/10.1186/s13019-022-01922-7> PMID: 35799205
26. Harky A, Badran A. Reducing antithrombotic-related bleeding risk in urgent and emergency cardiac surgery. *Br J Cardiol*. 2021;28(2):26.
27. Hassan K, Kannmacher J, Wohlmuth P, Budde U, Schmoeckel M, Geidel S. Cytosorb Adsorption During Emergency Cardiac Operations in Patients at High Risk of Bleeding. *Ann Thorac Surg*. 2019;108(1):45–51. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2018.12.032> PMID: 30684482
28. Ruiz-Rodríguez JC, Molnar Z, Deliargyris EN, Ferrer R. The Use of CytoSorb Therapy in Critically Ill COVID-19 Patients: Review of the Rationale and Current Clinical Experiences. *Crit Care Res Pract*. 2021;2021:7769516. <https://doi.org/10.1155/2021/7769516> PMID: 34336280
29. Poli EC, Rimmelé T, Schneider AG. Hemoabsorption with CytoSorb®. *Intensive Care Med*. 2019;45(2):236–9. <https://doi.org/10.1007/s00134-018-5464-6> PMID: 30446798
30. Huber W, Algül H, Lahmer T, Mayr U, Lehmann M, Schmid RM, et al. Pancreatitis cytosorbents (CytoSorb) inflammatory cytokine removal: A Prospective Study (PACIFIC). *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(4):e13044. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013044> PMID: 30681551
31. Malard B, Lambert C, Kellum JA. In vitro comparison of the adsorption of inflammatory mediators by blood purification devices. *Intensive Care Med Exp*. 2018;6(1):12.
32. Chen J, Han W, Chen J, Zong W, Wang W, Wang Y, et al. High performance of a unique mesoporous polystyrene-based adsorbent for blood purification. *Regen Biomater*. 2017;4(1):31–7. <https://doi.org/10.1093/rb/rbw038> PMID: 28149527
33. Schultz P, Schwier E, Eickmeyer C, Henzler D, Köhler T. High-dose CytoSorb hemoabsorption is associated with improved survival in patients with septic shock: A retrospective cohort study. *J Crit Care*. 2021;64:184–92. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2021.04.011> PMID: 33962219
34. Ankawi G, Xie Y, Yang B, Xie Y, Xie P, Ronco C. What Have We Learned about the Use of Cytosorb Adsorption Columns?. *Blood Purif*. 2019;48(3):196–202. <https://doi.org/10.1159/000500013> PMID: 31039564
35. Piskovatska V. Spektrum von während der intraoperativen Hämofiltration entfernten Blutproteinen - Adsorption außer Zytokine. 2021.



36. Reuchsel C, Gonnert FA. Successful treatment of severe quetiapine intoxication with CytoSorb hemoadsorption. *J Clin Pharm Ther*. 2022;47(9):1471–4. <https://doi.org/10.1111/jcpt.13668> PMID: 35537706
37. Paland M. Use of CytoSorb in cases of acute amitriptyline intoxication. *J Clin Pharm Ther*. 2021;46(5):1476–9. <https://doi.org/10.1111/jcpt.13373> PMID: 33768556
38. Lang CN, Sommer MJ, Neukamm MA, Staudacher DL, Supady A, Bode C, et al. Use of the CytoSorb adsorption device in MDMA intoxication: a first-in-man application and in vitro study. *Intensive Care Med Exp*. 2020;8(1):21. <https://doi.org/10.1186/s40635-020-00313-3> PMID: 32542550
39. Peng JY, Li L, Zhao X, Ding F, Hou X, Peng Z. Hemoperfusion with CytoSorb(R) in critically ill COVID-19 patients. *Blood Purif*. 2022;51(5):410–6.
40. Mehta Y, Mehta C, Kumar A, George JV, Gupta A, Nanda S, et al. Experience with hemoadsorption (CytoSorb®) in the management of septic shock patients. *World J Crit Care Med*. 2020;9(1):1–12. <https://doi.org/10.5492/wjccm.v9.i1.1> PMID: 32104647
41. Zuccari S, Damiani E, Domizi R, Scorcella C, D'Arezzo M, Carsetti A, et al. Changes in Cytokines, Haemodynamics and Microcirculation in Patients with Sepsis/Septic Shock Undergoing Continuous Renal Replacement Therapy and Blood Purification with CytoSorb. *Blood Purif*. 2020;49(1–2):107–13. <https://doi.org/10.1159/000502540> PMID: 31434083
42. Masmouei B, Harorani M, Bazrafshan MR, Karimi Z. COVID-19: Hyperinflammatory syndrome and hemoadsorption with CytoSorb. *Blood Purif*. 2021;50(6):976–8.
43. Pieri M, Fominskiy E, Nardelli P, Bonizzoni MA, Scandroglio AM. CytoSorb purification in critically ill SARS-CoV-2 patients. *Int J Artif Organs*. 2022;45(2):216–20. <https://doi.org/10.1177/03913988211052572> PMID: 34702109
44. Traeger KFG, Schröder J, Petscher M, Reinelt H. Elimination of free hemoglobin with CytoSorb during ECLS. In: EuroELSO 2016, 2016.
45. Meagher J, Hendricks J, Eatroff A. Cytokine adsorption as an adjunctive treatment for patients with immune-mediated hemolytic anemia receiving therapeutic plasma exchange: A case series of 3 dogs. *Vet Med (Auckl)*. 2023;14:103–10.
46. Ohrem HSK, Saenger F, Doerfelt R. Effect of hemodialysis and hemoperfusion using Cytosorb® adsorber on bilirubin in dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2023.
47. Paddon CA, Marken F. Hemoglobin adsorption into TiO2 phytate multi-layer films: particle size and conductivity effects. *Electrochemistry Communications*. 2004;6(12):1249–53. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2004.09.025>
48. Jansen A, Waalders NJB, van Lier DPT, Kox M, Pickkers P. CytoSorb hemoperfusion markedly attenuates circulating cytokine concentrations during systemic inflammation in humans in vivo. *Crit Care*. 2023;27(1):117. <https://doi.org/10.1186/s13054-023-04391-z> PMID: 36945034
49. Wu S, Yue P, Ma Y, Zou Y, Liang W, Ye Q. Hemoperfusion adsorbents for removal of common toxins in liver and kidney failure: recent progress, challenges, and prospects. *Advanced Materials*. 2023. <https://doi.org/10.1002/adma.2305152>
50. Träger K, Skrabal C, Fischer G, Datzmann T, Schroeder J, Fritzler D, et al. Hemoadsorption treatment of patients with acute infective endocarditis during surgery with cardiopulmonary bypass - a case series. *Int J Artif Organs*. 2017;40(5):240–9. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000583> PMID: 28525670
51. Koster A, Warkentin H, von Dossow V, Morshuis M. Use of the CytoSorb® filter for elimination of residual therapeutic argatroban concentrations during heparinized cardiopulmonary bypass for heart transplantation. *Perfusion*. 2023;38(5):1088–91. <https://doi.org/10.1177/02676591221093875> PMID: 35619539
52. Sänger F, Bergmann M, Hartmann K, Dörfelt R. Supportive treatment of a dog with leishmaniosis and severe glomerulopathy with immunoadsorption. *Pathogens*. 2024;13(3).
53. Mitzner S, Kogelmann K, Ince C, Molnár Z, Ferrer R, Nierhaus A. Adjunctive Hemoadsorption Therapy with CytoSorb in Patients with Septic/Vasoplegic Shock: A Best Practice Consensus Statement. *J Clin Med*. 2023;12(23):7199. <https://doi.org/10.3390/jcm12237199> PMID: 38068250
54. Schädler D, Pausch C, Heise D, Meier-Hellmann A, Brederlau J, Weiler N, et al. The effect of a novel extracorporeal cytokine hemoadsorption device on IL-6 elimination in septic patients: A randomized controlled trial. *PLoS One*. 2017;12(10):e0187015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187015> PMID: 29084247
55. Poli EC, Alberio L, Bauer-Doerries A, Marcucci C, Roumy A, Kirsch M, et al. Cytokine clearance with CytoSorb® during cardiac surgery: a pilot randomized controlled trial. *Crit Care*. 2019;23(1):108. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2399-4> PMID: 30944029

