

IN DEPTH REVIEW

Avanzamenti tecnologici e stato infiammatorio del paziente in dialisi



Giuseppe Ferro, Fiammetta Ravaglia, Elisa Ferrari, Elena Romoli, Stefano Michelassi, David Caiani, Francesco Pizzarelli

SOC Nefrologia e Dialisi, Ospedale SM Annunziata, Azienda Sanitaria Firenze

Corrispondenza a: Dott Francesco Pizzarelli; SOC Nefrologia e Dialisi Ospedale SM Annunziata, Azienda Sanitaria Firenze Via dell' Antella 58, Antella - Firenze; Tel:+39.055.6936223 Mail: fpizzarelli@yahoo.com

Abstract

Così come attualmente condotta, l'emodiafiltrazione on line è in grado di ridurre, ma non normalizzare, la micro-infiammazione dei pazienti uremici. Recenti avanzamenti tecnologici consentiranno di ridurre ulteriormente lo stimolo flogogeno connesso al trattamento dialitico.

È noto il ruolo pro-infiammatorio dei piccoli frammenti del DNA batterico. Tali composti si possono ritrovare nei liquidi per dialisi, ma la loro determinazione attualmente non rientra nei normali controlli della qualità dei liquidi di dialisi. Tale scenario potrà mutare una volta rese affidabili, poco costose e di rapida e semplice esecuzione le tecniche di analisi di tali frammenti.

Il dialisato a base di citrato è poco flogogeno sia per il ben noto effetto antinfiammatorio di tale tampone, sia perché è totalmente privo di acetato, tampone decisamente pro-infiammatorio. Tuttavia, l'utilizzo estensivo del citrato in dialisi cronica è rallentato dalle remore sul suo potenziale effetto ipocalcemizzante.

È nostra opinione che l'EDF-OL ad elevato scambio convettivo condotta con dialisato la cui sterilità ed apirogenicità sia garantita da controlli sempre più sofisticati e con tampone citrato la cui safety sia certificata, possa costituire il gold standard del trattamento dialitico per il prossimo futuro.

Parole chiave: citrato, emodiafiltrazione on-line, frammenti DNA batterico, micro-infiammazione uremica

Technological advances and micro-inflammation in dialysis patients

As currently performed, on line hemodiafiltration reduces, but does not normalize, the micro-inflammation of uremic patients. Recent technological advances make it possible to further reduce the inflammation connected to the dialysis treatment. Short bacterial DNA fragments are pro-inflammatory and can be detected in the dialysis fluids. However, their determination is not currently within normal controls of the quality of the dialysate. The scenario may change once the analysis of these fragments yields reliable, inexpensive, quick and easy to evaluate the results. At variance with standard bicarbonate dialysate, Citrate dialysate induces far less inflammation both for the well-known anti-inflammatory effect of such buffer and also because it is completely acetate free, e.g. a definitely pro-inflammatory buffer. However, the extensive use of citrate dialysate in chronic dialysis is prevented because of concerns about its potential calcium lowering effect. In our view, high convective exchange on line hemodiafiltration performed with dialysate, whose sterility and a-pirogenicity is guaranteed by increasingly sophisticated controls and with citrate buffer whose safety is certified, can serve as the gold standard of dialysis treatments in future.

Key words: citrate, on-line hemodiafiltration, short bacterial DNA fragments, uremic microinflammation

Introduzione

L'avanzamento tecnologico in campo dialitico ha recentemente offerto dei miglioramenti che consentono, e sperabilmente ancor di più consentiranno in futuro, un ulteriore controllo della microinfiammazione uremica. Prima di analizzare in dettaglio tali avanzamenti, è opportuno un breve cenno allo stato microinfiammatorio dell'uremico, argomento ampiamente studiato in letteratura.

