



ELSEVIER

ARTICLE ORIGINAL

**Néphrologie
& Thérapeutique**

www.elsevier.com/locate/nephro

Influence de l'hémodialyse sur les concentrations de malonedialdéhyde total et libre, mesurées par une nouvelle technique HPLC spécifique

Influence of hemodialysis on total and free malondialdehyde measured by a new HPLC method

Jean-Paul Steghens ^{a,*}, François Combarrous ^b, Walid Arkouche ^c,
Françoise Flourie ^a, Aoumeur Hadj-Aissa ^d

^a Fédération de biochimie, hôpital Édouard-Herriot, EA 3090, UCBL1, place d'Arsonval, 69347 Lyon cedex 03, France

^b Service de néphrologie, hôpital Édouard-Herriot, place d'Arsonval, 69347 Lyon cedex 03, France

^c A.U.R.A.L., 52, boulevard Pinel, Lyon, France

^d Service d'exploration fonctionnelle rénale et métabolique, hôpital Édouard-Herriot, place d'Arsonval, 69347 Lyon cedex 03, France

Reçu le 5 avril 2004 ; accepté le 13 avril 2004

MOTS CLÉS

Stress oxydatif ;
Lipoperoxidation ;
Malonedialdéhyde ;
Hémodialyse

KEYWORDS

Oxidative stress;
Lipoperoxidation;
Malondialdehyde;
Haemodialysis

Résumé L'évaluation du stress oxydant est nécessaire chez les patients en insuffisance rénale chronique (IRC) dialysés, car il est impliqué comme facteur de risque cardiovasculaire. Il est souvent évalué en mesurant le produit terminal de la peroxydation lipidique, le malonedialdéhyde (MDA). La technique la plus utilisée, pour sa mesure, est celle dite des TBARS, facile à réaliser mais très peu spécifique. Nous avons mesuré, par HPLC-UV avec du diaminonaphtalène, le MDA total et libre, avant et après dialyse, chez 54 patients dialysés au long cours. Les deux formes du MDA, total et libre, sont plus élevées avant dialyse. Après dialyse, la fraction libre décroît mais de manière plus faible que l'urée ou la créatinine. Le poids moléculaire du MDA étant 72 Da, cela suggère que le MDA libre est plus ou moins lié à des composés de faible poids moléculaire et/ou qu'il pourrait être produit pendant la dialyse. Nous proposons cette nouvelle technique pour explorer la relation entre stress oxydant, hémodialyse et MDA.

© 2005 Elsevier SAS et Association Société de Néphrologie. Tous droits réservés.

Abstract Accurate evaluation of oxidative stress is needed for patients on chronic hemodialysis (HD), as cardiovascular risk level seems related to it. Oxidative stress is often evaluated by measuring an end product of lipoperoxidation named malondialdehyde (MDA). However, the most common technique for measuring MDA, the Thio Barbituric Acid Reactive Substances method (TBARS), is known to be sensitive but poorly specific. We

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : jean-paul.steghens@chu-lyon.fr (J.-P. Steghens).

measured true total and free plasma MDA in fifty-four unselected patients on long-term HD, before and after HD sessions, by a new, highly specific HPLC method. Total and free MDA were higher before than after dialysis. Essentially, free MDA was decreased by HD but its fractional decrease was lower than that of urea or creatinine. This confirms that, in fact, free MDA is more or less bound to low molecular weight compounds and/or suggests that MDA may be produced mainly during HD sessions. We propose this new tool to further explore the relationship between oxidative stress, HD and true MDA.

© 2005 Elsevier SAS et Association Société de Néphrologie. Tous droits réservés.