IV. DISKUSSION

In der vorliegenden Studie wurde erstmals die Wirksamkeit des Cytosorb®-Adsorbers zur Elimination von zellfreiem Hämoglobin (cfHb) aus Hundeblut *in vitro* untersucht. Derzeit ist dieser in der Humanmedizin zur Entfernung von Zytokinen und bestimmten Medikamenten zugelassen (CALABRO et al., 2019; HAWCHAR et al., 2022). Für die vorliegende Studie wurde abgelassenes Hundeblut aus der hauseigenen Blutbank vollständig hämolysiert. Im Anschluss wurde die cfHb-Lösung in einem in-vitro-Aufbau durch ein extrakorporales Blutkreislaufsystem und den Cytosorb®-Adsorber geleitet. Dabei kamen ein linearer und ein zirkulärer Versuchsaufbau zum Einsatz. Grundlage der Studie war der lineare Versuchsaufbau. Die cfHb-Lösung wurde aus einem Beutel durch den Adsorber geleitet und in einem separaten Beutel gesammelt. Da die Zulaufkonzentration von cfHb konstant blieb, erfolgte die Probenahme in definierten Intervallen nach dem Adsorber. Beim zirkulären Versuchsaufbau zirkulierte die Hundeblutmischung dagegen in einem geschlossenen Kreislauf wiederholt durch den Cytosorb®-Adsorber. Dieser Aufbau stellt gleichzeitig den realistischeren Versuchsaufbau für in-vivo-Verfahren dar. Hierbei wurden in regelmäßigen Abständen vor und nach dem Cytosorb®-Adsorber cfHb-Proben entnommen, bis eine konstante cfHb-Konzentration vor und nach dem Adsorber erreicht war und sich die cfHb-Konzentration nicht mehr veränderte. Zusätzlich wurde ein Kontrolldurchlauf ohne Cytosorb®-Adsorber über einen Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt. Damit sollte sichergestellt werden, dass die Reduktion der cfHb-Konzentration tatsächlich durch den Cytosorb®-Adsorber verursacht wurde und die cfHb-Konzentration ohne Adsorber konstant blieb. Beim linearen Versuchsaufbau wurden im Durchschnitt 3,3 Liter verarbeitet und median konnten 12,1 Gramm (11,9 — 23,5 g) cfHb entfernt werden. Das entspricht einer prozentualen Reduktion um median 17,8 %. Im zirkulären Versuchsaufbau betrug das durchschnittliche Beutelvolumen 2,1 Liter. Dabei wurden median 17,4 Gramm (14,6 — 19,0 g) cfHb nach einem Durchlauf von 13 Litern (13,0 — 14,0 Liter) entfernt. Im Kontrolldurchlauf wurde eine unveränderte cfHb-Konzentration über 24 Stunden festgestellt. Die medianen Reduktionen von 17,8 % (14,7 — 26,8 %) im linearen und 41,3 % (35 — 46,1 %) im zirkulären Durchlauf belegen die prinzipielle Eignung dieses Systems zur effektiven Reduktion von cfHb in einer

Hundeblutmischung. Dies ist ein vielversprechender Schritt hin zur Implementierung dieser Technologie in der veterinärmedizinischen Intensivmedizin.

Die Funktionsweise des Cytosorb®-Adsorbers beruht dabei auf seinem Aufbau aus porösen Polymerbeads. Durch physikalisch-chemische Adsorption werden verschiedene Substanzen konzentrationsabhängig aus dem Blut entfernt. Der Cytosorb®-Adsorber adsorbiert vor allem hydrophobe Moleküle mit einer Größe von bis zu 60 Kilodalton (kDa) (HOUSCHYAR et al., 2017; ANKAWI et al., 2019; KRENN & STELTZER, 2021a). Damit liegt cfHb mit 64,5 kDa im oberen Bereich des Adsorptionsspektrums (PADDON & MARKEN, 2004). Da cfHb jedoch überwiegend hydrophil ist und nur wenige hydrophobe Anteile besitzt, erfüllt es nur teilweise die Voraussetzungen für eine Adsorption mit dem Cytosorb®-Adsorber.

In der vorliegenden in-vitro-Studie wurden zwei verschiedene Versuchsmodelle gewählt. Zum einen der lineare Versuchsaufbau mit einem einmaligen Durchfluss des Hundeblutes durch den Cytosorb®-Adsorber und zum anderen der zirkuläre Versuchsaufbau mit einer kontinuierlichen Rezirkulation des Hundeblutes durch den Cytosorb®-Adsorber. Der lineare Versuchsaufbau diente dazu, die sich mit der Zeit ändernde Reaktion des Cytosorb®-Adsorbers bei konstanter cfHb-Konzentration vor dem Adsorber aufzuzeigen. Der zirkuläre Versuchsaufbau stellt dafür ein realistischeres in-vivo-Modell mit konstanter Rezirkulation durch den Cytosorb®-Adsorber dar. Die Ergebnisse zeigen deutliche Unterschiede im Adsorptionsverhalten, die sowohl methodisch als auch klinisch relevante Implikationen besitzen.

Im linearen Versuchsaufbau zeigte sich eine initial sehr hohe Adsorptionsrate, insbesondere innerhalb des ersten Liters der cfHb-haltigen Lösung. Dieser Effekt ist hauptsächlich auf den zu Beginn sehr ausgeprägten Konzentrationsgradienten zwischen der cfHb-Lösung und dem Cytosorb®-Adsorber zurückzuführen. Nach ca. 2,2 Litern wurde jedoch ein Sättigungsplateau erreicht, sodass kaum weitere Adsorption stattfand. Diese Sättigung des Cytosorb®-Adsorbers trotz gleichbleibender cfHb-Konzentration vor dem Cytosorb®-Adsorber spricht für eine abnehmende Konzentrationsdifferenz innerhalb des Systems, die mit der fortschreitenden Sättigung des Adsorbers korreliert. Im Gegensatz dazu zeigte der

zirkuläre Versuchsaufbau eine deutlich längere Phase effektiver cfHb-Reduktion. Durch die kontinuierliche Rezirkulation der cfHb-haltigen Lösung blieb der Adsorptionsprozess über einen deutlich längeren Zeitraum erhalten, obwohl die Konzentration von cfHb vor dem Cytosorb®-Adsorber sank. Allerdings sinkt mit der Zeit auch die Adsorptionskapazität und nach der Verarbeitung von ca. 13 Litern kam es zu einer Stabilisierung der cfHb-Konzentration vor und nach dem Adsorber. Dies deutet auf eine vollständige Sättigung des Adsorbers beziehungsweise einen zu geringen Konzentrationsgradienten zwischen der cfHb-Lösung und dem Adsorber hin. Initial war die Adsorption von cfHb in den ersten 3 Litern deutlich stärker als im Verlauf des Versuchs. Dies entspricht auch den Ergebnissen des linearen Durchlaufs, der eine stärkere initiale Adsorption nachweist.

Verschiedene Studien aus der Humanmedizin zeigen ebenfalls eine erfolgreiche Adsorption von cfHb beim Menschen, was die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt. So konnte beispielsweise während längerer Herzoperationen eine signifikante Reduktion der cfHb-Konzentration durch den Cytosorb®-Adsorber nachgewiesen werden (GLEASON et al., 2019). Dies bestätigt die grundsätzliche Eignung des Adsorbers zur Elimination von cfHb. In einer anderen verblindeten Studie mit 35 Patienten, die sich einer elektiven kardiopulmonalen Bypass-Operation unterzogen, zeigte der Cytosorb®-Adsorber jedoch keinen Einfluss auf die cfHb- und Haptoglobin-Konzentration. Sekundäre Marker wie Laktatdehydrogenase (LDH) und Bilirubin wiesen jedoch auf einen moderaten Effekt des Adsorbers auf die Hämolyse hin (BERNARDI et al., 2019). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Adsorption von cfHb durch den Cytosorb®-Adsorber vor allem initial effektiv war, dass es dann jedoch zu einer Sättigung beziehungsweise Erschöpfung des Adsorbers kam und keine weitere Adsorption stattfand. In der Studie von Bernardi et al. wurden intraoperativ keine cfHb-Proben analysiert, sodass ein möglicher kurzfristiger Effekt des Adsorbers auf die cfHb-Konzentration unentdeckt blieb (BERNARDI et al., 2019). Für die klinische Anwendung bedeutet dies, dass regelmäßige Messungen der cfHb-Konzentration notwendig sind, um ein rechtzeitiges Austauschen des Adsorbers stattfinden zu können, um den optimalen Zeitpunkt für einen frühzeitigen Wechsel des Adsorbers zu bestimmen und so eine nachhaltige Senkung zu gewährleisten.

