

BIOINCOMPATIBILITÀ DELL'ACETATO ANCHE IN TRACCE

Licia Peruzzi, Roberta Camilla, Roberto Bonaudo, Rosanna Coppo, Alessandro Amore

SC Nefrologia Dialisi e Trapianto, Ospedale Infantile Regina Margherita, Torino

Bioincompatibility of acetate even at low concentrations

Over the last 20 years a large body of evidence has demonstrated that in chronic renal failure there is progressive chronic inflammation, which increases after the start of dialysis. In this phase a fundamental role is played by bioincompatibility reactions induced by contact with the different dialysis materials: membranes, plastic lines, dialysis fluids as well as contaminants present in water.

Clinically evident symptoms induced by bioincompatibility reactions are usually taken into serious account by nephrologists, while more subtle chronic effects, noxious in the long term, are often underconsidered.

Since the 1990s many efforts have been addressed to membrane improvement and water treatment, while there is still a lot to be done for better dialysates. Acetate dialysis is routinely used in only about 5% of patients worldwide but over 80% of patients are exposed to the lower acetate concentrations present in standard bicarbonate dialysate. These concentrations are not negligible and are able to induce chronic reactions mainly converging on the endothelium, stimulating and maintaining the atherogenesis process with important long-term implications for cardiovascular morbidity.

This review presents and discusses the available data on the cellular and molecular effects induced by acetate, even at low concentrations.

Conflict of interest: None

KEY WORDS:

Biocompatibilità,
Nitric oxide,
Acetate buffer,
Dialysis
vasculopathy

PAROLE CHIAVE:

Biocompatibilità,
Ossido nitrico,
Tampone
acetato,
Vasculopatia
da dialisi

Indirizzo degli Autori:

Dr.ssa Licia Peruzzi
SC Nefrologia Dialisi e Trapianto
Ospedale Infantile
Regina Margherita
Piazza Polonia 94
10126 Torino
e-mail: licia.peruzzi@unito.it

INTRODUZIONE

Negli ultimi 20 anni una grande mole di dati (1) ha dimostrato che, nell'insufficienza renale cronica, è presente uno stato infiammatorio cronico progressivo che subisce un netto incremento con l'avvio del trattamento dialitico. In questa fase, un ruolo fondamentale è quello determinato dalle reazioni indotte dal contatto delle diverse componenti ematiche con i materiali di dialisi, membrane dei filtri, plastiche delle linee, ma anche dialisato e contaminanti presenti nell'acqua, globalmente definite come "reazioni di bioincompatibilità" (2, 3).

I fenomeni indotti dalla bioincompatibilità dei materiali determinano eventi acuti, clinicamente evidenti durante la seduta dialitica, a cui viene generalmente posto un rapido rimedio da parte del nefrologo e a cui è stata devoluta la maggiore attenzione nel corso degli anni, e una serie molto più complessa e ancora non del tutto chiarita di eventi cronici, poco manifesti nell'immediato e, probabilmente, più dannosi a lungo termine.

Le cellule endoteliali sono il bersaglio finale delle reazioni di bioincompatibilità e la principale sede di

avvio del processo di aterosclerosi, responsabile della vasculopatia dialitica e dell'elevata incidenza di eventi cardiovascolari (4, 5).

Dagli anni '90, quando si sono inizialmente definiti questi fenomeni, molto lavoro è stato fatto sulle membrane dei filtri di dialisi e sulla preparazione delle acque, raggiungendo risultati eccellenti nella maggior parte dei trattamenti, mentre, sulla composizione chimica dei dialisati, rimane ancora un notevole spazio di miglioramento (6).

Se, infatti, l'acetato dialisi è stata abbandonata in Italia da oltre 10 anni per gli importanti effetti sulla tollerabilità dialitica e sull'instabilità cardiovascolare intradialitica, nel mondo, ancora oggi, il 5% circa dei pazienti viene ancora trattato con questa metodica.

Tuttavia, ciò che è importante sottolineare è che ancora oggi oltre l'80% dei pazienti in Europa viene esposto all'acetato, presente nelle soluzioni per bicarbonato dialisi (BD) in concentrazioni minori rispetto all'acetato dialisi (AD) ma tutt'altro che trascurabili: queste concentrazioni non sono responsabili di significativi eventi intradialitici acuti (7, 8), ma sono sufficienti per

innescare importanti reazioni di incompatibilità che si estrinsecano soprattutto a livello endoteliale in maniera cronica e continuativa, iniziando e automantenendo il processo di aterogenesi con importanti implicazioni cliniche a medio e a lungo termine.