Introduction

Les patients dialysés au long cours subissent probablement un stress oxydant [1,2] lié, soit à l'insuffisance rénale soit à l'hémodialyse soit aux deux. Ce stress peut majorer significativement l'insuffisance rénale et les pathologies cardiovasculaires associées, causes majeures de morbi-mortalité de ces patients [3,4]. Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre fonctions antioxydantes et production de radicaux libres [5], entraînant des dommages cellulaires. Il est souvent évalué par la mesure d'un produit terminal de la peroxydation lipidique, le malonedialdéhyde (MDA), hautement réactif vis-à-vis des protéines et des acides nucléiques, et qui existe sous forme liée ou non aux protéines plasmatiques [6,7]. La méthode la plus facile à utiliser pour mesurer le MDA est la méthode dite des TBARS (Thio Barbituric Acid Reactive Substances) mais elle est peu sensible et très peu spécifique [8] : en effet l'acide thiobarbiturique réagit avec quelques sucres, des aldéhydes de petit poids moléculaire (formaldéhyde, acétaldéhyde, malonedialdéhyde, etc.) et certains médicaments. Cela explique pourquoi les résultats obtenus dans les études chez les hémodialysés au long cours sont souvent contradictoires avec, soit une diminution [9,10], soit une stabilité ou même une augmentation de la concentration de MDA [11,12].

Comme de nouvelles thérapeutiques [13] destinées à contrôler le stress oxydant pendant la dialyse sont proposées, nous avons utilisé une nouvelle méthode spécifique [14] pour évaluer son intérêt dans la mesure du stress oxydant au cours de l'hémodialyse chronique. Elle permet la mesure du MDA total et du MDA libre. Le MDA total correspond à la somme du MDA lié aux protéines et du MDA libre. Ce dernier, possédant deux fonctions aldéhydiques, réagit très facilement avec les amines libres, en particulier celles des aminoacides protéiques, et il représente la forme initiale de production au cours de la lipoperoxydation. C'est donc la forme libre qui serait le reflet d'un stress oxydant récent, alors que le MDA total serait un marqueur cumulatif. Cette méthode offrirait une nouvelle approche

pour la compréhension du développement du stress oxydant au cours de la dialyse et permettrait d'évaluer différents aspects de la biocompatibilité des membranes de dialyse. Ce type de mesure, pour apprécier l'amplitude du stress oxydant lié à la dialyse, présente un regain d'intérêt comme le montrent deux études récentes [15,16] étudiant les effets antioxydants de la vitamine E : cette dernière ne présente aucun avantage préventivement chez l'insuffisant rénal non dialysé, alors que, coâtée sur la membrane de dialyse, elle se montre apparemment efficace pour diminuer la surproduction de certaines cytokines pro-inflammatoires.

Patients et méthodes

Patients

Cinquante-quatre patients insuffisants rénaux chroniques traités par hémodialyse (4 à 5 heures, 3 fois par semaine) ont été étudiés. Leurs pathologies et caractéristiques sont résumées dans le [Tableau 1](#).

Les membranes de dialyse utilisées étaient de quatre types : polyacrylonitrile (PAN), polysulfone (PS), polyméthyl méthacrylate et tri-acétate de cellulose. Le dialysat était une solution standard tamponnée avec du bicarbonate de sodium. L'héparinisation a consisté en un bolus initial d'héparine non fractionnée suivie d'une perfusion continue. Les prélèvements ont été réalisés sur héparine avant dialyse, et, après arrêt de la pompe, en fin de dialyse dans la voie veineuse. L'urée, la créatinine et les protéines totales étaient dosées le jour même, alors que les prélèvements plasmatiques pour le MDA étaient congelés à -20° une semaine au maximum.

Méthodes

La créatinine (méthode compensée de Jaffé avec blanc échantillon), l'urée (méthode enzymatique UV) et les protéines totales (méthode colorimétrique) ont été mesurées sur analyseur Modular (Ro-

Tableau 1 Caractéristiques cliniques des 54 patients inclus dans l'étude.