Eine weitere Fallserie berichtet über eine wirksame Verringerung von cfHb-

Konzentration bei Menschen, die sich einer extrakorporalen Lebensunterstützung (ECLS) mit dem Cytosorb®-Adsorber über 120 Stunden unterzogen. Bei den ECLS-Patienten konnte zunächst eine deutliche Reduktion der cfHb-Konzentration, gefolgt von einem Wiederanstieg nach ca. 12–24 Stunden, beobachtet werden. Die Implementierung eines regelmäßigen Wechsels des Cytosorb®-Adsorbers im Abstand von jeweils 24 Stunden konnte hier zu einer erneuten signifikanten Reduktion führen (TRAEGER K., 2016). Dabei bezog sich die Studie auf die Empfehlung des Herstellers, den Adsorber mindestens alle 24 Stunden zu wechseln (MAIR et al., 2022). Sowohl die vorliegende Studie als auch die ECLS-Studie legen nahe, dass die Adsorptionskapazität des Cytosorb®-Adsorbers für cfHb vor allem zu Beginn der Behandlung am höchsten ist und rasch erschöpft sein kann (TRAEGER K., 2016). Die Beobachtungen im linearen Versuchsaufbau deuten zudem darauf hin, dass bei hohen Ausgangskonzentrationen von cfHb kurzfristig eine hohe Adsorptionsrate erreicht werden kann. Dies kann insbesondere in Akutsituationen, wie beispielsweise bei massiver Hämolyse, therapeutisch genutzt werden. Zusammenfassend legen sowohl die Ergebnisse der vorliegenden Studie als auch die der ECLS-Studie nahe, dass die Adsorptionskapazität des Cytosorb®-Adsorbers vor allem zu Beginn hoch ist und schnell nachlässt (TRAEGER K., 2016). In der vorliegenden Studie zeigte sich zudem ein deutlicher Rückgang der Eliminationsrate mit steigendem gereinigtem Blutvolumen. Während zu Beginn 47,8 ml/min erreicht wurden, lag sie nach 0,9 Litern nur noch bei 13,3 ml/min. Diese Beobachtung unterstreicht die Notwendigkeit weiterer Studien, um optimale Einsatzstrategien und Wechselintervalle zu definieren. Neben cfHb können auch andere Moleküle wie Bilirubin, Myoglobin oder Zytokine durch den Cytosorb®-Adsorber effektiv entfernt werden (CALABRO et al., 2019; SCHARF et al., 2021; SONG et al., 2021). Interessanterweise zeigen sich dabei ähnliche Adsorptionsmuster auch bei Lipopolysacchariden (LPS), Interleukinen (IL) und Tumornekrosefaktor α (TNF- α). Zwar sinken die Konzentrationen zunächst deutlich, jedoch nimmt die Wirkung mit der Zeit ab (TRAEGER K., 2016; SCHÄDLER et al., 2017; MALARD et al., 2018; JANSEN et al., 2023). Dies verdeutlicht, dass die beobachtete Dynamik vermutlich kein cfHb-spezifisches Phänomen ist, sondern ein generelles Prinzip der Adsorberwirkung des Cytosorb®-Adsorbers darstellt. In der Veterinärmedizin wurde der speziell entwickelte VetResQ®-Adsorber eingesetzt. Dieser hat den gleichen Aufbau wie der Cytosorb®-Adsorber und wurde ebenfalls von der Firma

CytoSorbents[®] hergestellt. Bei einem Hund mit Hitzschlag und akutem Nierenversagen wurde der VetResQ[®]-Adsorber in Kombination mit einer Dialyse verwendet. Es wurde zunächst eine deutliche Reduktion der Zytokin-Konzentrationen von IL-6, IL-8, IL-10 beobachtet, die dann wieder anstiegen. In dieser Studie konnte vor allem in den ersten fünf bis 30 Minuten, bis hin zu 60 Minuten, ein deutlicher Abfall der verschiedenen Zytokine beobachtet werden, die danach wieder anstiegen. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen der vorliegenden in-vitro-Studie zur cfHb-Konzentration. Nach 60 Minuten konnte teilweise ein erneuter Anstieg einzelner Interleukine beobachtet werden (TRACY et al., 2022). Zum einen kann dies daran liegen, dass die Adsorptionskapazität erschöpft war, wie es auch in der vorliegenden In-vitro-Studie der Fall war. Der erneute Anstieg der Zytokin-Konzentrationen lässt sich jedoch damit erklären, dass es sich im Fallbericht um einen lebenden Hund von Tracey et al. handelt. Daher kann es auch zu einer stärkeren Neubildung und Freisetzung von Zytokinen gekommen sein. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Kontaktzeit des Blutes mit dem Adsorber beziehungsweise die Flussrate nicht ausreichend war (TRACY et al., 2022). In einer ex-vivo-Studie beim Pferd wurden zudem Zytokin- und LPS-Konzentrationen unter dem Einfluss des VetResQ[®]-Adsorbers untersucht. Auch in dieser Studie war die deutlichste Reduktion der untersuchten Substanzen in der ersten Stunde zu beobachten (HOBBS et al., 2024b). Zusätzlich zeigen die Beobachtungen in einem anderen Fallbericht von Hobbs bei einem Pferd mit *Clostridien*-Infektion und starker systemischer Entzündungsreaktion ein ähnliches Muster wie in der vorliegenden in-vitro-Studie mit Hundeblut. In beiden Fällen konnte zu Beginn eine deutliche Reduktion inflammatorischer Mediatoren beziehungsweise von cfHb nachgewiesen werden, die jedoch im Verlauf rasch abnahm (HOBBS et al., 2024b; HOBBS et al., 2024a). Das zeitlich begrenzte Wirkfenster legt nahe, dass sowohl bei cfHb als auch bei Zytokinen die Adsorptionskapazität des Adsorbers schnell erschöpft sein kann. Zudem verdeutlichen die Studien und Fallberichte, dass nach der initialen Phase entweder ein Wechsel des Adsorbers oder zusätzliche therapeutische Maßnahmen erforderlich sind, um eine längerfristige Senkung der Zielmoleküle zu erreichen. In einem Fallbericht von Meagher et al. wurden drei Hunde, die an einer schweren Form einer IMHA litten und nicht erfolgreich auf eine Standardtherapie ansprachen, mittels einer TPE in Kombination mit dem VetResQ[®]-Adsorber behandelt. Es konnte eine Abnahme des CRP-Wertes, der mit Zytokin-

Konzentrationen korreliert, beobachtet werden, sowie eine Verbesserung der klinischen Symptome und eine erfolgreiche Reduktion des Bilirubins über die mehrfachen Sitzungen beobachtet werden. Zudem wurde der Cytosorb®-Adsorber erfolgreich in Kombination mit TPE zur Behandlung einer Ibuprofen-Intoxikation bei einem Hund eingesetzt. Die Ibuprofen-Konzentration im Blut konnte dadurch um 82 % reduziert werden (GIANI et al., 2023). Es ist jedoch in beiden Fallberichten unklar, in welchem Umfang hierfür die TPE und zu welchem Umfang der Cytosorb®-Adsorber dafür verantwortlich sind (GIANI et al., 2023; MEAGHER et al., 2023). Um dies weiter zu differenzieren, sind Studien, die die Kombination von TPE mit Hämo-perfusion und Hämo-perfusion ohne TPE untersuchen, nötig. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung sowie die Befunde aus weiteren Studien und Fallberichten stützen die Hypothese, dass die Adsorptionsleistung des Cytosorb® beziehungsweise VetResQ®-Adsorbers initial besonders hoch ist, jedoch durch eine rasche Sättigung der Bindungskapazität oder einen abnehmenden Konzentrationsgradienten schnell an Effektivität verliert (HOBBS et al., 2024b; HOBBS et al., 2024a). Diese Beobachtung unterstreicht die Notwendigkeit eines frühzeitigen und gegebenenfalls wiederholten Wechsels des Adsorbers, um eine kontinuierliche Wirksamkeit sicherzustellen und den therapeutischen Nutzen über den gesamten Behandlungszeitraum hinweg aufrechtzuerhalten. Zukünftige Studien sollten daher cfHb- und Zytokin-Messungen in regelmäßigen Abständen durchführen, um den optimalen Wechselzeitpunkt zu bestimmen. Zudem sollten in-vivo-Modelle genutzt werden, um die Dynamik zwischen Gewebsfreisetzung und Adsorption besser zu verstehen sowie die Kombination mit anderen extrakorporalen Verfahren wie TPE oder Dialyse zu evaluieren, um den Gesamteffekt auf cfHb, Zytokine und klinische Endpunkte klarer abzugrenzen. Die Ergebnisse der vorliegenden in-vitro-Studie mit Hundeblut liefern somit eine wichtige Grundlage für den zukünftigen Einsatz dieser Technologie in der veterinärmedizinischen sowie humanmedizinischen Intensivmedizin.

Ein wesentlicher limitierender Faktor der Adsorptionskapazität ist der abnehmende Konzentrationsgradient zwischen cfHb-Lösung und Cytosorb®-Adsorber. Zusätzlich könnten auch physikalische Veränderungen des Adsorbermaterials, etwa die Aggregation von cfHb auf der Oberfläche oder eine mikroskopische Beads-Degradation zu einem Rückgang der Adsorptionseffizienz führen. Es gibt zudem

Studien, die über mögliche Verstopfungsprobleme beziehungsweise Adsorptionsprobleme des Cytosorb®-Adsorbers berichten, insbesondere bei längerer Nutzungsdauer oder hohen Konzentrationen (SCHÄDLER et al., 2017; MITZNER et al., 2023). Diese Faktoren könnten die in unserer Studie beobachtete Abnahme der Adsorptionsleistung zusätzlich erklären.

Die vorliegende Studie bestätigt, dass der Cytosorb®-Adsorber cfHb wirksam aus Hundeblut reduzieren kann, auch wenn er sich mit 64,5 kDa an der oberen Grenze des Adsorptionsspektrums befindet. Dies deckt sich mit den Befunden von Hobbs et al., die in einem ex-vivo-Modell zeigten, dass größere Moleküle an der Grenze des Adsorptionsspektrums weniger effizient adsorbiert werden als kleinere Moleküle im mittleren Bereich. Damit wird die prinzipielle Funktionsweise des Adsorbers auch für Moleküle im Grenzbereich bestätigt (HOBBS et al., 2024b). Zur weiteren Validierung dieser Hypothese sind jedoch systematische Studien erforderlich, die den Einfluss von Molekülgröße, Adsorptionsspektrum und Materialveränderungen genauer untersuchen. Insbesondere sollte geklärt werden, ob und in welchem Ausmaß die Aggregation von cfHb oder strukturelle Veränderungen des Adsorbers die Effektivität einschränken. Dies bedeutet für die klinische Anwendung, dass insbesondere Moleküle an der oberen Grenze des Adsorptionsspektrums, wie cfHb, nur eingeschränkt und vor allem in der Anfangsphase effektiv entfernt werden können. Dies unterstreicht die Notwendigkeit eines frühzeitigen und wiederholten Wechsels des Adsorbers, um eine kontinuierliche Wirksamkeit sicherzustellen.