A questo punto, ottimizzati i filtri, i trattamenti delle acque e la depurazione secondo parametri di cinetica delle piccole e delle medie molecole sempre più raffinati, è giunto il momento di ritornare ai dialisati, analizzando criticamente gli effetti indotti anche dalle basse concentrazioni di acetato, che, una volta abbandonata l'acetato dialisi, pensavamo non rappresentassero più un problema.

PERCHÉ È STATO NECESSARIO L'ACETATO

Sin dall'inizio della dialisi extracorporea, il problema della correzione dell'acidosi metabolica uremica ha rappresentato uno degli obiettivi principali del trattamento. Kolff, nei primi esperimenti sulla dialisi utilizzando il dializzatore a tamburo rotante, utilizzò quale base il bicarbonato di sodio, ma questo sistema tampone venne abbandonato nella pratica per problemi di contaminazione batterica delle soluzioni e per la precipitazione di sali di calcio e magnesio, fino a quando, negli anni '60, non venne introdotto il tampone acetato.

Il tampone acetato è, quindi, il primo tampone della dialisi moderna, che ha contribuito alla diffusione della dialisi cronica, consentendo il controllo dell'acidosi metabolica e, al contempo, il mantenimento della sterilità delle soluzioni e la permanenza in soluzione degli ioni calcio e magnesio.

METABOLISMO DELL'ACETATO

Il tampone acetato, ovvero una soluzione di un acido debole, l'acido acetico, e del suo sale con una base forte, l'acetato di sodio, svolge la sua funzione di stabilizzazione del pH liberando o accettando ioni H⁺ aggiunti al sistema, mantenendone, quindi, costante il pH. Dal punto di vista chimico, il tampone acetato rappresenta una buona soluzione alle esigenze dialitiche per le caratteristiche stesse del tampone: l'acido acetico, infatti, è un acido debole, a basso peso molecolare (MW 136), facilmente diffusibile e stabile e consente il mantenimento in soluzione dei sali di calcio e magnesio. L'acetato come tale, tuttavia, è fisiologicamente assente nell'organismo e deve essere metabolizzato entrando nel ciclo di Krebs: qui, l'Acetil-Coenzima-A sintasi, enzima limitante con una Km di 0.7 mmol, lo unisce al Coenzima A, consentendone l'utilizzo nel ciclo di Krebs. Una volta raggiunta la saturazione del sistema, l'Acetil-CoA prende vie metaboliche alternative

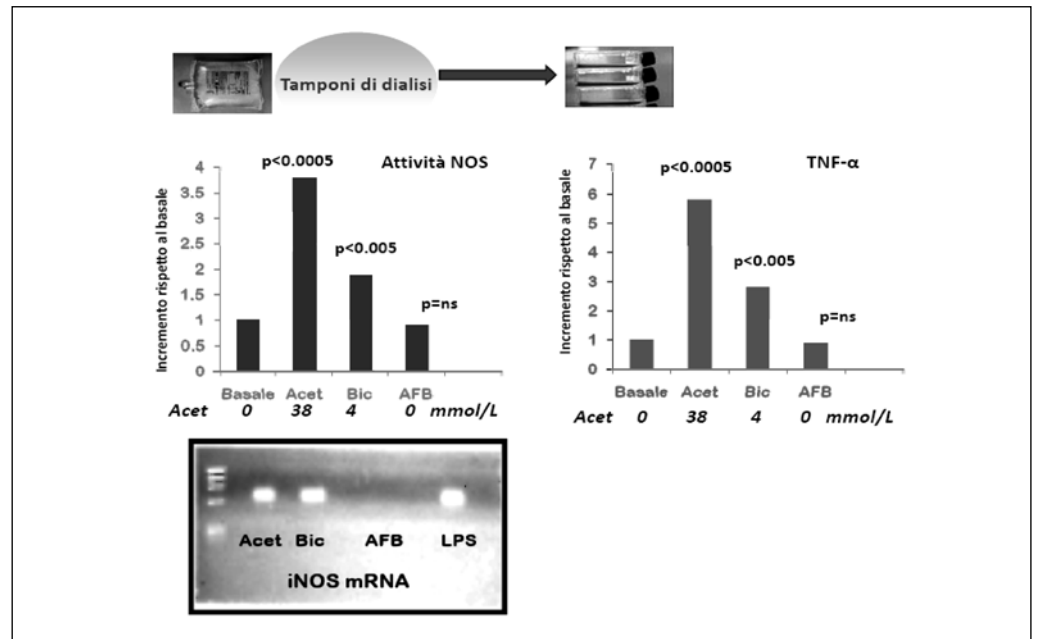
e potenzialmente dannose per l'organismo: la sintesi degli acidi grassi, fino alla formazione dei trigliceridi con lo sviluppo di una dislipidemia, oppure la via della chetogenesi, con la formazione di corpi chetonici o con la trasformazione diretta in acido lattico con lo sviluppo di acidosi. Proprio nell'utilizzazione alternativa al ciclo di Krebs dell'acetato in eccesso, trovano spiegazione gli effetti collaterali legati alla dialisi con tampone acetato, in particolare la dislipidemia cronica (9), l'instabilità emodinamica (10) e il rapido peggioramento dell'acidosi metabolica nelle prime ore di trattamento (11). Questi fenomeni sono stati definiti, alla fine degli anni '70, come "acetate intolerance" e hanno portato nuovamente alla rivalutazione del bicarbonato a partire dagli anni '80.