Infiammazione e danno renale cronico

È noto che la patologia cardiovascolare rappresenta la principale causa di morte nel paziente con insufficienza renale cronica. Oltre ai tradizionali fattori di rischio cardiovascolare (fumo, diabete, ipertensione arteriosa, ecc.), nell'uremico si sommano infatti i cosiddetti fattori di rischio non tradizionali, fra cui il cronico stato infiammatorio gioca un ruolo predominante [1] (full text). Già molti anni fa un consensus paper fra eminenti esperti italiani ed europei ha fatto il punto sui possibili legami fra infiammazione, stress ossidativo, aterosclerosi e conseguente maggior rischio cardiovascolare dell'uremico [2] (full text) Il meccanismo fisiopatologico unificante sistemi così complessi non è del tutto noto. Sicuramente il maggiore carico ossidativo su proteine, lipidi e glucidi [conseguente all'accumulo delle tossine uremiche quali cisteina, omocisteina, beta 2 microglobulina (β 2m) e dei prodotti terminali di glicosilazione (AGE), LDL ossidate, ecc.], costituisce elemento patogenetico determinante che ha come esito finale una aterosclerosi accelerata [2] (full text). Fra i tanti possibili marker indiretti di tale complesso sistema, quello più utilizzato nella pratica clinica è la proteina C reattiva (pcr) [3]. Tale molecola della fase acuta dell'infiammazione, non solo è di facile determinazione ma ha anche un alto potere predittivo in termini di mortalità [4]. Va tuttavia sottolineato come, fra i biomarker di infiammazione, il dosaggio di TNF e IL-6 sia più predittivo di eventi successivi che non la pcr [5]. Questa infatti è sensibile ad altri parametri quali per esempio la membrana dialitica [6] (full text).

A conclusione di questo breve e certamente non esaustivo excursus, è importante sottolineare come in ambito di terapia dialitica l'emodiafiltrazione on line (EDF-OL) è in grado di attenuare, ma non normalizzare, lo stato microinfiammatorio del paziente in dialisi [7] (full text) [8]. È possibile che tale parziale insuccesso della metodica possa venir migliorato dagli avanzamenti tecnologici che ora verranno analizzati.

Purezza dei liquidi

I due prevalenti, ma non unici, contaminanti microbici dell'acqua per dialisi sono costituiti dai batteri e dai loro derivati, le Endotossine. I batteri generalmente appartengono alle classi α e β dei proteobatteri GRAM negativi e ai micobatteri [9]. Le Endotossine, lipopolisaccaridi stabili al calore, derivano dalla parete cellulare dei batteri GRAM negativi, hanno un Peso Molecolare oscillante fra 2000 e 20000 Dalton, o anche maggiore quando si trovano in aggregati micellari, e possono pertanto passare le membrane high flux dei dializzatori per backdiffusion e/o backfiltration [10] (full text).

La caratterizzazione di tali contaminanti e le modalità della loro rimozione dai liquidi di dialisi sono state ampio oggetto di studio dei decenni passati. Oggi la comunità nefrologica

ha a disposizione Linee Guida molto precise e dettagliate che, se correttamente applicate, assicurano la apirogenicità e sterilità dei liquidi per dialisi [11] [12]. La strategia operativa da implementare deve prevedere aspetti strutturali, cioè un adeguato sistema di trattamento e distribuzione dell'acqua, e procedurali consistenti in metodi adeguati per il riconoscimento di contaminanti microbiologici e strategie adeguate di monitoraggio e di interventi correttivi. La stretta aderenza a tali protocolli certifica la produzione di liquidi di dialisi ultrapuri e liquidi di sostituzione sterili.