Da die Zusammensetzung der Ausgangslösungen in den einzelnen Durchläufen vergleichbar war, ist es unwahrscheinlich, dass die Unterschiede zwischen den Läufen auf konkurrierende Substanzen zurückzuführen sind. Die Ergebnisse deuten vielmehr darauf hin, dass unterschiedliche cfHb-Ausgangskonzentrationen über den Konzentrationsgradienten einen wesentlichen Einfluss auf die Adsorptionsrate hatten. Im linearen Aufbau zeigte der erste Durchlauf mit 2,3 mmol/l eine deutlich stärkere Reduktion von cfHb als die folgenden Durchläufe mit niedrigeren Ausgangskonzentrationen. Dies unterstützt die Annahme, dass die Wirksamkeit des Cytosorb®-Adsorbers maßgeblich von der Höhe des Konzentrationsgradienten abhängt. Für die klinische Praxis könnte dies bedeuten, dass insbesondere in Akutsituationen mit sehr hohen cfHb-Werten kurzfristig ein hoher therapeutischer

Effekt erzielt werden kann. Umgekehrt sinkt die Effizienz bei niedrigeren Ausgangskonzentrationen deutlich, was die Notwendigkeit eines frühzeitigen Wechsels des Adsorbers unterstreicht.

Ein weiterer kritischer Parameter ist die Flussrate. In der vorliegenden Studie wurde mit 100 ml/min gearbeitet, was dem vom Hersteller empfohlenen Minimalwert entspricht (MAIR et al., 2022). Eine höhere Flussrate könnte zwar die Kontaktzeit zwischen Blut und Adsorber verringern und damit die pro Liter entfernte cfHb-Menge reduzieren, gleichzeitig jedoch größere Blutvolumina exponieren und so die Gesamteffizienz erhöhen. Dieser Zusammenhang ist bislang unzureichend untersucht und sollte in künftigen Studien systematisch analysiert werden. In diesem Kontext sind auch die Unterschiede zwischen linearem und zirkulärem Aufbau relevant: Während der zirkuläre Versuchsaufbau durch Rezirkulation die klinischen Bedingungen realistischer abbildet, erlaubt der lineare Aufbau wertvolle Einblicke in das Sättigungsverhalten des Adsorbers unter konstanten Bedingungen. Beide Modelle liefern somit komplementäre Informationen, die für die Interpretation der Ergebnisse entscheidend sind.

Die Antikoagulation mit 10.000 I.E./l Heparin lag deutlich über der üblichen klinischen Dosis. Zwar wurde in der vorliegenden Studie keine Gerinnselbildung beobachtet, eine mögliche Adsorption von Heparin am Cytosorb®-Adsorber kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Da bekannt ist, dass andere Antikoagulanzen wie Ticagrelor oder Rivaroxaban adsorbiert werden können, stellt Heparin eine potenzielle Einflussgröße dar, die in klinischen Settings berücksichtigt werden sollte.

Der Kontrolldurchlauf zeigte eine stabile cfHb-Konzentration über 24 Stunden. Dies verdeutlicht, dass cfHb unter den gewählten Bedingungen nicht spontan zerfällt und die beobachtete Reduktion ausschließlich auf die Adsorberwirkung zurückzuführen ist. Damit liefert die Studie wichtige Hinweise zur klinischen Relevanz: Zum einen belegt sie, dass der Cytosorb®-Adsorber in der Lage ist, cfHb wirksam zu entfernen. Zum anderen zeigt sich, dass seine Effizienz stark von den Ausgangsbedingungen, insbesondere dem Konzentrationsgradienten, der Flussrate und der möglichen Adsorption begleitender Substanzen, abhängt.

Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse besitzen sowohl für die Human- als

auch für die Tiermedizin eine hohe praktische Relevanz. Insbesondere in Situationen mit starker Hämolyse könnte der Cytosorb®-Adsorber zur Reduktion toxischer cfHb-Spiegel beitragen und so die klinische Prognose verbessern. Mit den Ergebnissen dieser in-vitro-Studie eröffnet sich die Möglichkeit, diese Methode in der Veterinärmedizin zur Behandlung von Patienten mit intravasaler Hämolyse, wie sie beispielsweise bei einer immunvermittelten hämolytischen Anämie (IMHA) oder einer Babesiose auftritt einzusetzen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sowie die der anderen bereits erwähnten Studien unterstreichen die Notwendigkeit eines individualisierten Managements. Dazu müssen regelmäßige Blutuntersuchungen auch während der Hämo-perfusion, rechtzeitige Wechsel des Adsorbers und gegebenenfalls eine Anpassung der Flussraten durchgeführt werden, um eine kontinuierlich hohe Adsorptionseffizienz sicherzustellen (MEAGHER et al., 2023; HOBBS et al., 2024b; HOBBS et al., 2024a). Prospektive Studien sind erforderlich, um optimale Therapieprotokolle zu entwickeln.

Darüber hinaus könnte der Einsatz des Cytosorb®-Adsorbers in der Veterinärmedizin über die Elimination von cfHb hinausgehen. Studien aus der Humanmedizin belegen eine erfolgreiche Entfernung endogener Substanzen, wie Zytokine oder Lipopolysaccharide (LPS), sowie exogener Substanzen, wie beispielsweise toxischen Arzneimittelkonzentrationen (LANG et al., 2020; JANSEN et al., 2023). Die extrakorporalen Blutreinigungsverfahren gewinnen bei der Intoxikationsbehandlung zunehmend an Bedeutung (GROOVER et al., 2022a). Hier sollte auch der Cytosorb®-Adsorber in Zukunft stärker in Betracht gezogen werden. Zudem deuten auch erste Untersuchungen in der Veterinärmedizin auf eine erfolgreiche Entfernung von Zytokinen durch den VetResQ®-Adsorber hin (MEAGHER et al., 2023; HOBBS et al., 2024b; HOBBS et al., 2024a). Das heißt, dass der Cytosorb®-Adsorber auch in der Veterinärmedizin bei Patienten mit Sepsis in Betracht gezogen werden sollte, um den Zytokinsturm zu reduzieren. Die Studie von Ohrem et al. konnte zudem zeigen, dass die Hämo-perfusion mit dem Cytosorb®-Adsorber bei Hunden eine deutlich effektivere Reduktion von Bilirubin ermöglicht als die alleinige Hämodialyse (OHREM et al., 2023). Dieses Ergebnis wird durch den Fallbericht von Meagher et al. unterstützt, in dem eine signifikante Absenkung der Bilirubin-Konzentrationen mithilfe des VetResQ®-Adsorbers beschrieben wurde (MEAGHER et al., 2023). Zusammengefasst weisen diese

Befunde darauf hin, dass der Einsatz von Adsorbern nicht nur bei intravasaler Hämolyse, sondern auch im Kontext zur Elimination von Bilirubin, beispielsweise von Leberfunktionsstörungen und gegebenenfalls zur Intoxikationsbehandlung eine relevante therapeutische Option darstellen könnte. Um dieses Potenzial jedoch zuverlässig in die klinische Praxis zu übertragen, sind weitere prospektive Studien erforderlich, um den optimalen Einsatzzeitpunkt und die Wirksamkeit im Vergleich zu etablierten Verfahren systematisch zu evaluieren und standardisierte Behandlungsprotokolle zu entwickeln.

Der Einfluss zellulärer Bestandteile wie Erythrozyten, Leukozyten und Zelltrümmer wurde nicht systematisch untersucht. Zwar adsorbiert der Cytosorb®-Adsorber aufgrund der großen Molekülgröße keine intakten Zellen, jedoch könnte Zelltrümmersmaterial theoretisch zu einer mechanischen Beeinträchtigung der Adsorberfunktion führen (ANKAWI et al., 2019). Es ist in der vorliegenden Studie unklar, ob die Anwesenheit von roten Blutkörperchen, Thrombozyten oder Zytokinen die Effizienz des Cytosorb®-Adsorbers beeinflusst. Studien aus der Humanmedizin haben jedoch gezeigt, dass die Konzentration von Albumin und Thrombozyten *in vivo* nicht klinisch signifikant von dem Cytosorb®-Adsorber beeinflusst wird (SCHÄDLER et al., 2017; POLI et al., 2019b; MITZNER et al., 2023). Auch in den bisher vorliegenden veterinärmedizinischen Fallberichten konnte ein leichter Abfall des Albumins ohne klinische Relevanz festgestellt werden. Die Leukozyten- und Thrombozytenzahl blieben dabei unbeeinflusst (MEAGHER et al., 2023; HOBBS et al., 2024c). In der Studie von Hobbs et al. wurde eine signifikante Reduktion relevanter Medikamente im ex-vivo-Modell, wie beispielsweise Gentamicin, beobachtet (HOBBS et al., 2024b). Dies ist therapeutisch relevant, da parallel eingesetzte Medikamente durch die Adsorption in ihrer Wirkung abgeschwächt werden können. Standardisierte Protokolle fehlen bisher, weshalb weitere Studien dringend erforderlich sind.