TAMPONI BICARBONATO

I nuovi tamponi bicarbonato, in uso ancora oggi, non hanno abbandonato del tutto l'utilizzo dell'acetato, presente in concentrazione variabile dai 3 ai 6 mmol/L: questa quota di acido acetico consente di risolvere il problema della precipitazione di carbonato di calcio e magnesio ma, pur limitando gli effetti più macroscopici dell'intolleranza all'acetato, non elimina gli effetti metabolici indotti dall'acetato (12). La concentrazione di 3-6 mmol/L, in realtà, è solo apparentemente bassa, tenendo conto che l'acetato è estraneo all'organismo e che, durante la dialisi, il gradiente è sempre a favore del trasferimento in direzione bagno-paziente, con un guadagno netto di 4 mmol/L, corrispondente a un'esposizione all'acetato 30-40 volte superiore rispetto al range fisiologico. Analizzando, inoltre, il bilancio di massa nel dettaglio, si evidenzia che, per una concentrazione di acetato nel dialisato di 4 mmol/L, l'acetato rappresenta il 25% del totale dei tamponi somministrati al paziente, che raggiunge il 49% per concentrazioni di acetato di 6 mmol/L: in termini assoluti, quindi, anche nella dialisi di bicarbonato con soluzioni *standard* in uso, in oltre l'80% dei pazienti si ha un'importante esposizione all'acetato (13). Se il problema macroscopico dell'"acetate intolerance" è, infatti, stato risolto con la riduzione della concentrazione dell'acetato nel dialisato, il problema dell'esposizione cronica all'acetato con tutti gli effetti cellulari e subcellulari derivanti da essa è ancora un problema di grande attualità.

Negli anni '90, molti esperimenti *in vitro* ed *ex vivo* hanno dimostrato che l'acetato è in grado di indurre reazioni di bioincompatibilità, analogamente ad altri materiali estranei all'organismo, quali quelli utilizzati per le membrane dei dializzatori. Su questo aspetto un grande contributo scientifico è stato dato da gruppi italiani, che, con i loro risultati, hanno stimolato l'industria alla ricerca di nuove soluzioni tecniche che consentisse-

Fig. 1 - Espressione dell'mRNA e attività NO sintasica e rilascio di TNF- α da cellule endoteliali in coltura dopo l'incubazione con acetato a differenti concentrazioni.



ro l'eliminazione dell'acetato dai dialisati: sono nati, infatti, in quegli anni, l'*Acetate Free Biofiltration* (AFB) (14, 15) e i dialisati con acido cloridrico al posto dell'acido acetico (16), che, anche se efficaci nel limitare la maggior parte dei fenomeni di bioincompatibilità, a causa dei costi trovano ancora una diffusione limitata.

REAZIONI DI BIOINCOMPATIBILITÀ INDOTTE DALL'ACETATO

Nel 1997, il nostro gruppo fornì la prima evidenza sperimentale che l'acetato induce il rilascio di ossido nitrico da parte di cellule endoteliali, utilizzando un modello *in vitro* (17). In questo studio, cellule endoteliali in coltura reagivano al contatto con l'acetato aumentando l'attività ossido nitrico sintasica dell'isoforma inducibile (iNOS) in maniera significativa rispetto alla condizione basale sia se stimolate da concentrazioni elevate di acetato (38 mmol/L), quali quelle osservate nei tamponi per la AD, sia a concentrazioni minori di acetato (4 mmol/L), pari a quelle presenti nei tamponi per BD, dove si osservava un effetto minore (Fig. 1). La iNOS, valutata sia come attività enzimatica che come espressione di mRNA, aumentava di circa 4 volte per la stimolazione da concentrazioni elevate di acetato e di oltre 2 volte per le concentrazioni basse, mentre le soluzioni per AFB non avevano alcun effetto. Analogo comportamento si è verificato per il rilascio di TNF α .