La Tabella 1, tratta dalle LG del 2005 della SIN [11], definisce valori di riferimento per batteri ed endotossine del dialisato standard e ultrapuro e frequenza dei controlli. Come correttamente riportato nelle note alla tabella, all'interno del gruppo degli estensori e revisori di allora si sviluppò un dibattito vivace sulla necessità di un programma di controlli così impegnativo. L'esperienza degli anni successivi ci ha confermato che l'utilizzo combinato dei monitor del commercio, tutti forniti di ultrafiltri interni, di un moderno impianto di produzione e distribuzione dell'acqua e di adeguati processi di monitoraggio e correzione garantisce non solo la qualità nel tempo dei liquidi di reinfusione per i trattamenti on line, ma comporta anche ricadute positive sulla qualità del dialisato per tutte le tipologie di trattamenti eseguiti nel centro, inclusa l'emodialisi tradizionale. Fermi quindi restando i cut off batteriometrici suggeriti nel 2005, è nostra opinione che oggi sia ipotizzabile un programma meno stringente di controlli sull'infusato, almeno per i centri che hanno implementato adeguati aspetti strutturali e procedurali.

Sarebbe interessante rivalutare oggi la catena della qualità della produzione dei liquidi nei centri dialisi italiani a 10 anni dal primo survey nazionale condotto sull'argomento [13]. Potrebbe essere la SIN a farsi promotrice di una tale azione.

A nostro avviso, i controlli batteriometrici andrebbero sempre affiancati dalla determinazione della pcr in tutti i pazienti del centro dialisi, realizzando così il monitoraggio di un rilevante parametro di risultato clinico intermedio. La frequenza di distribuzione dei valori di pcr nei pazienti del centro può costituire infatti un affidabile e semplice metodo per capire se siamo in presenza di un problema di microinquinamento dell'acqua (la maggioranza dei pazienti del centro con valori modicamente elevati di pcr) o di natura paziente-specifica

Tabella 1. Controlli microbiologici

Esame	Acqua di rete		Acqua trattata (inizio e fine anello di distribuzione)		Dialisato standard		Dialisato ultrapuro	
	Valore di riferim.	Frequenza	Valore di riferim.	Frequenza	Valore di riferim.	Frequenza	Valore di riferim.	Frequenza
Batteri UFC/ mL a 22°C	<100	ogni 6 mesi	< 100	mensile	<100	ogni 4 mesi in ogni monitor	<0.1	ogni 2 mesi su ogni monitor su cui vengono effettuati trattamenti
Muffe e lieviti/mL	-	-	<10	ogni 6 mesi	<10	ogni 4 mesi in ogni monitor	0	on-line
Endotossine UI/mL	-	-	<0.25	mensile	<0.25	ogni 4 mesi in ogni monitor	<0.03	

Note:

1) Sia gli estensori del documento, sia i revisori sono divisi sulla reale necessità di un programma così impegnativo. Pertanto, in ristrettezza di budget o in difficoltà operative, una parte degli esperti ritiene corretto: a) evitare la ricerca specifica di muffe e lieviti riservandola a casi particolari o sospetti; b) evitare la determinazione delle endotossine nel dialisato standard senza febbre e brividi

2) Se i valori di riferimento sono superati è opportuno procedere all'identificazione microbiologica

(Accesso vascolare infetto? Altro?) nel caso di pochi pazienti con valori molto elevati di pcr [3].

Questo è il codificato e rassicurante stato dell'arte dell' oggi e del prossimo futuro. Tuttavia, come già sottolineato, l'EDF-OL attenua ma non annulla la microinfiammazione [7] (full text) [8]. È quindi lecito domandarsi se in futuro saranno possibili ulteriori miglioramenti in tema di purezza dei fluidi.

I comuni metodi di analisi dei contaminanti microbiologici e lipopolisaccaridici non sono idonei ad individuare composti potenzialmente presenti nei liquidi di dialisi, segnatamente peptidoglicani di derivazione dai batteri GRAM positivi e piccoli frammenti di DNA batterico (bdNA). Questi ultimi sono composti da non più di 5-20 nucleotidi, hanno un PM fra 1000 e 4000 D e sono stati ritrovati nei liquidi di dialisi adottando metodi di analisi molto sofisticati [14] (full text) [15] (full text). In circuiti di dialisi "in vitro" il bdNA può passare nel compartimento ematico e indurre una produzione dose-risposta di IL-6 da parte di cellule periferiche mononucleate umane [14] (full text). Per quanto riguarda esperienze "in vivo", i soggetti dializzati positivi al bdNA, circa un quarto del piccolo campione analizzato, esprimono livelli di pcr e IL-6 più elevati dei dializzati negativi al bdNA [16] (full text). Infine, gli uremici, in dialisi e non, positivi al bdNA non solo hanno livelli di citokine pro-infiammatorie (in questo esperimento IL-1 β) più elevati degli uremici bdNA negativi, ma anche una ridotta apoptosi delle PBMC, con ciò prolungando nel tempo ed amplificando la risposta infiammatoria [15] (full text).