Da die extrakorporalen Blutreinigungsverfahren in der Veterinärmedizin allgemein zunehmend an Bedeutung gewinnen, sollte auch der Einsatz des Cytosorb®-Adsorbers in Zukunft weiter in Betracht gezogen werden (SCHWEIGHAUSER & FRANCEY, 2017; GROOVER et al., 2022a). Studien aus der Humanmedizin zeigen, dass der Cytosorb®-Adsorber auch exogene Giftstoffe aus dem Blut adsorbieren kann, wie beispielsweise toxische Dosen von Medikamenten. Die

Substanzen müssen lipophil sein und die weiteren Bedingungen für die Adsorption des Cytosorb®-Adsorbers erfüllen. Beispiele hierfür sind zum Beispiel MDMA, Antidepressiva oder Schmerzmittel (LANG et al., 2020; PALAND, 2021; MITROVIC et al., 2022; REUCHSEL & GONNERT, 2022). Auch in der Veterinärmedizin kommt es immer wieder zu Intoxikationen mit Drogen oder Medikamenten in schädlichen oder sogar letalen Dosen (CHILLA et al., 2010; GROOVER et al., 2022a). Der Cytosorb®-Adsorber ist aufgrund seines Aufbaus in der Lage, lipophile Substanzen und Substanzen, die bis jetzt zu groß waren, um mit den herkömmlichen extrakorporalen Blutreinigungsverfahren entfernt zu werden, zu eliminieren. Dies ist ein wichtiger und interessanter Ansatz für die veterinärmedizinische Intensivmedizin. Dazu bedarf es jedoch weiterer Studien, um dieses Anwendungsgebiet weiter zu erforschen.

Die geringe Anzahl an Versuchsdurchläufen limitiert die Aussagekraft der Studie. Dennoch ermöglicht das konsistente Adsorptionsverhalten Rückschlüsse auf die Kapazität des Cytosorb®-Adsorbers. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse wird zudem durch Unterschiede in den Startkonzentrationen und Volumina der cfHb-Lösungen eingeschränkt. Für zukünftige Untersuchungen wären standardisierte Ausgangsbedingungen mit definierten Blutvolumina und Startkonzentrationen wünschenswert. Hinzu kommt, dass der erste Messzeitpunkt durch Verdünnungseffekte mit der Spüllösung beeinflusst worden sein könnte. Diese machte etwa 6–10 % des Gesamtvolumens aus und könnte die initiale cfHb-Konzentration abgesenkt haben. Der Effekt wurde in den Resultaten berücksichtigt und entsprechend einberechnet. Da es sich um eine in-vitro-Studie handelt, bildet das Versuchsdesign nicht die klinische Situation einer dynamischen cfHb-Freisetzung ab, wie sie bei Patienten mit laufender Hämolyse zu erwarten ist. Zudem wurde die Adsorption anderer relevanter Moleküle wie Bilirubin oder Zytokine nicht berücksichtigt, obwohl diese bei Hämolyse häufig gleichzeitig erhöht sind. Ein weiteres Limit stellt das Ein-Kompartiment-Modell dar, das keine Verteilungsvorgänge in verschiedene Körperkompartimente abbilden kann und somit die Übertragbarkeit auf die in-vivo-Situation einschränkt.

Zusammenfassend zeigt die Studie, dass der zirkuläre Versuchsaufbau dem linearen Modell hinsichtlich einer längerfristigen cfHb-Reduktion überlegen ist. Die Adsorptionsleistung erwies sich jedoch als abhängig von mehreren Faktoren,

darunter die Ausgangskonzentration von cfHb, der Konzentrationsgradient, die Flussrate sowie potenzielle Interferenzen durch andere Moleküle. Insgesamt legen die Ergebnisse nahe, dass der Cytosorb®-Adsorber ein vielversprechendes Instrument zur Reduktion toxischer cfHb-Konzentrationen darstellt – sowohl im experimentellen als auch im klinischen Kontext. Seine Anwendung erfordert jedoch ein individualisiertes Management, das auf regelmäßigen Blutuntersuchungen, rechtzeitigem Wechsel des Adsorbers und einer Anpassung der Flussraten basiert, um eine kontinuierliche Effektivität sicherzustellen. Prospektive in-vivo Studien, insbesondere in der Veterinärmedizin, sind erforderlich, um diese Befunde zu bestätigen und in standardisierte therapeutische Konzepte zu überführen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Zellfreies Hämoglobin (cfHb), welches bei Hämolyse entsteht, besitzt potenziell toxische Eigenschaften und kann insbesondere zur akuten Nierenschädigung führen. Ziel dieser in-vitro-Studie war es, zu untersuchen, inwieweit cfHb aus hämolysiertem Hundeblut durch Hämoperfusion mittels eines Cytosorb®-Adsorbers entfernt werden kann.

Hierzu wurden ein linearer und ein zirkulärer Versuchsaufbau jeweils mit drei unabhängigen Durchläufen bei einer konstanten Flussrate von 100 ml/min eingesetzt. Die Hämolyse wurde durch die Zugabe von destilliertem Wasser induziert, die Osmolarität durch hypertonische Kochsalzlösung angepasst und die Antikoagulation durch Heparin (10.000 I.E./l) gewährleistet. Die cfHb-Konzentrationen wurden mithilfe eines XT-2000iV®-Hämatologie-Analyzers (Sysmex) bestimmt. Ein Kontrollaufbau ohne Adsorber diente der Beurteilung der cfHb-Stabilität über 24 Stunden.

Im linearen Versuchsaufbau wurde ein medianes Volumen von 3,3 Litern (3,0 — 3,4 Litern) verarbeitet. Die cfHb-Konzentration sank dabei median um 17,8 % (14,7 — 26,8 %). Das entspricht einer cfHb-Menge von durchschnittlich 12,1 g (11,9 — 23,5 g). Nach der Verarbeitung von 2,4 Litern war keine weitere Reduktion nachweisbar. Die cfHb-Clearance sank von 47,8 ml/min (40,0 — 52,9 ml/min) bei 0,1 Litern von verarbeitetem Hundeblut auf 6,7 ml/min (5,9 — 8,7 ml/min) bei 3,2 Litern.

Im zirkulären System wurde eine höhere Eliminationsrate erreicht. Die cfHb-Konzentration sank um median 41,3 % (35,0 — 46,1 %), entsprechend 17,4 g (14,6 — 19,0 g) cfHb nach einem medianen Volumen von 13,0 Litern. Die maximale Adsorberkapazität war in diesem Versuchsaufbau nach median 13 Litern (13 – 14 Liter) erreicht. Die cfHb-Clearance nahm in beiden Systemen über die Zeit ab. Die cfHb-Clearance sank von 30,0 ml/min (20,0 — 36,4 ml/min) bei 0,2 Litern von verarbeitetem Hundeblut auf 11,1 ml/min (0,0 — 20,0 ml/min) bei 3 Litern und auf 0,0 ml/min (0,0 — 0,0 ml/min) bei 24 Litern.

Im Versuchsaufbau, der zur Kontrolle ohne Cytosorb®-Adsorber für 24 Stunden im zirkulären Versuchsaufbau durchgeführt wurde, konnte eine stabile Konzentration von 0,6 mmol/l festgestellt werden.

Diese Ergebnisse belegen, dass die Hämo-perfusion mit dem Cytosorb®-Adsorber unter definierten in-vitro-Bedingungen zur Reduktion von zellfreiem Hämoglobin aus hämolysiertem Hundeblut geeignet ist. Die gewonnenen Erkenntnisse bieten eine experimentelle Grundlage für zukünftige Untersuchungen zur therapeutischen Relevanz cfHb-spezifischer Blutreinigungsverfahren.

VI. SUMMARY

Cell-free hemoglobin (cfHb) exhibits potentially toxic properties and may contribute to the development of acute kidney injury. The aim of this *in vitro* study was to investigate the extent to which cfHb can be removed from hemolyzed canine blood using hemoperfusion with a Cytosorb® adsorber.

Two experimental extracorporeal circulation setups—a linear and a circular setup—were used, each with three independent runs at a constant flow rate of 100 ml/min. The addition of distilled water induced hemolysis, and osmolarity was adjusted with hypertonic saline. Anticoagulation was achieved using heparin (10,000 international units/l). CfHb concentrations were measured using the XT-2000iV® hematology analyzer (Sysmex). A control setup without an adsorber was maintained over 24 hours to assess cfHb stability.

In the linear system, a median volume of 3.3 liters (3.0 — 3.4 l) was processed. The cfHb concentration decreased by a median of 17.8 % (14.7 — 26.8 %). This represents an average removal of 12.1 g (11.9 — 23.5 g) of cfHb. No further reduction was observed after processing 2.4 liters. The cfHb-clearance decreased from 47.8 ml/min (40.0 — 52.9 ml/min) at 0.1 liters of processed cfHb solution to 6.7 ml/min (5.9 — 8.7 ml/min) at 3.2 liters. In the circular system, a greater elimination capacity was achieved: cfHb concentration decreased by a median of 41.3 % (35.0 — 46.1 %), corresponding to 17.4 g (14.6 — 19.0 g) cfHb removal after a median volume of 13.0 liters (13.0 — 14.0 l). The maximum adsorber capacity was reached at approximately 13 liters in this setup. The cfHb clearance decreased from 30.0 ml/min (20.0 — 36.4 ml/min) at 0.2 liters of processed cfHb solution to 11.1 ml/min (0.0 — 20.0 ml/min) at 3 liters and to 0.0 ml/min (0.0 — 0.0 ml/min) at 24 liters. The cfHb concentration in the control setup remained stable throughout the observation period.