Questi dati sono stati confermati anche dallo studio *ex vivo* di M Noris et al. (18): il plasma estratto da pazienti sottoposti a dialisi con tamponi contenenti varie concentrazioni di acetato (AD, BD e AFB) stimolava

l'attività NOS in maniera più significativa per concentrazioni elevate di acetato e minore per le concentrazioni dei tamponi bicarbonato. Nello stesso studio, era valutata anche la presenza di IL-1 β nel plasma dei pazienti sottoposti ai diversi tipi di dialisi, che risultava maggiore nei pazienti in AD.

Questo gruppo (19) ha sostenuto, in un successivo lavoro, che i neutrofili provenienti dai pazienti sottoposti a BD rilasciavano anione superossido in quantità significativamente maggiore rispetto a quelli estratti dai pazienti dializzati in AFB. Questo dato è stato anche confermato da esperimenti di stimolazione *in vitro* di polimorfonucleati di soggetti sani che rilasciavano maggiori quantità di anione superossido quando cimentati con dialisato contenente acetato sia ad alta che a bassa concentrazione, rispetto ai tamponi senza acetato.

Il nostro gruppo (20), nel 2006, in un modello di dialisi *in vitro*, ha ulteriormente confermato le evidenze dei lavori precedenti mostrando una forte stimolazione endoteliale da parte dell'acetato anche in piccole concentrazioni, con l'induzione di uno stato infiammatorio cronico a cui partecipano anche i linfomonociti. I linfomonociti ottenuti da sangue esposto all'acetato mostravano un aumento dell'attività iNOS già dopo 15 minuti di dialisi. Le cellule endoteliali stimolate con questi linfomonociti, analogamente a quanto evidenziato nei modelli più semplici di colture *in vitro* ed *ex vivo*, dimostravano una pronta reattività all'acetato con un aumento dell'attività enzimatica della NOS (Fig. 2); una risposta analoga con l'aumento dell'attività NOS e della ciclo-ossigenasi 2 (COX-2) era stata osservata per la prima volta anche nelle cellule muscolari lisce.

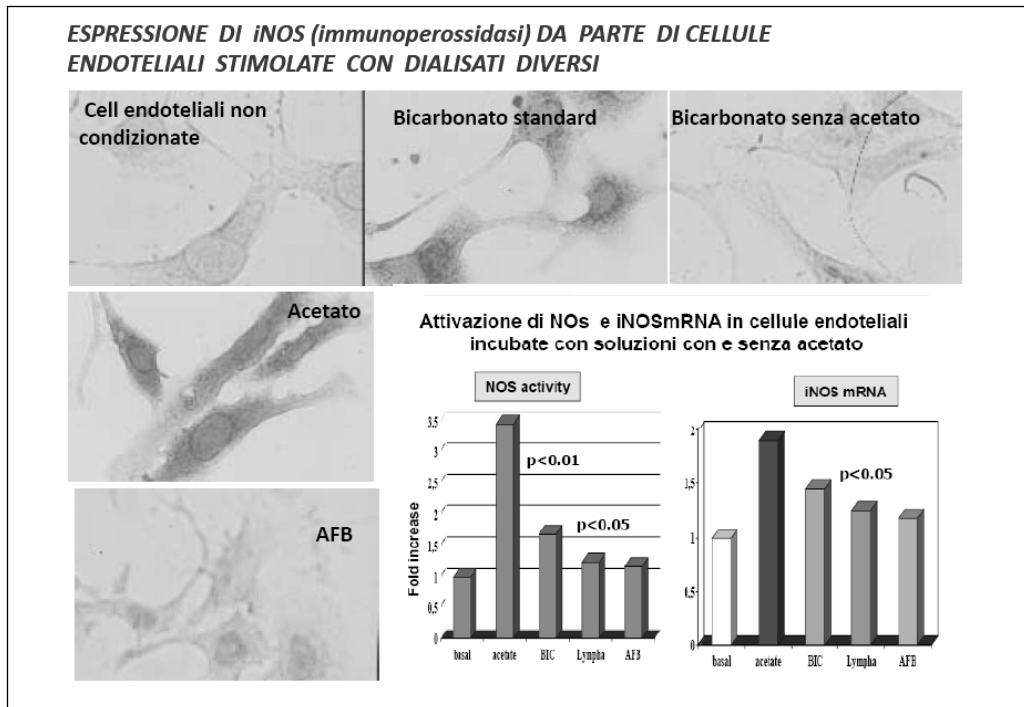


Fig. 2 - Espressione di NO sintasi da parte delle cellule endoteliali stimolate con dialisati da differente concentrazione di acetato.

