



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för kliniska vetenskaper

Förekomst av hyperaldosteronism hos katter med kroniskt förhöjda njurvärden

-

med utvärdering av en aldosteron-ELISA för hund och katt



Ann-Catrin Hagblom

*Uppsala
2016*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2017:79*

Förekomst av hyperaldosteronism hos katter med kronisk förhöjda njurvärden – med utvärdering av en aldosteron-ELISA för hund och katt

Prevalence of hyperaldosteronism in cats with chronic azotemia – including validation of an aldosterone-ELISA in dogs and cats

Ann-Catrin Hagblom

Handledare: *Jeanette Hanson, institutionen för kliniska vetenskaper*

Examinator: *Helene Hamlin, institutionen för kliniska vetenskaper*

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0736

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2017

Omslagsbild: Ann-Catrin Hagblom

Delnummer i serie: Examensarbete 2017:79

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <https://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: hyperaldosteronism, kronisk njursvikt, katt, aldosteron, renin, RAAS, hypertension, proteinuri

Keywords: hyperaldosteronism, aldosteronism, chronic kidney disease, cats, aldosterone, renin, RAAS, hypertension, proteinuria

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Den endokrina sjukdomen primär hyperaldosteronism misstänks vara vanligare hos katt än man tidigare trott och misstänks vara en bidragande faktor till kronisk njursvikt bland katter. Sjukdomstecken vid primär hyperaldosteronism liknar dem för kronisk njursjukdom då båda tillstånden kan leda till hypertension, hypokalemi samt progressiv njurskada med proteinuri. Då specifik terapi för primär hyperaldosteronism finns, är det av kliniskt värde att bland njursjuka katter kunna utskilja de som har en primär hyperaldosteronism.

Kronisk njursjukdom är vanligt på katt, men det finns endast ett fåtal studier på hur vanligt primär hyperaldosteronism är hos katt. Ett problem är att det inte funnits en lättillgänglig aldosteronanalys i Sverige. Det här arbetet hade två syften. Först att utvärdera en aldosteron-ELISA analys för diagnostiskt bruk hos katt och hund. Sedan, att undersöka och jämföra aldosteronnivåerna hos katter med kroniskt förhöjda njurvärden med katter med normala njurvärden, samt att undersöka korrelationen mellan aldosteronnivåerna och blodtryck hos katter med förhöjt njurvärde (kreatinin).

Aldosteron-ELISA (DRG Diagnostics, Marburg, Tyskland) utvärderades vid Klinisk kemiska laboratoriet, Sveriges lantbruksuniversitet i Uppsala. Tjugoåtta privatägda katter inkluderades i studien, 14 katter med förhöjda njurvärden och 14 katter med normala njurvärden.

Resultaten från valideringen av analysmetoden visade på linjäritet upp till serumkoncentrationer av aldosteron på cirka 600 pmol/l. Hos hund och katt sågs mellankörningsvariation på i genomsnitt cirka 8%, samt en inomkörningsvariation på 4,4% hos katt respektive 10,4% hos hund. Förhöjda halter av aldosteron (hyperaldosteronism) återfanns hos två (14%) av katterna med förhöjt njurvärde. För att skilja på primär hyperaldosteronism från sekundär, krävs ett mått på plasma renin-koncentrationen. Detta kommer att analyseras men utanför ramen för detta arbete. Serumkoncentrationen av aldosteron hos katterna med förhöjt njurvärde var inte signifikant högre än hos kontrollkatter. Serumkoncentrationer av aldosteron hos hypertensiva katter med förhöjt njurvärde var signifikant högre (median, 331 pmol/l; spridning, 313-332 pmol/l, outliers ej inkluderade) än hos normotensiva katter med förhöjda njurvärden (median, 223 pmol/l; spridning 135-280 pmol/l) ($p=0,03$, Mann-Whitney-U test).