These findings demonstrate that hemoperfusion using the Cytosorb® adsorber can reduce cell-free hemoglobin from hemolyzed canine blood under defined *in vitro* conditions. The results provide an experimental foundation for future investigations into the therapeutic relevance of cfHb-targeted blood purification technique.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abel JJ, Rowntree LG, Turner BB. On the removal of diffusable substances from the circulating blood by means of dialysis. Transactions of the Association of American Physicians, 1913. Transfusion Science 1990; 11: 164-5.

Acierno MJ, Labato MA. Preface: Kidney Diseases and Renal Replacement Therapies. Veterinary Clinics: Small Animal Practice 2011; 41: 11-2.

Ankawi G, Xie Y, Yang B, Xie Y, Xie P, Ronco C. What Have We Learned about the Use of Cytosorb Adsorption Columns? Blood Purif 2019; 48: 196-202.

Ascenzi P, Bocedi A, Visca P, Altruda F, Tolosano E, Beringhelli T, Fasano M. Hemoglobin and heme scavenging. IUBMB Life 2005; 57: 749-59.

Baek JH, Zhang X, Williams MC, Schaer DJ, Buehler PW, D'Agnillo F. Extracellular Hb enhances cardiac toxicity in endotoxemic guinea pigs: protective role of haptoglobin. Toxins (Basel) 2014; 6: 1244-59.

Becker S, Lang H, Vollmer Barbosa C, Tian Z, Melk A, Schmidt BMW. Efficacy of CytoSorb(R): a systematic review and meta-analysis. Crit Care 2023; 27: 215.

Bernardi MH, Rinoesl H, Ristl R, Weber U, Wiedemann D, Hiesmayr MJ. Hemoadsorption does not Have Influence on Hemolysis During Cardiopulmonary Bypass. Asaio j 2019; 65: 738-43.

Bloom CA, Labato MA. Intermittent Hemodialysis for Small Animals. Veterinary Clinics: Small Animal Practice 2011; 41: 115-33.

Boretti FS, Buehler PW, D'Agnillo F, Kluge K, Glaus T, Butt OI, Jia Y, Goede J, Pereira CP, Maggiorini M, Schoedon G, Alayash AI, Schaer DJ. Sequestration of extracellular hemoglobin within a haptoglobin complex decreases its hypertensive and oxidative effects in dogs and guinea pigs. J Clin Invest 2009; 119: 2271-80.

Bottari G, Guzzo I, Cappoli A, Labbadia R, Perdichizzi S, Serpe C, Creteur J, Cecchetti C, Taccone FS. Impact of CytoSorb and CKRT on hemodynamics in pediatric patients with septic shock: the PedCyto study. *Front Pediatr* 2023; 11: 1259384.

Bouchama A, Knochel JP. Heat Stroke. *New England journal of medicine* 2002; 346: 1978-88.

Breves G, Diener M, Gäbel G. Hämoglobin und Sauerstofftransport. In: *Physiologie der Haustiere*, 6., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage edn. Breves G, Diener M, Gäbel G, eds.: Thieme 2022:

Calabro MG, Febres D, Recca G, Lembo R, Fominskiy E, Scandroglio AM, Zangrillo A, Pappalardo F. Blood Purification With CytoSorb in Critically Ill Patients: Single-Center Preliminary Experience. *Artif Organs* 2019; 43: 189-94.

Chilla A, Scheulen S, Borchert J, Danner W, Neumann S. Common intoxications in the dog and cat - A review with case reports. *Praktische Tierarzt* 2010; 91: 948-59.

Condrea E. Hemolytic Effects of Snake Venoms. In: *Snake Venoms*. Lee C-Y, ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 1979: 448-79.

Cowgill LD, Guillaumin J. Extracorporeal renal replacement therapy and blood purification in critical care. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2013; 23: 194-204.

Crump KL, Seshadri R. Use of therapeutic plasmapheresis in a case of canine immune-mediated hemolytic anemia. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2009; 19: 375-80.

Deuel JW, Schaer CA, Boretti FS, Opitz L, Garcia-Rubio I, Baek JH, Spahn DR, Buehler PW, Schaer DJ. Hemoglobinuria-related acute kidney injury is driven by

intrarenal oxidative reactions triggering a heme toxicity response. *Cell Death Dis* 2016; 7: e2064.

Eden G, Schmidt JJ, Büttner S, Kämpers P, Hafer C, Rovas A, Koch BF, Schmidt BM, Kielstein JT. Safety and efficacy of the Seraph® 100 Microbind® Affinity Blood Filter to remove bacteria from the blood stream: results of the first in human study. *Critical care* 2022; 26: 181.

Felix S, Dörr M, Herda L, Beug D, Staudt A. Immunadsorption als Therapieverfahren der dilatativen Kardiomyopathie. *Der Internist* 2008; 1: 51-6.

Francey T, Schweighauser A. Regional citrate anticoagulation for intermittent hemodialysis in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2018; 32: 147-56.

Friesecke S, Stecher SS, Gross S, Felix SB, Nierhaus A. Extracorporeal cytokine elimination as rescue therapy in refractory septic shock: a prospective single-center study. *J Artif Organs* 2017; 20: 252-9.

Garden OA, Kidd L, Mexas AM, Chang YM, Jeffery U, Blois SL, Fogle JE, MacNeill AL, Lubas G, Birkenheuer A, Buoncompagni S, Dandrieux JRS, Di Loria A, Fellman CL, Glanemann B, Goggs R, Granick JL, LeVine DN, Sharp CR, Smith-Carr S, Swann JW, Szladovits B. ACVIM consensus statement on the diagnosis of immune-mediated hemolytic anemia in dogs and cats. *J Vet Intern Med* 2019; 33: 313-34.

Garratty G. Immune hemolytic anemia associated with drug therapy. *Blood Reviews* 2010; 24: 143-50.

Giani, Netikova, Herges, Dörfelt (2023) Reduction of serum ibuprofen concentration in a dog with hemoadsorption using the cytosorb adsorber and therapeutic plasma exchange In: 20th EVEC Congress (European Veterinary Emergency and Critical Care Congress). European Veterinary Emergency and Critical Care Society (EVECCS), Porto, Portugal 142

Gladwin MT, Crawford JH, Patel RP. The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 707-17.

Gleason TG, Argenziano M, Bavaria JE, Kane LC, Coselli JS, Engelman RM, Tanaka KA, Awad A, Sekela ME, Zwischenberger JB. Hemoadsorption to Reduce Plasma-Free Hemoglobin During Cardiac Surgery: Results of REFRESH I Pilot Study. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2019; 31: 783-93.

Gräfe C, Weidhase L, Liebchen U, Weigand M, Scharf C. Hämoperfusion in Anästhesie und Intensivmedizin: Chancen, Risiken und Evidenz verschiedener Systeme Hemoperfusion in anesthesia and intensive care medicine: benefits, risks, and evidence for different systems. *Die Anaesthesiologie* 2023; 72

Groover J, Londoño LA, Tapia-Ruano K, Iacovetta C. Extracorporeal blood purification in acutely intoxicated veterinary patients: A multicenter retrospective study (2011–2018): 54 cases. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2022a; 32: 34-41.

Groover J, Londoño LA, Tapia-Ruano K, Iacovetta C. Extracorporeal blood purification in acutely intoxicated veterinary patients: A multicenter retrospective study (2011–2018): 54 cases. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2022b; 32: 34-41.

Harky A, Badran A. Reducing antithrombotic-related bleeding risk in urgent and emergency cardiac surgery. *Br J Cardiol* 2021; 28: 26.

Hassan K, Kannmacher J, Wohlmuth P, Budde U, Schmoeckel M, Geidel S. Cytosorb Adsorption During Emergency Cardiac Operations in Patients at High Risk of Bleeding. *Ann Thorac Surg* 2019; 108: 45-51.

Hawchar F, Tomescu D, Trager K, Joskowiak D, Kogelmann K, Soukup J, Friesecke S, Jacob D, Gummert J, Falthausen A, Aucella F, van Tellingen M, Malbrain M, Bogdanski R, Weiss G, Herbrich A, Utzolino S, Nierhaus A, Baumann A, Hartjes A, Henzler D, Grigoryev E, Fritz H, Bach F, Schroder S, Weyland A,

Gottschaldt U, Menzel M, Zachariae O, Novak R, Berden J, Haake H, Quintel M, Kloesel S, Kortgen A, Stecher S, Torti P, Nestler F, Nitsch M, Olboeter D, Muck P, Findeisen M, Bitzinger D, Krassler J, Benad M, Schott M, Schumacher U, Molnar Z, Brunkhorst FM. Hemoadsorption in the critically ill-Final results of the International CytoSorb Registry. PLoS One 2022; 17: e0274315.