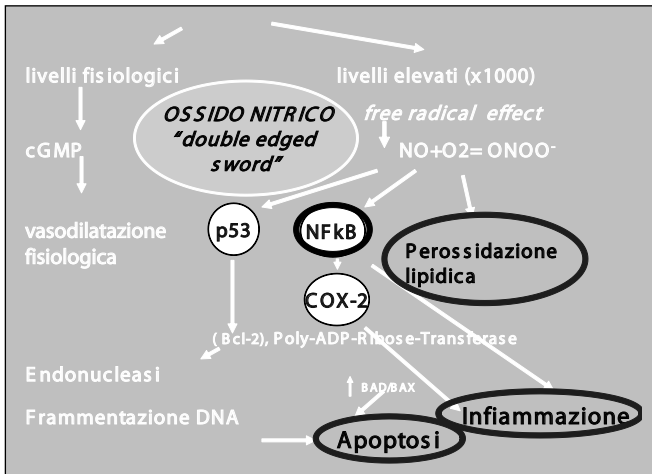


Fig. 3 - Effetti pleiotropici dell'ossido nitrico.

L'ossido nitrico è un mediatore chiave in numerosi processi ed è oggi chiaro il duplice ruolo sia in reazioni fisiologiche, come la vasodilatazione, rilasciato a basse concentrazioni per l'azione di NOS costitutiva, che come induttore di una fiammata ossidativa e infiammatoria, quando rilasciato a elevate concentrazioni in un breve intervallo di tempo per effetto della NOS inducibile (Fig. 3).

L'NO a elevata concentrazione, oltre 1000 volte superiore rispetto a quella fisiologica, si comporta come un potente radicale libero e dà origine alla cascata ossidativa con la produzione, in presenza di ossigeno, di altri composti ossidanti fortemente reattivi, come

perossinitrile (ONOO⁻), HOCl e NO₂Cl, capaci di aumentare il processo ossidativo, di amplificare la cascata infiammatoria attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione NFkB e di indurre apoptosi.

Gli effetti terminali di questa cascata sono stati studiati dal nostro gruppo (21), che ha dimostrato che l'acetato, anche alle concentrazioni della BD, è in grado di indurre apoptosi di cellule endoteliali coltivate *in vitro*. L'apoptosi è indotta dall'acetato in maniera dose dipendente e dipendente dal tempo di contatto dell'acetato con le cellule. In questo modello, l'inibitore specifico della NO sintasi aboliva completamente il fenomeno, chiarendo, quindi, che l'apoptosi delle cellule endoteliali è innescata in maniera diretta dal rilascio di grandi quantità di NO per l'attivazione della NOS inducibile. In un'altra serie di esperimenti, è stata dimostrata l'amplificazione della cascata infiammatoria per l'attivazione del fattore trascrizionale NFkB, principale punto di controllo della trascrizione dei geni coinvolti nel processo infiammatorio. Stimoli tra cui i radicali liberi come l'NO inducono la fosforilazione e il distacco dell'inibitore specifico IκB, permettendo a NFkB di traslocare all'interno del nucleo e di legarsi a sequenze regolatorie specifiche per la trascrizione di geni per molecole di adesione, citochine, chemochine, fattori della coagulazione, proteine della fase acuta e mediatori della vasocostrizione, amplificando globalmente la cascata infiammatoria.

L'acetato è in grado di indurre la traslocazione nucleare di NFkB e di dare avvio alla cascata infiammatoria

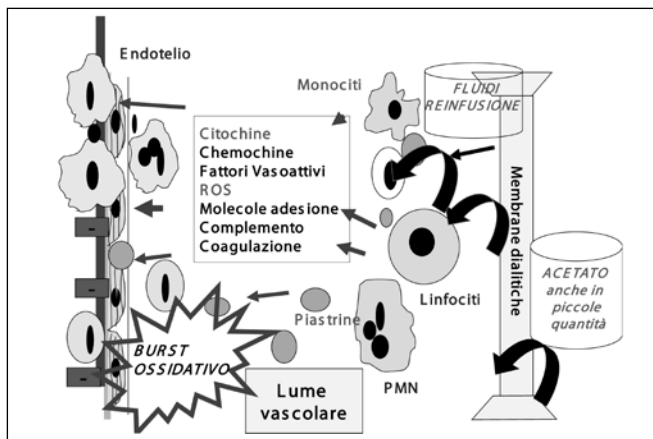


Fig. 4 - Meccanismi patogenetici della vasculopatia dialitica da reazioni di bioincompatibilità. Le cellule endoteliali rappresentano il primo bersaglio delle reazioni di bioincompatibilità da soluzioni di dialisi, innescando i processi fisiologici esitanti nelle alterazioni vascolari tipiche della vasculopatia dialitica.

che oggi sappiamo essere responsabile di molti dei sintomi dei pazienti in dialisi cronica, quali la miopatia, la neuropatia, la cachessia, l'anemia e, soprattutto, la vasculopatia.