Till författarens kännedom är detta den första studien över förekomst av hyperaldosteronism hos njursjuka katter i Sverige. Även om studiegruppen var liten, så kunde höga serumaldosteronvärden påvisas hos ett antal katter med förhöjda njurvärden. Fler studier kring hyperaldosteronism hos katt vore därför önskvärt för att få ökad kunskap om prevalens, etiologi samt optimal diagnostik för katter med hyperaldosteronism.

SUMMARY

Primary hyperaldosteronism is an endocrine disease that recently is suggested to be more common in cats than previously thought, and is suspected to be a contributing factor to the development of chronic kidney disease (CKD) among cats. The clinical signs in cats with primary hyperaldosteronism are similar to those seen in CKD. Both conditions may lead to hypertension, hypokalemia, progressive kidney damage, and proteinuria. Medical therapy is available for primary hyperaldosteronism. Therefore, the differentiation of cats with primary hyperaldosteronism from cats with chronic kidney disease is of clinical importance.

Chronic kidney disease is common in cats, but there are few studies on the prevalence of primary hyperaldosteronism in cats. One contributing factor in Sweden may have been the lack of an easily available analysis for aldosterone. The first aim of the present study was to evaluate an aldosterone-ELISA for diagnostic purposes in cats and dogs. The second aim was to compare serum aldosterone concentration between cats with chronic azotemia and non-azotemic cats, and to analyse the correlation between serum aldosterone concentration and blood pressure in cats with chronic azotemia.

The aldosteron-ELISA (DRG Diagnostics, Marburg, Germany) were evaluated at the Clinical chemistry laboratory at the Swedish University of Agricultural Sciences in Uppsala. Twenty-eight client-owned cats were included in the study, 14 cats with chronic azotemia and 14 non-azotemic cats. Blood samples were taken at the University Animal Hospital, Swedish University of Agricultural Sciences.

The results of the validation of the aldosterone-ELISA assay showed linearity up to serum concentrations of aldosterone of approximately 600 pmol/l. In dogs and cats, the medium intra-assay coefficient of variation was approximately 8%. The medium inter-assay coefficient of variation was 4.4% in cats and 10.4% in dogs. Elevated serum concentrations of aldosterone (hyperaldosteronism) were found in two (14%) cats with azotemia. To distinguish cats with primary hyperaldosteronism from secondary, measurement of the plasma renin concentration is needed. Plasma renin activity will be determined, but was beyond the scope of the present study. There was no significant difference in serum aldosterone concentration between cats with azotemia and non-azotemic cats. Serum aldosterone concentration in hypertensive cats with chronic azotemia was significantly higher (median, 331 pmol/l; range, 313-332 pmol/l) than in normotensive cats with chronic azotemia (median, 223 pmol/l; range 135-280 pmol/l) ($p=0.03$, Mann-Whitney-U test).

To the author's knowledge, this is the first study on the prevalence of hyperaldosteronism in cats with kidney disease in Sweden. Although the study was small, hyperaldosteronism was demonstrated in a number of cats with azotemia. More studies are needed for improved insight in prevalence and etiology of hyperaldosteronism in cats.

INNEHÅLL

INLEDNING.....	1
LITTERATURÖVERSIKT	2
Aldosteron och RAAS.....	2
Hyperaldosteronism	3
Förekomst.....	5
Sjukdomstecken	6
Diagnostik.....	7
Behandling av PHA	10
MATERIAL OCH METOD.....	12
Djur	12
Aldosteron-ELISA.....	14
Statistisk analys	15
RESULTAT	16
Utvärdering av aldosteron ELISA.....	17
Undersökning av katter med förhöjda njurvärden	20
DISKUSSION	23
REFERENSER	27

FÖRKORTNINGAR

ACE	Angiotensin-converting enzyme
ACTH	Adrenokortikotropt hormon
Ang II	Angiotensin II
ARR	Aldosteron till renin ratio
DNA	Deoxiribonukleinsyra
ELISA	Enzymkopplad immunadsorberande analys
EMT	Epitelial-mesenchymal transition
IL	Interleukin
MR	Mineralkortikoidreceptor
PHA	Primär hyperaldosteronism
RAAS	Renin-angiotensin-aldosteron-system
RIA	Radioimmunoassay
ROS	Reaktiva syreradikaler

FINANSIERING

Examensarbetet har till stor del finansierats via stipendium från Stiftelsen Elsa Paulssons minnesfond.