Hobbs KJ, Le Sueur ANV, Hallowell K, Martin E, Sheats MK, Ueda Y. Use of extracorporeal hemoperfusion therapy in an adult horse with *Clostridioides difficile* colitis and severe systemic inflammatory response syndrome. Journal of Veterinary Internal Medicine 2024a; 38: 2790-4.

Hobbs KJ, Davis JL, Cooper BL, Ueda Y, Burke MJ, Sheats MK. Hemadsorption extracorporeal therapy removes cytokines ex vivo in horses. Am J Vet Res 2024b; 85

Hobbs KJ, Le Sueur ANV, Burke MJ, Cooper BL, Sheats MK, Ueda Y. Feasibility of hemoperfusion using extracorporeal therapy in the horse. Frontiers in Veterinary Science 2024c; Volume 11 - 2024

Houschyar KS, Nietzschmann I, Siemers F. The Use of a Cytokine Adsorber (CytoSorb) in a Patient with Septic Shock and Multi-Organ Dysfunction (MODS) after a Severe Burn Injury. Handchir Mikrochir Plast Chir 2017; 49: 123-6.

Houschyar KS, Rein S, Weissenberg K, Duscher D, Philipps HM, Nietzschmann I, Schulz T, Siemers F. Management einer schweren Sepsis unter Einsatz eines Zytokin-Adsorbers. Der Unfallchirurg 2018; 121: 174-8.

Huber W, Algul H, Lahmer T, Mayr U, Lehmann M, Schmid RM, Faltlhauser A. Pancreatitis cytosorbents (CytoSorb) inflammatory cytokine removal: A Prospective Study (PACIFIC). Medicine (Baltimore) 2019; 98: e13044.

Iolascon A, Bianchi P, Andolfo I, Russo R, Barcellini W, Fermo E, Toldi G, Ghirardello S, Rees D, Van Wijk R, Kattamis A, Gallagher PG, Roy N, Taher A, Mohty R, Kulozik A, De Franceschi L, Gambale A, De Montalembert M, Forni GL,

Harteveld CL, Prchal J. Recommendations for diagnosis and treatment of methemoglobinemia. *Am J Hematol* 2021; 96: 1666-78.

Jansen A, Waalders NJB, van Lier DPT, Kox M, Pickkers P. CytoSorb hemoperfusion markedly attenuates circulating cytokine concentrations during systemic inflammation in humans in vivo. *Crit Care* 2023; 27: 117.

Krenn C, Steltzer H. Hämoadsorption zur Blutreinigung–Unvergleichbarkeit der klinisch angebotenen Verfahren. *Medizinische Klinik, Intensivmedizin Und Notfallmedizin* 2021a; 116: 449.

Krenn C, Steltzer H. Hämoadsorption zur Blutreinigung–Unvergleichbarkeit der klinisch angebotenen Verfahren. *Medizinische Klinik-Intensivmedizin und Notfallmedizin* 2021b; 116: 449-53.

Kuck JL, Bastarache JA, Shaver CM, Fessel JP, Dikalov SI, May JM, Ware LB. Ascorbic acid attenuates endothelial permeability triggered by cell-free hemoglobin. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 495: 433-7.

Kues W. Hämoglobin und Myoglobin. In: *Biochemie für die Tiermedizin*, 1. Auflage edn. Kues W, von Köckritz-Blickwede M, eds. Stuttgart: Thieme 2020: 180-5.

Kues W vK-BM. Hrsg. *Biochemie für die Tiermedizin*. In: Hrsg. *Biochemie für die Tiermedizin* 1. Auflage Thieme, ed. Stuttgart: Thieme 2020:

Lang CN, Sommer MJ, Neukamm MA, Staudacher DL, Supady A, Bode C, Duerschmied D, Lothar A. Use of the CytoSorb adsorption device in MDMA intoxication: a first-in-man application and in vitro study. *Intensive Care Med Exp* 2020; 8: 21.

Lang F. Störungen des Calciumhaushalts. In: *Taschenatlas Pathophysiologie*, 6., vollständig überarbeitete Auflage edn. Silbernagl S, Lang F, eds.: Thieme 2019:

Levi M, van der Poll T. Coagulation in sepsis: all bugs bite equally. *Critical care* 2004; 8: 1-3.

Lonnemann G. Technik der Hämodialyse. *Der Nephrologe* 2007; 2: 252-60.

Ludlow J. T. WRG, Nappe T. M. (2023) *Methemoglobinemia* StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)

Mackin A. Immune-Mediated Hemolytic Anemia. *Today's Veterinary Practice* 2020; November/December 2020

Mair H, Micka N, Vogt F, Rosenzweig D, Vogel F, Baumer B, Ulrich S, Lamm P. A New Apheresis Device for Antithrombotic Drug Removal during Off-Pump Coronary Artery Bypass Surgery. *Medicina (Kaunas)* 2022; 58

Malard B, Lambert C, Kellum JA. In vitro comparison of the adsorption of inflammatory mediators by blood purification devices. *Intensive Care Med Exp* 2018; 6: 12.

Masmouei B, Harorani M, Bazrafshan MR, Karimi Z. COVID-19: Hyperinflammatory Syndrome and Hemoadsorption with CytoSorb. *Blood Purif* 2021; 50: 976-8.

Meagher J, Hendricks J, Eatroff A. Cytokine Adsorption as an Adjunctive Treatment for Patients with Immune-Mediated Hemolytic Anemia Receiving Therapeutic Plasma Exchange: A Case Series of 3 Dogs. *Vet Med (Auckl)* 2023; 14: 103-10.

Meegan JE, Shaver CM, Putz ND, Jesse JJ, Landstreet SR, Lee HNR, Sidorova TN, McNeil JB, Wynn JL, Cheung-Flynn J, Komalavilas P, Brophy CM, Ware LB, Bastarache JA. Cell-free hemoglobin increases inflammation, lung apoptosis, and microvascular permeability in murine polymicrobial sepsis. *PLoS One* 2020; 15: e0228727.

Mehta Y, Mehta C, Kumar A, George JV, Gupta A, Nanda S, Kochhar G, Raizada A. Experience with hemoadsorption (CytoSorb((R))) in the management of septic shock patients. *World J Crit Care Med* 2020; 9: 1-12.

Miller DW, Slovis CM. Hypophosphatemia in the emergency department therapeutics. *The American journal of emergency medicine* 2000; 18: 457-61.

Mitrovic D, Huntjens DW, de Vos EAJ, van Tellingen M, Franssen EIJ. Extracorporeal hemoadsorption with the CytoSorb device as a potential therapeutic option in severe intoxications: Review of the rationale and current clinical experiences. *J Clin Pharm Ther* 2022; 47: 1444-51.

Mitzner S, Kogelmann K, Ince C, Molnár Z, Ferrer R, Nierhaus A. Adjunctive Hemoadsorption Therapy with CytoSorb in Patients with Septic/Vasoplegic Shock: A Best Practice Consensus Statement. *Journal of Clinical Medicine* 2023; 12: 7199.

Moresco E, Dejaco H, Humbert V, Thoma M. The use of CytoSorb(R) in a prasugrel-loaded patient undergoing emergent coronary artery bypass graft surgery. *Clin Case Rep* 2023; 11: e6990.

Nakaji S, Hayashi N. Bilirubin adsorption column medisorba BL-300. *Therapeutic Apheresis and Dialysis* 2003; 7: 98-103.

Nectoux A, Hoareau G, L, Goy-Thollot I, Barthélemy A, Pouzot-Nevoret C (2020) First use of a novel hemoadsorption device (VetresQ®) as an adjunct to renal replacement therapy for the management of a dog with leptospirosis. In: *European Veterinary Emergency and Critical Care Congress, Online Conference, France*

Ohrem H, Spiegel K, Sängler F, Dörfelt R. Abstracts from the International Veterinary Emergency and Critical Care Symposium, the European Veterinary Emergency and Critical Care Annual Congress, and the ACVECC VetCOT Veterinary Trauma & Critical Care Conference 2023. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2023; 33: S31-2.

Olson SW, Oliver JD, Collen J, Bunin J, Gleeson TD, Foster BE, Simmons MP, Chen HW, Ficke JB, Brown TE. Treatment for severe coronavirus disease 2019 with the Seraph-100 microbind affinity blood filter. *Critical Care Explorations* 2020; 2: e0180.

Olsson MG, Allhorn M, Bulow L, Hansson SR, Ley D, Olsson ML, Schmidtchen A, Akerstrom B. Pathological conditions involving extracellular hemoglobin: molecular mechanisms, clinical significance, and novel therapeutic opportunities for alpha(1)-microglobulin. *Antioxid Redox Signal* 2012; 17: 813-46.

Paddon CA, Marken F. Hemoglobin adsorption into TiO₂ phytate multi-layer films: particle size and conductivity effects. *Electrochemistry communications* 2004; 6: 1249-53.

Paland M. Use of CytoSorb in cases of acute amitriptyline intoxication. *J Clin Pharm Ther* 2021; 46: 1476-9.

Patten E, Berkman EM. Therapeutic plasmapheresis and plasma exchange. *CRC Critical reviews in clinical laboratory sciences* 1986; 23: 147-75.