Queste evidenze sperimentali sono state concordi nel dimostrare che l'acetato, anche in piccole concentrazioni, come quelle presenti nei dialisati per BD, è in grado di indurre una significativa attivazione endoteliale e di dare avvio a un processo infiammatorio cronico localizzato a livello vascolare, che può esitare in aterosclerosi e vasculopatia dialitica e sistemica, con manifestazioni cliniche che coinvolgono tutti gli organi.

ACETATO E ATEROSCLEROSI

Tutti gli studi sperimentali eseguiti sull'acetato hanno dimostrato che questo tampone esercita un importante effetto proinfiammatorio sistemico e che le cellule endoteliali sono i principali bersagli degli effetti indotti dall'acetato (Fig. 4): gli esperimenti *in vitro*, infatti, hanno dimostrato che, a livello endoteliale, avviene la prima risposta sia al contatto diretto con le molecole di acetato che al contatto con le cellule circolanti. Le cellule endoteliali sono estremamente reattive e capaci di amplificare il processo infiammatorio locale che oggi sappiamo dare avvio al processo di aterogenesi.

L'attivazione dell'NFκB endoteliale induce la trascrizione di molti geni coinvolti nell'infiammazione, capaci di automantenere e amplificare il processo di danno della parete vascolare sia per effetto chemiotattico sulle cellule circolanti che per effetto diretto, attraverso l'aumento della sintesi della NOS inducibile, di ciclo-ossigenasi, delle molecole di adesione e della coagulazione.

L'acetato, inoltre, attraverso il rilascio di NO, esercita un effetto antiproliferativo diretto sulle cellule endoteliali

li e un effetto pro-apoptotico sull'endotelio e successivo coinvolgimento anche delle cellule muscolari lisce della parete vascolare. Queste cellule, esposte all'effetto diretto di citochine infiammatorie, radicali liberi e altre sostanze circolanti, trasformano il loro fenotipo da cellula contrattile a cellula secretoria, perdendo contrattilità determinano rigidità vascolare e sintetizzando in quantità anomala collagene e altre proteine della matrice danneggiano irrimediabilmente il vaso.

Le alterazioni del rivestimento vascolare secondarie al danno endoteliale alterano il flusso laminare del sangue che diventa turbolento: questo segnale meccanico viene trasformato dalle cellule endoteliali in messaggio biochimico, attraverso l'attivazione di canali del calcio e di altri canali ionici e con la conseguente attivazione di una cascata di fenomeni che portano alla trascrizione di fattori specifici per l'attivazione dei geni della risposta allo *shear stress* (*shear stress responsive elements*). Vengono, quindi, trascritti geni per composti vasoattivi come l'endotelina, fattori di crescita come VEGF e PDGF, fattori della coagulazione e del complemento ed enzimi ad attività ossidativa (22, 23).

CONCLUSIONI

Negli anni '80-'90, erano stati notati gli effetti immediati indotti dalle alte concentrazioni di acetato durante la seduta dialitica (24, 25) ed era stato ben definito il ruolo dell'acetato nella patogenesi dell'instabilità vascolare e dell'ipotensione intradialitica. Queste osservazioni hanno indotto, negli anni '90, al progressivo abbandono dell'acetato dialisi a favore della bicarbonato dialisi, tollerata meglio in termini di stabilità emodinamica e di controllo dell'acidosi (11), ma ancora provvista di acetato in concentrazioni non trascurabili per l'organismo, soprattutto quando si considera l'esposizione cronica.

Negli anni 2000, l'interesse dei ricercatori e dei clinici si è spostato sul problema della vasculopatia dialitica (26) e dell'aterogenesi ad essa associata, che contribuiscono in maniera importante all'eccesso di mortalità cardiovascolare osservata nei pazienti uremici, anche dopo pochi mesi di dialisi e dopo il trapianto, anche per le fasce d'età più giovani (27, 28).

Nell'ottica della prevenzione del danno cardiovascolare, l'obiettivo dei prossimi anni dovrà essere quello del contenimento di tutti i fattori di rischio potenzialmente concause della vasculopatia dialitica: la giusta considerazione degli effetti indotti cronicamente da concentrazioni anche basse di acetato, quali quelle presenti nei dialisati per la bicarbonato dialisi, ancora utilizzata in oltre l'80% dei pazienti, potrebbe contribuire al raggiungimento di buoni risultati in termini di riduzione del danno vascolare, in associazione con tutte le altre misure adatte alla riduzione dello stato in-

fiammatorio cronico del paziente in dialisi (29).

La disponibilità di soluzioni del tutto prive di acetato anche per le metodiche diffuse e la conoscenza sempre più fine dei meccanismi del danno cellulare da acetato offriranno al nefrologo la possibilità di scegliere il dialisato che offra maggiori garanzie di una minima stimolazione infiammatoria anche sul lungo termine (30-34).