INLEDNING

Primär hyperaldosteronism (PHA) är en endokrin sjukdom som tidigare har betraktats vara ovanlig hos katt. Sjukdomen har på senare år fått ökad uppmärksamhet och man misstänker att PHA är vanligare hos katt än man tidigare trott och att sjukdomen kan vara en bidragande faktor till utveckling av kronisk njursvikt hos katt (Javadi *et al.*, 2005, Djajadiningrat-Laanen *et al.*, 2011). Förekomst av njursjukdom hos katter är hög. I en nyligen publicerad studie hade cirka 40% av katterna i åldern 0-10 år av njurpåverkan. Hos katter >15 års ålder sågs förekomst av njursvikt hos 80% (Mario *et al.*, 2014). I de flesta fall är den bakomliggande orsaken till kronisk njursvikt hos katt okänd, men katter som har kronisk njursvikt har visat sig ha avvikelser som kan tyda på hyperaldosteronism, till exempel hypokalemi och högre aldosteronnivåer som inte kan förklaras av ökad reninutsöndring. Det är även vanligt att katter med kronisk njursvikt har hypertension och att de svarar dåligt på antihypertensiva läkemedel som riktas mot Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systemet (RAAS) (Jensen *et al.*, 1997, Steel *et al.*, 2002, Williams *et al.*, 2013, Jepson *et al.*, 2014). Inom humansjukvården brukar dessa tecken föranleda att man provtar för hyperaldosteronism. Hos människa är PHA även associerad med proteinuri och progressiva njurskador (Conn *et al.*, 1964, Green *et al.*, 1996). Sambandet mellan förhöjda koncentrationer av aldosteron och tilltagande njurskada har undersökts under de senaste åren. Resultaten visar att förhöjda nivåer av aldosteron och aktivering av mineralkortikoidreceptorerna (MR) ger upphov till cellskada, inflammation, fibrosomvandling och deformation av framför allt njurvävnaden (Brown, 2013).

Att diagnostisera hyperaldosteronism hos en katt i Sverige är i dag svårt, främst på grund av att det idag saknas lättillgängliga validerade analyser för användning på hund och katt. Radioimmunoassay (RIA) har varit en vanlig analysmetod för aldosteron och anses vara gyllene standard. Tidigare använda RIA-analyser som validerats för hund (Cout-a-Count) tillverkas inte längre. En RIA är dock mindre lämpad när få prover ska analyseras på grund av reagensets korta hållbarhet samt då metoden även medför hantering av radioaktivitet. En ELISA har fördelen att reagensplattorna har lång hållbarhet, en mindre mängd prov kan användas och analysen är säker ut arbetsmiljösynpunkt. Då en aldosteronanalys saknades vid Klinisk Kemiska laboratoriet vid Sveriges lantbruksuniversitet var studiens första syfte att utvärdera om en analys av aldosteron för katt och hund kan göras på en redan utvecklad enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) för användning på humant provmaterial (DRG Aldosteron ELISA, EIA-5298).

Tidigare undersökningar har visat hög förekomst av primär hyperaldosteronism (14-40%) hos katter med njursjukdom (Djajadiningrat-Laanen., 2014; Verhoek., 2011). Ett andra syfte med studien var att undersöka om höga aldosteronnivåer kunde påvisas hos katter med kroniskt förhöjda njurvärden i en svensk kattpopulation, samt att göra en korrelationsanalys mellan aldosteron och blodtryck för att undersöka om RAAS eller någon av dess komponenter kan misstänkas vara aktiverat.