Peng JY, Li L, Zhao X, Ding F, Hou X, Peng Z. Hemoperfusion with CytoSorb(R) in Critically Ill COVID-19 Patients. *Blood Purif* 2022; 51: 410-6.

Peter Wohlsein B, Wolfgang. Toxizitätsmechanismen. In: *Allgemeine Pathologie für die Tiermedizin*, 3. aktualisierte Auflage edn. Baumgärtner W, Gruber AD, eds.: Georg Thieme Verlag 2020:

Pieri M, Fominskiy E, Nardelli P, Bonizzoni MA, Scandroglio AM. CytoSorb purification in critically ill SARS-CoV-2 patients. *Int J Artif Organs* 2022; 45: 216-20.

Poli EC, Rimmele T, Schneider AG. Hemoadsorption with CytoSorb((R)). *Intensive Care Med* 2019a; 45: 236-9.

Poli EC, Alberio L, Bauer-Doerries A, Marcucci C, Roumy A, Kirsch M, De Stefano E, Liaudet L, Schneider AG. Cytokine clearance with CytoSorb® during cardiac surgery: a pilot randomized controlled trial. *Critical care* 2019b; 23: 1-12.

Ranney HM, Sharma V. Structure and function of hemoglobin. Willimas's Hematology (6th edition) McGraw Hill 2000: 345-53.

Reshetnik A, Tölle M. Immunadsorption. *Dialyse aktuell* 2020; 24: 169-76.

Reuchsel C, Gonnert FA. Successful treatment of severe quetiapine intoxication with CytoSorb hemoadsorption. *J Clin Pharm Ther* 2022; 47: 1471-4.

Ronco C, Tetta C. Extracorporeal blood purification: more than diffusion and convection. Does this help? *Curr Opin Crit Care* 2007; 13: 662-7.

Ronco C, Bellomo R. Hemoperfusion: technical aspects and state of the art. *Crit Care* 2022; 26: 135.

Sänger F, Bergmann M, Hartmann K, Dörfelt R. Supportive Treatment of a Dog with Leishmaniosis and Severe Glomerulopathy with Immunoadsorption. *Pathogens* 2024; 13

Schädler D, Pausch C, Heise D, Meier-Hellmann A, Brederlau J, Weiler N, Marx G, Putensen C, Spies C, Jörres A. The effect of a novel extracorporeal cytokine hemoadsorption device on IL-6 elimination in septic patients: a randomized controlled trial. *PLoS One* 2017; 12: e0187015.

Scharf C, Liebchen U, Paal M, Irlbeck M, Zoller M, Schroeder I. Blood purification with a cytokine adsorber for the elimination of myoglobin in critically ill patients with severe rhabdomyolysis. *Crit Care* 2021; 25: 41.

Schechter AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 2008; 112: 3927-38.

Schieber M, Chandel Navdeep S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology* 2014; 24: R453-R62.

Schubert A (2023) Interaktionen von Cytosorb unter kontinuierlicher Nierenersatztherapie am Beispiel Piperacillin/Tazobactam. Dissertation, Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität, 2023

Schultz P, Schwier E, Eickmeyer C, Henzler D, Kohler T. High-dose CytoSorb hemoadsorption is associated with improved survival in patients with septic shock: A retrospective cohort study. *J Crit Care* 2021; 64: 184-92.

Schutt RC, Ronco C, Rosner MH (2012) The role of therapeutic plasma exchange in poisonings and intoxications. *Seminars in dialysis*. 201-6

Schweighauser A, Francey T. Ethylene glycol poisoning in three dogs: Importance of early diagnosis and role of hemodialysis as a treatment option. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2016; 158: 109-14.

Schweighauser A, Francey T, Acierno M, Labato M, Cowgill L, Francey T, DiBartola S, Cowgill L, Guillaumin J, Crump K. Extrakorporelle Blutreinigungsverfahren in der Veterinärmedizin. *kleintier konkret* 2017; 20: 27-33.

Schweighauser A, Francey T. Extrakorporelle Blutreinigungsverfahren in der Veterinärmedizin. *kleintier konkret* 2017; 20: 27-33.

Schwendenschwein I MA. Hrsg. LaborSkills In: Hrsg. LaborSkills 2., unveränderte Auflage Thieme, ed. Stuttgart Thieme 2020:

Seeliger B, Stahl K, David S. Extracorporeal techniques for blood purification in sepsis: an update. *Der Internist* 2020; 61: 1010-6.

Shaver CM, Wickersham N, McNeil JB, Nagata H, Sills G, Kuck JL, Janz DR,

Bastarache JA, Ware LB. Cell-Free Hemoglobin-mediated Increases in Vascular Permeability. A Novel Mechanism of Primary Graft Dysfunction and a New Therapeutic Target. *Ann Am Thorac Soc* 2017; 14: S251-S2.

Shaver CM, Paul MG, Putz ND, Landstreet SR, Kuck JL, Scarfe L, Skrypnik N, Yang H, Harrison FE, de Caestecker MP, Bastarache JA, Ware LB. Cell-free hemoglobin augments acute kidney injury during experimental sepsis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2019; 317: F922-F9.

Shimokawa K-i, Takakuwa R, Wada Y, Yamazaki N, Ishii F. Adsorption of various antimicrobial agents to endotoxin removal polymyxin-B immobilized fiber (Toraymyxin®). Part 2: Adsorption of two drugs to Toraymyxin PMX-20R cartridges. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2013; 101: 350-2.

Slagboom J, Kool J, Harrison RA, Casewell NR. Haemotoxic snake venoms: their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. *Br J Haematol* 2017; 177: 947-59.

Song T, Hayanga J, Durham L, Garrison L, McCarthy P, Barksdale A, Smith D, Bartlett R, Jaros M, Nelson P. CytoSorb therapy in COVID-19 (CTC) patients requiring extracorporeal membrane oxygenation: a multicenter, retrospective registry. *Frontiers in Medicine* 2021; 8: 773461.

Stummvoll H-K. Kontinuierliche Hämofiltration und andere kontinuierliche Blutreinigungsverfahren. In: Hämofiltration, Hämodialyse, Hämapherese. Bergmann H, Löffler WH, eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 1993: 27-35.

Takenaka Y. Bilirubin adsorbent column for plasma perfusion. *Therapeutic Apheresis* 1998; 2: 129-33.

Thomas C, Lumb AB. Physiology of haemoglobin. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain* 2012; 12: 251-6.

Toepfer M, Sitter T, Burchardi C, Held E, Schifffl H. Klinische Immunadsorption. DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift 1999; 124: 461-5.

Tracy A, Lynch A, Messenger K, Vaden S, Vigani A. Use of extracorporeal therapy in a dog with heatstroke. Journal of Veterinary Emergency and Critical Care 2022; 32: 512-9.

Traeger K. FG, Schröder J., Petscher M., Reinelt H. (2016) Elimination of free hemoglobin with CytoSorb during ECLS. In: EuroELSO 2016

Vallelian F, Buehler PW, Schaer DJ. Hemolysis, free hemoglobin toxicity, and scavenger protein therapeutics. Blood 2022; 140: 1837-44.

Vienken J. Extrakorporale Blutreinigungssysteme. Medizintechnik: Verfahren–Systeme–Informationsverarbeitung 2011: 495-514.

Vienken J. Blutreinigungssysteme. In: Medizintechnik: Verfahren - Systeme - Informationsverarbeitung. Kramme R, ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2017: 505-30.

Wetzels E, Colombi A, Dittrich P, Gurland HJ, Kessel M, Klinkmann H, Wetzels E, Colombi A, Dittrich P, Gurland HJ (1986) Hämodialyse. Springer

Wieder T, Lang F. Erythrozyten. In: Hämostaseologie. Pötzsch B, Madlener K, eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2010: 113-9.

Winchester JF, Kellum JA, Ronco C, Brady JA, Quartararo PJ, Salsberg JA, Levin NW. Sorbents in Acute Renal Failure and the Systemic Inflammatory Response Syndrome. Blood Purification 2003; 21: 79-84.

Winslow RM. Oxygen: the poison is in the dose. Transfusion 2013; 53: 424-37.

Wizemann W. Hämodialyse und Hämofiltration. In: Hämofiltration, Hämodialyse,

Hämapherese. Bergmann H, Löffler WH, eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 1993: 23-6.

VIII. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung der Doktorarbeit und in meiner Zeit als Doktorandin unterstützt haben. Ohne sie wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Insbesondere gilt mein Dank meinem Doktorvater Priv.-Doz. Dr. René Dörfelt und meinen beiden Betreuern Dr. Florian Sänger und Prof. Dr. Katrin Hartmann. Vielen Dank für euer Engagement und Unterstützung und dafür, dass ich diese Dissertation mit Euch und Eurer Hilfe verfassen durfte.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen und Freunden bedanken. Ohne eure Unterstützung hätte ich es so nicht geschafft. Besonderer Dank geht an dieser Stelle an Katharina Schmidt, die mich zu jeder Tages- und Nachtzeit unterstützt hat und immer hinter mir stand.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und George bedanken. Danke, dass ihr mir den Weg bis hin zur Dissertation ermöglicht habt. George war mir schon durch das Studium eine sehr große Stütze und ich bin ihm für immer dankbar für alles.