RIASSUNTO

Negli ultimi 20 anni, una gran mole di studi ha dimostrato che, nell'insufficienza renale cronica, è presente una situazione di infiammazione cronica, che aumenta ulteriormente dopo l'avvio della dialisi.

In questa fase, un ruolo fondamentale è giocato da reazioni globalmente definite come reazioni di biocompatibilità, indotte dal contatto con i diversi materiali da dialisi: membrane, linee, dialisati e contaminanti dell'acqua.

I sintomi acuti indotti da reazioni di biocompatibilità, clinicamente molto evidenti, sono tenuti in grande considerazione da parte dei nefrologi, mentre i sintomi cronici, più sfumati e dannosi sul lungo termine, ma con scarsa

evidenza immediata, sono spesso sottostimati.

Fin dagli anni '90, la maggior parte degli studi è stata indirizzata al miglioramento delle membrane e del trattamento delle acque, mentre, per i dialisati, molto lavoro può ancora essere fatto.

L'acetato dialisi viene ancora utilizzata routinariamente solo nel 5% dei pazienti, ma è importante sottolineare che oltre l'80% dei pazienti in tutto il mondo è ancora esposto alle basse dosi di acetato presenti nel dialisato per bicarbonato dialisi standard.

Queste concentrazioni non sono trascurabili e sono in grado di determinare reazioni infiammatorie croniche che convergono prevalentemente sull'endotelio, stimolando e mantenendo il processo di aterogenesi con complicanze a lungo termine in termini di morbilità cardiovascolare.

Questa revisione discute i dati disponibili oggi sugli effetti cellulari e molecolari indotti dall'acetato anche a bassa concentrazione.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

BIBLIOGRAFIA

- Amore A, Coppo R. Immunological basis of inflammation in dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17 (Suppl. 8): 16-24.
- Munger MA, Ateshkadi A, Cheung AK, Flaharty KK, Stoddard GJ, Marshall EH. Cardiopulmonary events during hemodialysis: effects of dialysis membranes and dialysate buffers. *Am J Kidney Dis* 2000; 36 (1): 130-9.
- Rousseau Y, Haeffner-Cavaillon N, Poignet JL, Meyrier A, Carreno MP. In vivo intracellular cytokine production by leukocytes during haemodialysis. *Cytokine* 2000; 12 (5): 506-17.
- Eiselt J, Racek J, Opatrny K Jr. The effect of hemodialysis and acetate-free biofiltration on anemia. *Int J Artif Organs* 2000; 23 (3): 173-80.
- Wiecek A, Franek E, Kokot F, Rudka R. Influence of acetate and bicarbonate hemodialysis on the plasma erythropoietin concentration in patients with chronic renal failure. *Int J Artif Organs* 1997; 20 (2): 108-11.
- Sam R, Vaseemuddin M, Leong WH, Rogers BE, Kjellstrand CM, Ing TS. Composition and clinical use of hemodialysates. *Hemodial Int* 2006; 10 (1): 15-28.
- Thaha M, Yogiartoro M, Soewanto, Pranawa. Correlation between intradialytic hypotension in patients undergoing routine hemodialysis and use of acetate compared in bicarbonate dialysate. *Acta Med Indones* 2005; 37 (3): 145-8.
- Harzallah K, Hichri N, Mazigh C, Tagorti M, Hmida A, Hmida J. Variability of acid-base status in acetate-free biofiltration 84% versus bicarbonate dialysis. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2008; 19 (2): 215-21.
- Yalçın A, Kocaolu S, Akçiçek F, Ozyer A. Effects of acetate or bicarbonate dialysis solutions on serum HDL and HDL subfractions of patients undergoing haemodialysis. *Curr Med Res Opin* 1999; 15 (4): 310-5.
- Hegbrant J, Mårtensson L, Thysell H, Ekman R, Boberg U. Changes in plasma levels of vasoactive substances during routine acetate and bicarbonate hemodialysis. *Clin Nephrol* 1994; 41 (2): 106-12.
- Suzuki M, Hirasawa Y. Correction of metabolic acidosis and changes in plasma acetate levels in acetate and bicarbonate dialyses and acetate-free biofiltration. *Contrib Nephrol* 1994; 108: 114-20.
- Bruges M, Barata JD, Oliveira C, Furstenau C, Gomes EM, Simões J. [Hemodialysis with bicarbonate 30 mEq/l versus 34 mEq/l and acetate: better hemodynamic tolerance and electrolyte and acid-base homeostasis]. *Acta Med Port* 1994; 7 (3): 165-70.
- Panichi V, Parrini M, Bianchi AM, et al. Mechanisms of acid-base homeostasis in acetate and bicarbonate dialysis, lactate hemofiltration and hemodiafiltration. *Int J Artif Organs* 1994; 17 (6): 315-21.
- Kuno T, Kikuchi F, Yanai M, Nagura Y, Takahashi S. Clinical advantages of acetate-free biofiltration. *Contrib Nephrol* 1994; 108: 121-30.
- Santoro A, Guarnieri F, Ferramosca E, Grandi F. Acetate-free biofiltration. *Contrib Nephrol* 2007; 158: 138-52.
- Fournier G, Potier J, Thébaud HE, Majdalani G, Ton-That H, Man NK. Substitution of acetic acid for hydrochloric acid in the bicarbonate buffered dialysate. *Artif Organs* 1998; 22 (7): 608-13.
- Amore A, Cirina P, Mitola S, et al. Acetate intolerance is mediated by enhanced synthesis of nitric oxide by endothelial cells. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8 (9): 1431-6.
- Noris M, Todeschini M, Casiraghi F, et al. Effect of acetate, bicarbonate dialysis, and acetate-free biofiltration on nitric oxide synthesis: implications for dialysis hypotension. *Am J Kidney Dis* 1998; 32 (1): 115-24.