LITTERATURÖVERSIKT

Aldosteron och RAAS

Aldosteron är ett mineralokortikoid som bildas från binjurebarkens yttre skikt (zona glomerulosa) och frisätts av två oberoende faktorer; angiotensin II (Ang II) som ingår i RAAS, samt vid hyperkalemi. RAAS reglerar elektrolyt- och extracellulära vätskehomeostasen samt hjälper till att korrigera blodtrycket genom vasokonstriktion. Renin produceras i njuren i specialiserade celler i glomeruli som utgör den så kallade juxtaglomerulära apparaten. Cellerna som utlinjerar afferenta kärl till njuren känner av blodtryck och njurperfusion via baroreceptorer. Vid nedsatt njurperfusion utsöndras renin från njuren. Renin är ett enzym, som i blodet katalyserar omvandling av det cirkulerande angiotensinogen, som produceras i levern, till angiotensin I. Angiotensin I omvandlas i sin tur till Ang II katalyserat av angiotensin-converting enzyme (ACE), som bland annat finns i lungorna. Ang II är en potent vasokonstriktor samt har direkt inverkan på njurtubuli som reabsorberar mer natrium och vatten - en effekt som potentiellas genom att Ang II även stimulerar aldosteronfrisättningen i binjurebarken. Även kaliumkoncentrationen i plasma har en kraftig inverkan på aldosteronutsöndringen. Vid höga nivåer av kalium stimuleras aldosteronfrisättning och på motsvarande sätt hämmas aldosteronfrisättningen vid låga serumkoncentrationer av kalium via negativ feedback. Även adrenokortikotropiskt hormon (ACTH) och plötslig sänkning av natriumkoncentrationen i plasma stimulerar aldosteronfrisättningen från binjurarna, men till en mindre utsträckning.

Aldosteron utövar sin effekt på epitelcellerna i distala njurtubuli, som leder till ökad natriumresorption och kaliumexkretion. Aldosteron binder till MR lokaliserade i epitelcellernas cytoplasma. Aldosteron-MR komplexet binder till deoxiribonukleinsyra (DNA) och stimulerar gentranskription av effektorproteiner som bidrar till ökad natriumabsorption och kaliumsekretion. Aldosteron aktiverar även Na/K-pumpar i andra målorgan, som saliv- och tårkörtlar samt grovtarmen vars celler innehåller MR. Effekten blir att mer natrium och därmed vatten bibehålls i kroppen vilket ger en blodvolymexpansion och höjer blodtrycket. Aldosteron, dess prekursor deoxykortikosteron, samt kortisol (även kortikosteron hos gnagare) har likvärdig affinitet till mineralokortikoidreceptorn men enbart inbundet aldosteron resulterar i en aktivering av receptorn. Hur MR kan förbli inaktiv trots att kortisol förekommer i mångt mycket högre koncentration än aldosteron, är inte helt klarlagt men förklaras oftast med att receptorns coenzym 11 β -hydroxysteroid dehydrogenas typ 2 (11 β -HSD2) inaktiverar kortisol till kortison och på så vis möjliggör inbindning av aldosteron för aktivering (Fuller & Young, 2005).

Man har länge trott att aldosteron enbart haft dessa elektrolyt- och blodtrycksreglerande funktioner via verkan på celler i njurtubuli. Under senaste två decennier har man emellertid förstått att aldosteron har betydligt fler effekter och att MR finns lokaliserat i andra vävnadsceller utöver epitelia tubuliceller, såsom kärl, hjärta, fettvävnad, monocyter samt njurens mesengieceller och podocyter. Flera studier indikerar att aldosteron har profibrotiska och inflammatoriska effekter i framförallt hjärta, blodkärl och njurar (Brown, 2013). Idag misstänker man även att binjurarna inte ensamma står för produktionen av aldosteron då mycket tyder på att lokal produktion av aldosteron i njurarna även kan bidra till njurskador (Brown, 2013; Ritz *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015).