Lo studio dei piccoli frammenti del bdNA e del loro ruolo pro-infiammatorio è per ora confinato al campo della ricerca. Le sofisticate e dispendiose in termini di tempo e denaro tecniche di identificazione del bdNA ne precludono il suo utilizzo nella pratica clinica quotidiana. Non è tuttavia da escludere che in futuro la determinazione del bdNA, o di altri contaminanti, possa rientrare nei normali controlli della qualità dei liquidi di dialisi, una volta rese affidabili, poco costose e di rapida e semplice esecuzione le tecniche di analisi.

Dialisato con Citrato

La microinfiammazione dell'uremico non è certo solo conseguenza della purezza dei liquidi di dialisi. Gli effetti negativi dell'acetato sono ampiamente noti [17] [18] ed ormai da decenni il dialisato con tampone bicarbonato ha sostituito quello con solo acetato [19]. Tuttavia, per stabilizzare il pH, anche il dialisato in bicarbonato contiene piccole quantità di acetato, oscillanti fra 4 e 8 mmol/L. Poiché i livelli ematici fisiologici per tale anione sono inferiori a 0.1 mmol/L, in tutti i trattamenti dialitici, e soprattutto in emodiafiltrazione, si realizza un significativo gradiente dialisato-sangue in grado di indurre trasferimenti significativi di acetato con conseguenti potenziali effetti negativi sulla microinfiammazione uremica [17] [20] [21] [22] (full text). Pertanto, il dialisato totalmente privo di acetato riduce lo stimolo infiammatorio in particolare in EDF-OL ad elevato scambio convettivo [23] (full text).

Fra i metodi per ottenere un dialisato totalmente privo di acetato, quello probabilmente più promettente e di particolare interesse è costituito dal dialisato con citrato. È questa una metodica oramai in uso clinico da oltre un decennio, soprattutto negli US [24], non solo per i suoi effetti anticoagulanti e di miglioramento dell' efficienza dialitica [25] (full text) [26] (full text), ma anche per le sue proprietà antiinfiammatorie [27] (full text) [28] (full text) [29] [30] [31] (full text) [32] (full text). Gritters ha infatti dimostrato che durante la dialisi con citrato si otteneva una riduzione della degranolazione di polimorfonucleati e piastrine con conseguente minor rilascio di fattore piatstrinico 4 e mieloperossidasi, che inducono stress ossidativo attraverso la formazione di malondialdeide e Adma. La riduzione dello stress ossi-

dativo era già presente dopo solo una settimana di dialisi con citrato, come dimostrato dalla riduzione dei valori di LDL ossidato [27] (full text).

Bryland ha mostrato come nei pazienti diabetici, in cui l'iperglicemia ed i prodotti di degradazione del glucosio sono strettamente associati a stress ossidativo ed infiammazione, il citrato riduce i fenomeni di apoptosi e necrosi con riduzione dell'espressione PKC-BII. Ciò si associa a miglioramento della funzione endoteliale, riduzione della concentrazione di molecole pro infiammatorie e di molecole di adesione quali ICAM-1, con conseguente minor diapedesi dei neutrofili [32] (full text).