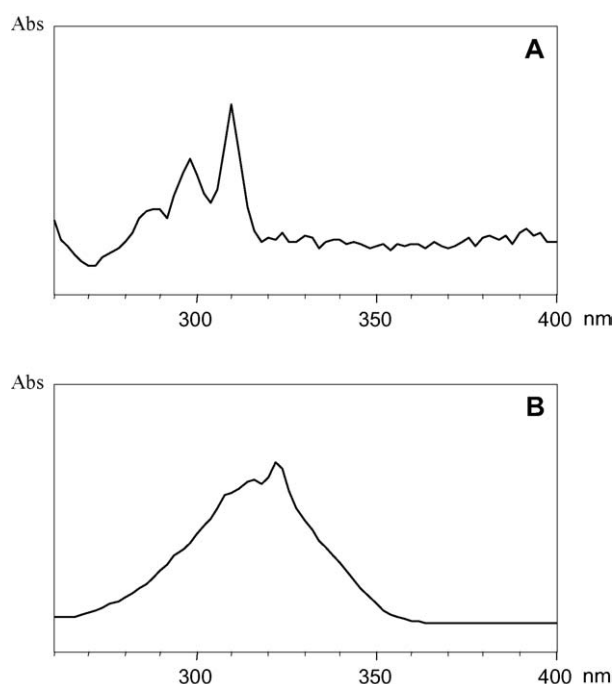
| | Patients |
|--|---|
| n (homme/femme) | 54 (27/27) |
| Âge (années) (moyenne \pm SEM) | 63,9 \pm 13,8 |
| Années de dialyse en mois (moyenne, min, max) | 66, 1, 390 |
| Maladie rénale primitive | 12 maladies vasculaires 10 néphropathies diabétiques 9 néphrites interstitielles chroniques 8 glomérulonéphrites chroniques 7 inconnues 4 polykystoses rénales 2 myélomes multiples 1 amyloïdose 1 maladie de Wegener |
| Indice de masse corporelle. (moyenne \pm SEM) | 23,1 \pm 4,4 |

che), le MDA total et libre par une nouvelle technique très spécifique en HPLC-UV [14]. Brièvement cette méthode est fondée sur la dérivation du MDA par le diamionaphtalène en milieu acide à 37° pendant 180 minutes. La séparation chromatographique est réalisée avec une colonne de phase inverse et la détection avec une barrette de diode. Le diazépinium formé a un spectre très spécifique, en UV, avec un maximum d'adsorption à 311 nm (Fig. 1A), qui le différencie clairement d'autres aldéhydes courts comme le formaldéhyde ou l'acétaldéhyde (Fig. 1B). Les spectres, spécifiques, associés à la séparation chromatographique, assurent une très grande sélectivité de mesure. L'autre avantage de cette méthode est lié au coefficient d'extinction élevé du diazépinium qui permet de n'utiliser que 200 μ L d'échantillon.

Par cette technique, la valeur normale du MDA total, mesurée chez 79 femmes et 19 hommes est de 150 ± 6 nM, et celle du MDA libre est de 25 ± 2 nM [14].

Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Différents tests statistiques ont été utilisés : test *t* apparié pour comparer les valeurs avant et après dialyse, test *t* non apparié pour comparer les différences entre les groupes, le χ^2 pour comparer les variables nominales. Enfin, les corrélations ont été réalisées par régression linéaire. Un $p < 0,05$ était considéré comme significatif.

**Figure 1** Spectres obtenus au cours d'une analyse HPLC du MDA sur un échantillon plasmatique.

A : spectre du dérivé du MDA avec un maximum d'absorption à 311 nm et sans absorption notable à 325 nm.

B : spectre caractéristique des dérivés d'aldéhydes courts comme le formaldéhyde ou l'acétaldéhyde, avec un maximum d'absorption à 325 nm.

Résultats

Comme attendu, la créatinine plasmatique diminue de 635 ± 25 μ M à 232 ± 11 μ M après dialyse et l'urée de $23,4 \pm 1,0$ mM à $6,05 \pm 0,4$ mM ($p < 0,0001$). Les protéines totales plasmatiques augmentent de $69,8 \pm 0,9$ g/L à $78,2 \pm 1,42$ g/L ($p < 0,0001$).