Hyperaldosteronism

Förhöjda halter av aldosteron i blodet (hyperaldosteronism) kan uppstå vid flera tillstånd, exempelvis kraftig RAAS-stimulering, som kan ses vid hjärtsjukdom, nedsatt njurperfusion eller vid minskad leverclearance. Ökade koncentrationer av aldosteron kan även ha sin primära grund från binjurarna. När en hyperaldosteronism är orsakat av en primärt ökad produktion i binjurebarkens *z. glomerulosa* kallas detta för primär hyperaldosteronism (PHA). De fall av PHA som orsakas av binjureadenom på människa kallas även Conn's syndrom. Vid PHA ses en förhöjd halt av aldosteron trots låg plasmakoncentration av renin - det vill säga oberoende av RAAS.

Hyperaldosteronisms inverkan på njurarna

Det har länge varit känt att kronisk RAAS aktivering och hypertension har inverkan på proteinuri samt är en viktig faktor för uppkomst av njurskador. Det finns flera teorier till hur skadorna uppstår i njurarna. Bland annat tror man att den hypertension och vasokonstriktion, som sker till följd av RAAS, ger upphov till ischemiska skador på njurvävnaden. Proteinurin har tillskrivits Ang II där förhöjt glomerulärt tryck anses vara en viktig faktor. Vid undersökningar har även en ökad fibrosomvandling och inflammation i njurarna noterats till följd av RAAS-påslag. En central del i behandlingen vid kronisk njursjukdom har därför inriktats på normalisering av blodtryck och minskning av proteinuri med hjälp av RAAS-hämmande läkemedel som ACE- och Ang II-antagonister.

Aldosteronets funktion inom RAAS har inte uppmärksamats förrän på senare år och tidigare antogs aldosteron ha en underordnad betydelse. På senare år har man omprövat detta och studier visar på att det kan vara direkta effekter av aldosteron och aktivering av MR som leder till proteinuri och progression av njurskada (Long *et al.*, 2004). I detta avseende förefaller även natrium vara en viktig bidragande faktor för aldosteronets skadliga effekter på njurarna (Nagase *et al.*, 2006, Fujita, 2010, 2014).

Proteinuri och fibros

Redan 1964 publicerade Conn *et al.* 145 fallbeskrivningar hos människa som visade att 85% av patienterna drabbade av PHA hade kraftig proteinuri, resultat som även bekräftats i senare studier (Halimi *et al.*, 1995; White *et al.*, 2003; Ribstein *et al.*, 2005). Proteinurin kan delvis förklaras av den hyperfiltration som uppstår i njurarnas glomeruli vid PHA (Kuo *et al.*, 2011) men direkta effekter av förhöjda aldosteronnivåer har även studerats.

Försöksdjur

Podocyterna består av sammanfogade epiteliala celler i glomeruli som utgör en barriär för utfiltrering av proteiner. Hos råttor återfinns MR i njurens podocyter och dessa skadas vid förhöjda koncentrationer av aldosteron och MR-aktivering. En teori är att basalmembranet i glomeruli exponeras när podocyterna, som har dålig förmåga till regenerering, via skador och celdöd går förlorade (Shibata *et al.*, 2007; Shavit *et al.*, 2012). Effekterna har setts uppstå när mitokondrier ökar sin bildning av bland annat reaktiva syreradikaler (ROS) vid aldosteronöverskott, men kan förhindras med en MR-antagonist (Nishiyama *et al.*, 2004; Shibata *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2011). MR-aktivering och ökning av ROS

har utöver podocytens mitokondrier detekterats i hjärta, aorta, proximala tubuli samt i njurens mesangieceller hos råttor (Zhang *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2012; Brown, 2013).