Il miglioramento del quadro pro infiammatorio ha ripercussioni positive anche sull'assetto nutrizionale. Matsuyama ha infatti evidenziato in 24 pazienti sottoposti a emodiafiltrazione con citrato una riduzione dei valori di leptina, molecola anoressizzante, ed un incremento di neuropeptide Y, molecola oressizzante [33].

Nell'esercitare anticoagulazione, il citrato chela il Calcio con conseguente riduzione della quota ionizzata e potenziale ipocalcemia.

Nella pratica, tuttavia, tale evento dovrebbe avere scarso significato clinico in quanto le concentrazioni di citrato nel dialisato (0.65-1 mmol/l) sono nettamente inferiori rispetto a quelle utilizzate nelle tecniche continue che sono finalizzate ad ottenere l'anticoagulazione completa [30]. Che le concentrazioni di citrato nel dialisato non comportino problemi di sicurezza, è dimostrato dal fatto che in dialisi High-Flux il livello massimo di citratemia è risultato 3.2 mg/dl, valore lievemente superiore alla norma ma nettamente inferiore rispetto ai valori di 47-95 mg/dl necessari per realizzare l'anticoagulazione [30]. La sicurezza del dialisato con citrato è infine dimostrata dall'assenza di accumulo di citrato e normalità del calcio ionizzato 1 ora dopo la fine del trattamento [34] (full text).

L'uso del citrato al posto dell'acetato nei liquidi di dialisi è stato recentemente sperimentato in Europa sia in emodialisi che in EDF OL [35] [36] (full text) [37] (full text). Nel nostro lavoro, rispetto all'EDF-OL ad elevato scambio convettivo con dialisato standard, l'EDF con citrato ha ridotto i livelli sierici pre trattamento di β_2m e pcr oltre ad esercitare un lieve effetto anticoagulante; i livelli ematici di Calcio, sia totale che ionizzato, non si sono modificati nel corso del trattamento con citrato, mentre sono aumentati in corso di EDF-OL standard [36] (full text). Va tuttavia sottolineato come il nostro è stato un esperimento di pura fattibilità, eseguito in acuto con sequenza non randomizzata delle procedure. Come il nostro, anche lo studio svedese è stato condotto in acuto su una piccola popolazione; ha il vantaggio di esser randomizzato ma i trattamenti con citrato comprendevano sia emodialisi che EDF OL [37] (full text). Il problema della sicurezza è invece stato specificamente affrontato nell'esperienza francese di Anjort [35]. Nonostante le differenze nei disegni, questi recenti studi europei confermano l'effetto anticoagulante del citrato e sembrano suggerirne un certo effetto antinfiammatorio associato a sicurezza dei trattamenti [35] [36] (full text) [37] (full text). Tuttavia, la reale rilevanza dell'effetto antinfiammatorio e la sicurezza dei trattamenti dialitici cronici con citrato necessitano di studi clinici adeguatamente disegnati. In Toscana è in fase di arruolamento un nostro trial randomizzato, controllato, cross-over, della durata di 6 mesi per braccio di trattamento che dovrebbe fornire risposte certe sulla sicurezza ed efficacia anti-infiammatoria del citrato utilizzato in EDF-OL ad elevato scambio convettivo (Comunicazione al Ministero della Salute di inizio di indagine clinica postmarket del 7-7-2014).

Va tuttavia sottolineato come le ampie evidenze di efficacia e sicurezza presenti in letteratura hanno già indotto tutte le principali ditte del settore, con l'ovvia approvazione degli organi autorizzativi competenti, a commercializzare in Europa ed in Italia i dialisati con citrato. L'uso sempre più estensivo nella pratica clinica quotidiana del tampone citrato

consentirà di valutarne nel tempo sicurezza ed efficacia. Tale sorveglianza post market si affiancherà agli studi in corso o in fieri.

In conclusione, riteniamo che l'EDF-OL ad elevato scambio convettivo condotta con dialisato la cui sterilità ed apirogenicità sia garantita da controlli sempre più sofisticati e con tampone citrato la cui safety sia certificata, possa costituire il gold standard del trattamento dialitico attuale e per il prossimo futuro.