Avant dialyse, le MDA total est de 316 ± 17 nM et sa fraction libre est égale à 178 ± 17 nM. Après dialyse les concentrations sont respectivement de 191 ± 8 nM et 80 ± 6 nM ($p < 0,0001$) (Fig. 2). La

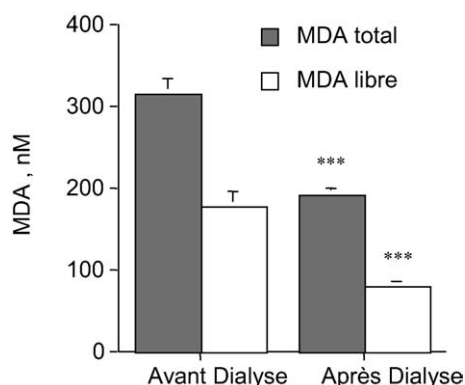
**Figure 2** Concentrations du MDA total et libre, avant et après dialyse, chez 54 patients dialysés au long cours (moyenne \pm SEM, nM, *** $p < 0,0001$ vs avant dialyse).

Tableau 2 Concentrations plasmatiques de la créatinine, de l'urée, du MDA total et libre avant et après dialyse dans deux sous-groupes de patients dialysés, soit avec une membrane en polyacrylonitrile (PAN), soit en polysulfone (PS).

| Type de membrane | | PAN (n = 14) | PS (n = 22) | p |
|------------------|-------|--------------|-------------|-------|
| Créatinine (μM) | Avant | 674 ± 39 | 658 ± 39 | ns |
| | Après | 259 ± 26 | 238 ± 16 | ns |
| Urée (mM) | Avant | 24,0 ± 1,3 | 22,4 ± 1,5 | ns |
| | Après | 6,8 ± 0,8 | 5,6 ± 0,5 | ns |
| MDA total (nM) | Avant | 364 ± 41 | 277 ± 16 | 0,03 |
| | Après | 229 ± 19 | 174 ± 9 | 0,007 |
| MDA libre (nM) | Avant | 202 ± 38 | 137 ± 15 | ns |
| | Après | 106 ± 15 | 72 ± 7 | 0,03 |

ns : non significatif.

variation du MDA libre est corrélée avec celle du MDA total ($r = 0,59$; $p < 0,0001$).

Les pourcentages de diminution, induits par la dialyse, de la créatinine ($63,2 \pm 1,1$ %) et de l'urée ($74,3 \pm 1,3$ %) sont statistiquement différents de ceux du MDA total ($36,1 \pm 2,1$ %) et du MDA libre ($48,7 \pm 2,5$ %) ($p < 0,0001$).

Aucune corrélation n'a été trouvée entre d'une part l'âge des patients, leur sexe, leur index de masse corporelle, l'ancienneté de la dialyse, et d'autre part les valeurs du MDA total ou libre.

Nous avons recherché une relation éventuelle entre le type de membrane de dialyse et le MDA. Parmi les 54 patients étudiés, six avaient changé récemment de membrane de dialyse, et les 12 autres, dialysés sur PMMA et TAC, ne représentaient pas un effectif suffisant pour permettre une analyse statistique ; seuls ceux dialysés régulièrement avec une membrane en polyacrylonitrile ($n = 14$) et une membrane en polysulfone ($n = 22$) représentaient un effectif suffisant pour une comparaison. Dans ces deux groupes, les concentrations plasmatiques de créatinine et d'urée avant dialyse et leur diminution après dialyse ne sont pas statistiquement différentes, ainsi que le BMI, l'âge, la durée de dialyse et le sexe ratio. Le MDA total, avant comme après dialyse, est significativement plus bas dans le groupe polysulfone. Le MDA libre n'est significativement plus bas qu'après dialyse (Tableau 2).