19. Todeschini M, Macconi D, Fernández NG, et al. Effect of acetate-free biofiltration and bicarbonate hemodialysis on neutrophil activation. *Am J Kidney Dis* 2002; 40 (4): 783-93.
20. Amore A, Cirina P, Bonaudo R, Conti G, Chiesa M, Coppo R. Bicarbonate dialysis, unlike acetate-free biofiltration, triggers mediators of inflammation and apoptosis in endothelial and smooth muscle cells. *J Nephrol* 2006; 19 (1): 57-64.
21. Amore A, Conti G, Cirina P, et al. [Biocompatibility of the acetate in the dialysis fluid]. *G Ital Nefrol* 2004; 21 (Suppl. 30): S91-6.
22. Higuchi T, Yamamoto C, Kuno T, et al. A comparison of bicarbonate hemodialysis, hemodiafiltration, and acetate-free biofiltration on cytokine production. *Ther Apher Dial* 2004; 8 (6): 460-7.
23. Tepel M, Echelmeyer M, Orie NN, Zidek W. Increased intracellular reactive oxygen species in patients with end-stage renal failure: effect of hemodialysis. *Kidney Int* 2000; 58 (2): 867-72.
24. Schrandt-vd Meer AM, ter Wee PM, Kan G, Donker AJ, van Dorp WT. Improved cardiovascular variables during acetate free biofiltration. *Clin Nephrol* 1999; 51 (5): 304-9.
25. Galli G, Panzetta G. Acetate free biofiltration (AFB): from theory to clinical results. *Clin Nephrol* 1998; 50 (1): 28-37.
26. Savoldi S, Sereni L, Bertok S, et al. [The hemodiafiltration with infusion of acetate-free dialysis fluid can modify the inflammatory response in patients "high responders" to inflammatory stimuli?]. *G Ital Nefrol* 2004; 21 (Suppl. 30): S122-7.
27. Grandi E, Govoni M, Furini S, et al. Induction of NO synthase 2 in ventricular cardiomyocytes incubated with a conventional bicarbonate dialysis bath. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23 (7): 2192-7.
28. Santoro A, Panzetta G, Tessitore N, et al. A prospective randomised European multicentre study of medium-long run mortality and morbidity comparing acetate-free biofiltration and bicarbonate dialysis. *J Nephrol* 1999; 12 (6): 375-82.
29. Coll E, Pérez-García R, Rodríguez-Benítez P, et al. [Clinical and analytical changes in hemodialysis without acetate]. *Nefrologia* 2007; 27 (6): 742-8.
30. Duranti E. Acetate-free hemodialysis: a feasibility study on a technical alternative to bicarbonate dialysis. *Blood Purif* 2004; 22 (5): 446-52.
31. Pizzarelli F, Cerrai T, Ferro G, Dattolo P. [On-line hemodiafiltration without acetate]. *G Ital Nefrol* 2004; 21 (Suppl. 30): S97-101.
32. Coll E, Pérez-García R, Martín de Francisco AL, et al. [Acetate-free on-line PHF: how to improve hyperacetatemia and haemodynamic tolerance]. *Nefrologia* 2009; 29 (2): 156-62.
33. Pizzarelli F, Cerrai T, Dattolo P, Ferro G. On-line haemodiafiltration with and without acetate. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21 (6): 1648-51.
34. Selby NM, Fluck RJ, Taal MW, McIntyre CW. Effects of acetate-free double-chamber hemodiafiltration and standard dialysis on systemic hemodynamics and troponin T levels. *ASAIO J* 2006; 52 (1): 62-9.