Bibliografia

- [1] Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA et al. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney international* 2002 Nov;62(5):1524-38 (full text)
- [2] Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU et al. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2003 Jul;18(7):1272-80 (full text)
- [3] Stenvinkel P Inflammation in end-stage renal disease: the hidden enemy. *Nephrology (Carlton, Vic.)* 2006 Feb;11(1):36-41
- [4] Panichi V, Migliori M, De Pietro S et al. Plasma C-reactive protein in hemodialysis patients: a cross-sectional, longitudinal clinical survey. *Blood purification* 2000;18(1):30-6
- [5] Desai AA, Nissenson A, Chertow GM et al. The relationship between laboratory-based outcome measures and mortality in end-stage renal disease: a systematic review. *Hemodialysis international. International Symposium on Home Hemodialysis* 2009 Jul;13(3):347-59
- [6] Schouten WE, Grooteman MP, van Houte AJ et al. Effects of dialyser and dialysate on the acute phase reaction in clinical bicarbonate dialysis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2000 Mar;15(3):379-84 (full text)
- [7] Carracedo J, Merino A, Nogueras S et al. On-line hemodiafiltration reduces the proinflammatory CD14+CD16+ monocyte-derived dendritic cells: A prospective, crossover study. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2006 Aug;17(8):2315-21 (full text)
- [8] Ramirez R, Carracedo J, Merino A et al. Microinflammation induces endothelial damage in hemodialysis patients: the role of convective transport. *Kidney international* 2007 Jul;72(1):108-13
- [9] Gomila M, Gascó J, Gil J et al. A molecular microbial ecology approach to studying hemodialysis water and fluid. *Kidney international* 2006 Nov;70(9):1567-76
- [10] Glorieux G, Neiryck N, Veys N et al. Dialysis water and fluid purity: more than endotoxin. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2012 Nov;27(11):4010-21 (full text)
- [11] Alloatti S, Bolasco P, Canavese C et al. [Guidelines on water and solutions for dialysis. Italian Society of Nephrology]. *Giornale italiano di nefrologia : organo ufficiale della Società italiana di nefrologia* 2005 May-Jun;22(3):246-73
- [12] European Best Practice Guidelines working Group. EBPB for Haemodialysis, Section IV, dialysis fluid purity. *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17(S7): 45-62.
- [13] Pizzarelli F, Cerrai T, Biagini M et al. Dialysis water treatment systems and monitoring in Italy: results of a national survey. *Journal of nephrology* 2004 Jul-Aug;17(4):565-9
- [14] Schindler R, Beck W, Deppisch R et al. Short bacterial DNA fragments: detection in dialysate and induction of cytokines. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2004 Dec;15(12):3207-14 (full text)
- [15] Navarro MD, Carracedo J, Ramirez R et al. Bacterial DNA prolongs the survival of inflamed mononuclear cells in haemodialysis patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2007 Dec;22(12):3580-5 (full text)
- [16] Bossola M, Sanguinetti M, Scribano D et al. Circulating bacterial-derived DNA fragments and markers of inflammation in chronic hemodialysis patients. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2009 Feb;4(2):379-85 (full text)
- [17] Bingel M, Lonnemann G, Koch KM et al. Enhancement of in-vitro human interleukin-1 production by sodium acetate. *Lancet (London, England)* 1987 Jan 3;1(8523):14-6
- [18] Veech RL The untoward effects of the anions of dialysis fluids. *Kidney international* 1988 Nov;34(5):587-97
- [19] Graefe U, Milutinovich J, Follette WC et al. Less dialysis-induced morbidity and vascular instability with bicarbonate in dialysate. *Annals of internal medicine* 1978 Mar;88(3):332-6
- [20] Anderson J, Briefel G, Jones JM et al. Effects of acetate dialysate on transforming growth factor beta 1, interleukin, and beta 2-microglobulin plasma levels. *Kidney international* 1991 Dec;40(6):1110-7
- [21] Todeschini M, Macconi D, Fernández NG et al. Effect of acetate-free biofiltration and bicarbonate hemodialysis on neutrophil activation. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2002 Oct;40(4):783-93
- [22] Amore A, Cirina P, Mitola S et al. Acetate intolerance is mediated by enhanced synthesis of nitric oxide by endothelial cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 1997 Sep;8(9):1431-6 (full text)
- [23] Pizzarelli F, Cerrai T, Dattolo P et al. On-line haemodiafiltration with and without acetate. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant*