Discussion

À notre connaissance, ce travail est le premier qui a étudié chez des patients insuffisants rénaux, l'influence de la séance de dialyse et de son effet au long cours sur les concentrations de MDA total et libre, mesurées avec cette méthode. Avant dialyse, les valeurs plasmatiques du MDA total sont en moyenne deux fois plus hautes que les valeurs de référence déterminées chez le sujet sain [14]. Elles sont en accord avec les résultats obtenus par Das-

chner et al. [10] qui ont utilisé une méthode des TBARS améliorée par Lepage [17]. L'élévation du MDA total reflète l'augmentation du stress oxydant des patients hémodialysés [13,18,19]. Les valeurs du MDA total sont très dispersées (moyenne = 316 nM, écart : 172-735) : cela peut s'expliquer par le recrutement de nos patients qui n'a pas été randomisé. Ainsi, nous n'avons pas tenu compte de plusieurs facteurs biologiques connus pour influencer la balance « oxydants-antioxydants » : profil lipidique, statut sérologique pour l'hépatite C [20], statut nutritionnel et vitaminique, supplémentation en oligoéléments, tabagisme et traitements médicamenteux associés. Cela probablement explique aussi pourquoi nous ne trouvons aucune corrélation entre les valeurs du MDA, l'âge des patients ou l'ancienneté de la dialyse, ces deux derniers facteurs étant connus pour influencer la balance oxydants-antioxydants, respectivement, chez les sujets sains et les insuffisants rénaux.

Un autre trait marquant de cette population était l'importante augmentation (trois fois) du pourcentage du MDA libre par rapport au MDA total (54 vs 15 % chez les sujets sains). En tant que produit terminal de la lipoperoxydation, le MDA apparaît initialement sous forme libre puis il se lie aux protéines. L'élévation du MDA libre serait ainsi la cause de l'élévation du MDA total, bien que nous ne puissions exclure que la vitesse de liaison du MDA libre aux protéines soit diminuée chez les patients insuffisants rénaux chroniques (diminution potentiellement due à la présence des toxines urémiques [21], composants plus ou moins bien définis). Enfin, une dernière hypothèse est que l'augmentation du MDA libre soit liée à l'insuffisance rénale elle-même.

Les séances d'hémodialyse entraînent une diminution très significative du MDA total et libre. Cependant, la diminution du MDA libre est plus faible que celle de l'urée et de la créatinine. Or, leurs poids moléculaires respectifs (60, 72 et 113 Da pour l'urée, le MDA et la créatinine) n'expliquent pas la différence des pourcentages d'épuration

($74,3 \pm 1,3 \%$; $48,7 \pm 2,5 \%$ et $63,2 \pm 1,1 \%$). D'une part, cela suggère que le MDA libre, par sa haute réactivité chimique, est plus ou moins lié à des composés inconnus de faible poids moléculaire, diminuant son passage transmembranaire. D'autre part, comme les taux d'épuration du MDA libre et total sont significativement corrélés ($r = 0,59$, $p < 0,0001$), le MDA libre semble être la principale forme dialysable, même si son type de transport (diffusion, convection,...) n'a pas été encore déterminé. Une dernière hypothèse, la plus plausible, est que le MDA libre est produit principalement pendant la dialyse et cela expliquerait son faible taux d'épuration.

L'intérêt de ce type de mesure concerne aussi l'effet éventuel de différents types de membrane de dialyse sur le stress oxydant. Bien que non randomisés, ces patients sont comparables pour l'âge, l'ancienneté de la dialyse, l'index de masse corporelle, le sexe. De plus jugée sur les paramètres habituels, urémie et créatininémie, l'efficacité de la dialyse est identique dans les deux groupes. Cependant, le MDA total, avant et après dialyse, ainsi que le MDA libre, sont significativement différents chez les deux groupes de patients. Il semble donc que la mesure du MDA, sous ses deux formes, puisse mettre en évidence des différences liées au type de membrane.

Conclusion

Cette nouvelle technique spécifique de mesure du MDA, total et libre, confirme l'importance du stress oxydant chez les hémodialisés chroniques et semble apporter des éléments nouveaux pour comprendre les relations entre dialyse et stress oxydant. Elle permet peut être aussi d'évaluer certains aspects de la biocompatibilité des membranes, mais de nouvelles études sont nécessaires pour confirmer les résultats obtenus et l'utilité de ce nouvel outil.