Den fibrosbildning som ses vid förhöjda aldosteronkoncentrationer tros ha flera mekanismer. Proliferation och deformation av mesangieceller samt bildning av epitelial-mesenchymal transition (EMT) i tubuli har setts hos råttor vid aldosteronöverskott (Nishiyama *et al.*, 2005; Terada *et al.*, 2005) vilket har en central roll i uppkomsten av tubulointerstitiell fibros (Yuan *et al.*, 2012) samt associeras med kronisk inflammation (Kalluri & Weinberg, 2009). En lokal uppreglering av kinaser och profibrotiska mediatorer i njuren (Artunc *et al.*, 2006; Ponda *et al.*, 2006; Brown, 2013) har också noterats då ökat uttryck av dessa har detekterats i urin och njurens mesangieceller hos råttor som tillfördes aldosteron (Juknevicus *et al.*, 2004). Även dessa effekter har visat sig minska efter tillförsel av MR-antagonisten spironolakton (Han *et al.*, 2009). Även monocyter/makrofager tros ha en bidragande roll till den inflammation och fibrosomvandling som sker i bland annat njurvävnaden då förhöjt aldosteron har kopplats till ökade lokala halter av interleukin (IL) -6 och IL-1 β (Blasi *et al.*, 2003; Quinkler *et al.*, 2005).

Människa

Aldosteronets njurskadande effekter har bekräftats hos människa. Det har noterats att proximala tubuliceller från människa (in vitro) som utsattes för aldosteron bildade EMT samt förlorade cell-cell bindning (e-cadheriner) till följd av mitokondriell bildning av ROS. Den ökade fibrosbildningen som setts vid höga aldosteronnivåer har lett till vidare undersökning in vitro av hur humana agranulocyter (lymfocyter, monocyter samt makrofager i vävnad), som även har MR, reagerar när de exponeras för höga aldosteronhalter. Det observerades att cellerna utsöndrade ökad mängd av fibrosbildande mediatorer vilket kunde blockeras med MR-antagonister samt med ämnen som förhindrar ROS-bildning (Calò *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2012). Enligt försök kan hyperfiltration och proteinuri reduceras med över 50% med hjälp av en MR-antagonist, medan motsvarande reduktion av proteinuri är cirka 20% med en ACE-hämmare (White *et al.*, 2003; Ribstein *et al.*, 2005). I njurbiopsier från människor med kronisk njursvikt och olika grader av proteinuri konstaterades också att förekomsten av MR är 5 gånger högre hos personer med kraftig proteinuri. Uttrycket av olika fibrosbildande kinaser var 2-4 gånger så hög hos patienter med måttlig till kraftig proteinuri, vävnadskoncentrationen av den inflammatoriska cytokinen Il-6 var nästintill 3 gånger så hög jämfört med patienter som inte hade proteinuri och njurbiopsier från patientgruppen med proteinuri uppvisade en kraftigare infiltration av makrofager. I studien drog man slutsatsen att MR är uppreglerad och att aldosteron och dess receptor med stor sannolikhet är kopplad inflammation-, fibrosbildning och proteinuri – men att den exakta bekomliggande mekanismen behöver undersökas vidare (Quinkler *et al.*, 2005).

Katt

Ingående studier kring aldosteronets verkan hos katt saknas. Histologiska undersökningar av njurar från katter med PHA har emellertid uppvisat liknande förändringar som ses hos människor drabbade av PHA i form av interstitiell fibros och glomerulär skleros (Djajadiningrat-Laanen, 2014).

Förekomst

Människa

Sjukdomen PHA betraktades förr som ovanlig hos människa med en tidigare uppskattad prevalens på under 1% hos människor med primär hypertoni. Idag är den motsvarande estimerade prevalensen cirka 10-20% (Doi *et al.*, 2006, Funder *et al.*, 2008, Weiner, 2013) men siffran kan vara högre. Av underliggande orsaker till PHA hos människa orsakas cirka två tredjedelar av idiopatisk bilateral binjurebarkshyperplasi, en tredjedel av unilaterala binjureadenom och en mindre andel av unilateral binjurebarkshyperplasi. Ärftliga former av PHA förekommer hos människa: familjär hyperaldosteronism typ I, typ II och typ III, men dessa är ovanliga (Schirpenbach & Reincke, 2007; Young, 2007; Weiner, 2013). Binjureadenom orsakade av genetiska mutationer har nyligen också identifierats (Stowasser, 2015). Hos människor över 50 år kan det vara vanligare med adenom än idiopatisk binjurebarkshyperplasi enligt en studie (Kuo *et al.*, 2015).