Association - European Renal Association 2006 Jun;21(6):1648-51 (full text)

[24] Ahmad S, Callan R, Cole JJ et al. Dialysate made from dry chemicals using citric acid increases dialysis dose. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2000 Mar;35(3):493-9

[25] Kossman R, Gonzales A, Callan R et al. Increased efficiency of hemodialysis with citrate dialysate: a prospective controlled study. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 2009 Sep;4(9):1459-64 (full text)

[26] Sands JJ, Kotanko P, Segal JH et al. Effects of citrate acid concentrate (citrasate®) on heparin N requirements and hemodialysis adequacy: a multicenter, prospective noninferiority trial. *Blood purification* 2012;33(1-3):199-204 (full text)

[27] Böhler J, Schollmeyer P, Dressel B et al. Reduction of granulocyte activation during hemodialysis with regional citrate anticoagulation: dissociation of complement activation and neutropenia from neutrophil degranulation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 1996 Feb;7(2):234-41 (full text)

[28] Bos JC, Grooteman MP, van Houte AJ et al. Low polymorphonuclear cell degranulation during citrate anticoagulation: a comparison between citrate and heparin dialysis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 1997 Jul;12(7):1387-93 (full text)

[29] Dhondt A, Vanholder R, Tielemans C et al. Effect of regional citrate anticoagulation on leukopenia, complement activation, and expression of leukocyte surface molecules during hemodialysis with unmodified cellulose membranes. *Nephron* 2000 Aug;85(4):334-42

[30] Gabutti L, Ferrari N, Mombelli G et al. The favorable effect of regional citrate anticoagulation on interleukin-1beta release is dissociated from both coagulation and complement activation. *Journal of nephrology* 2004 Nov-Dec;17(6):819-25

[31] Gritters M, Grooteman MP, Schoorl M et al. Citrate anticoagulation abolishes degranulation of polymorphonuclear cells and platelets and reduces oxidative stress during haemodialysis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2006 Jan;21(1):153-9 (full text)

[32] Bryland A, Wieslander A, Carlsson O et al. Citrate treatment reduces endothelial death and inflammation under hyperglycaemic conditions. *Diabetes & vascular disease research* 2012 Jan;9(1):42-51 (full text)

[33] Matsuyama K, Tomo T, Kadota J et al. Acetate-free blood purification can impact improved nutritional status in hemodialysis patients. *Journal of artificial organs : the official journal of the Japanese Society for Artificial Organs* 2011 Jun;14(2):112-9

[34] Kozik-Jaromin J, Nier V, Heemann U et al. Citrate pharmacokinetics and calcium levels during high-flux dialysis with regional citrate anticoagulation. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2009 Jul;24(7):2244-51 (full text)

[35] Aniot J, Petitclerc T, Créput C et al. Safe use of citric acid-based dialysate and heparin removal in postdilution online hemodiafiltration. *Blood purification* 2012;34(3-4):336-43

[36] Panichi V, Fiaccadori E, Rosati A et al. Post-dilution on line haemodiafiltration with citrate dialysate: first clinical experience in chronic dialysis patients. *TheScientificWorldJournal* 2013;2013:703612 (full text)

[37] Grundström G, Christensson A, Alquist M et al. Replacement of acetate with citrate in dialysis fluid: a randomized clinical trial of short term safety and fluid biocompatibility. *BMC nephrology* 2013 Oct 9;14:216 (full text)