Références

- [1] Tetta C, Biasoli S, Schiavon R, et al. An overview of haemodialysis and oxidant stress. In: Lameire N, Tetta C, Ronco C, editors. *Haemodialysis and Oxidant Stress*. Basel, Karger; 1999. p. 118-26.
- [2] Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat. Le stress oxydant dans l'insuffisance rénale chronique et l'hémodialyse. *Nephrol* 2003;24:377-9.
- [3] Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(Suppl. 12):165-235.
- [4] Druke TB, Khoa TN, Massy ZA, et al. Role of oxidized low-density lipoprotein in the atherosclerosis of uremia. *Kidney Int* 2001;59(Suppl. 78):114S-119S.
- [5] Morena M, Martin-Mateo M, Cristol JP, Canaud B. Stress oxydant, hémoincompatibilité et complications de la dialyse au long cours. *Nephrol* 2002;23:201-8.
- [6] Hartley DP, Kolaja KJ, Reichard J, et al. 4-Hydroxynonenal and Malondialdehyde Hepatic Protein Adduct in Rats Treated with Carbon Tetrachloride. *Immunochemical Detection and Lobular Localization*. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;161:23-33.
- [7] Kearley ML, Patel A, Chien J, et al. Observation of a New Nonfluorescent Malondialdehyde-Acetaldehyde-Protein Adduct by ¹³C NMR Spectroscopy. *Chem Res Toxicol* 1999;12:100-5.
- [8] Benzie IFF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int J Food Sci Nutr* 1996;47:233-61.
- [9] Boaz M, Matas Z, Biro A, et al. Comparison of Hemostatic Factors and Serum Malondialdehyde as Predictive Factors for Cardiovascular Disease in Haemodialysis Patients. *Am J Kidney Dis* 1999;34:438-434.
- [10] Daschner M, Lenhartz H, Botticher D, et al. Influence of dialysis on plasma lipid peroxidation products and antioxidant levels. *Kidney Int* 1996;50:1268-1262.
- [11] Peuchant E, Carbonneau MA, Dubourg L, et al. Lipoperoxidation in plasma and red blood cells of patients undergoing haemodialysis: vitamins A, E, and iron status. *Free Rad Biol Med* 1994;16:339-336.
- [12] Satoh M, Yamasaki Y, Kasahara J, et al. Oxidative stress is reduced by the long-term use of vitamin E-coated dialysis filters. *Kidney Int* 2001;59:1943-50.
- [13] Galli F, Varga Z, Balla J, et al. Vitamin E, lipid profile, and peroxidation in haemodialysis patients. *Kidney Int* 2001;59(Suppl. 78):148S-141S.
- [14] Steghens JP, van Kappel A, Denis I, et al. Diaminonaphthalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of true total and free malondialdehyde in human plasma or serum. *Free Rad Biol Med* 2001;31:242-9.
- [15] Libetta C, Zucchi M, Gori E, Sepe V, Galli F, Meloni F, et al. Vitamin E-loaded dialyser resets PBM-operated cytokine network in dialysis patients. *Kidney Int* 2004;65:1473-81.
- [16] Mann JFE, Lonn EM, Yi Q, Gerstein HC, Hoogwerf BJ, Pogue J, et al. Effects of vitamin E on cardiovascular outcomes in people with-to-moderate renal insufficiency: Results of the HOPE study. *Kidney Int* 2004;65:1375-80.
- [17] Lepage G, Munoz G, Champagne J, et al. Preparative Steps Necessary for the Accurate Measurement of Malondialdehyde by HPLC. *Anal Biochem* 1991;197:277-271.
- [18] Zima T, Haragsim L, Stipek S, et al. Lipid peroxidation on dialysis membranes. *Biochem Mol Biol Int* 1993;29:531-7.
- [19] Weinstein T, Chagnac A, Korzets A, et al. Haemolysis in haemodialysis patients: evidence for impaired defence mechanisms against oxidative stress. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:883-7.
- [20] Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, et al. Lipid Peroxidation Products and Antioxidants in Human Disease. *Environ Health Perspect* 1998;106(Suppl 5):1229S-1224S.
- [21] Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argiles A, Baurmeister U, Brunet P, et al., European Uremic Toxin Work Group (EUTox). Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int* 2003;63(5):1934-43 (Review).