Katt

Prevalensen av PHA hos katt är inte studerad i större omfattning. De katter med PHA som hittills beskrivits har varit medelålders till äldre katter och uppvisat varierande tecken på sjukdom. Ingen ras- eller könspre disposition för PHA har setts. Majoriteten av diagnostiserade katter varit dock varit kastrerade (August, 2010; Djajadiningrat-Laanen *et al.*, 2011). I en studie av 13 katter med PHA var medianåldern vid diagnos 10 år, med ett intervall från 6-13 år (Ash *et al.* 2005).

Det finns endast ett fåtal studier om hypertension, proteinuri och påverkan av RAAS hos katt. Av de studier som genomförts har det noterats att katter som har hypertension, med eller utan känd njursjukdom, ofta har hypokalemi samt låga renin till aldosteronnivåer (Jensen *et al.*, 1997; Syme *et al.*, 2002; Sansom *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2013; Jepson *et al.*, 2014). Detta, tillsammans med resultat som tyder på att hypertension hos katt är svårbehandlad med ACE-hämmande läkemedel, indikerar att det kan finnas en renin-angiotensin-oberoende regleringsmekanism (Jensen *et al.*, 1997; Steel *et al.*, 2002).

Att hypokalemi kan förekomma hos katter med njursjukdom är välkänt medan det är ovanligt hos hund. Teorier till varför katter utvecklar hypokalemi, till skillnad från hundar, är flera men ingen har kommit med enhällig förklaring (Ettinger & Feldman, 2010). Lägre serumkoncentration av kalium och hypokalemi hos katt har, utöver kronisk njursvikt, setts i samband med hypertensiv retinopati (Sansom *et al.*, 2004) och hypertension (Syme *et al.*, 2002).

I en nyligen publicerade studie som refererar till 33 fall av konstaterad PHA hos katt hade 88% (29/33) neoplasi i binjurebarken. Av dessa hade 15 unilaterala carcinom, en katt hade bilaterala carcinom med samtidigt adenom, 11 katter hade unilaterala adenom och två katter bilaterala adenom. I kontrast till motsvarande sjukdom hos människa återfanns idiopatisk binjurebarkshyperplasi enbart hos fyra av katterna (Djajadiningrat-Laanen, 2014).

Förekomst av misstänkt PHA hos katter med kronisk njurinsufficiens har undersökts på senare år med hjälp av analys av aldosteronkoncentrationen i serum, plasma-renin aktivitet

och kvoten av dessa (ARR) (Javadi *et al.*, 2005; Verhoek, 2011; Djajadiningrat-Laanen, 2014). Javadi *et al.* (2005) undersökte 11 katter med misstänkt PHA. Åtta av katterna hade förhöjt kreatinin vid studiens start och ytterligare två katter utvecklade under studiens gång njursvikt med uremi. Djajadiningrat-Laanen (2014) undersökte ARR hos 51 katter med känd njursjukdom. Misstänkt förekomst av PHA hittades hos 14% (7/51) av undersökta katter och ytterligare 10% (5/51) misstänktes ha sekundär hyperaldosteronism. I ett studentarbete undersöktes ARR hos katter med kronisk njursjukdom, under handledning av Djajadiningrat-Laanen, och drygt 40% (6/14) av katterna misstänktes ha PHA (Verhoek, 2011). Dessa resultat visar att PHA kan vara betydligt vanligare än vad man tidigare trott hos katt och skulle kunna vara en bidragande faktor till utvecklandet av njursjukdom.

Sjukdomstecken

Människa

Sjukdomstecken vid PHA hos människa är ofta ospecifika då sjukdomen främst orsakar måttlig till kraftig hypertension som kan vara svårbehandlad. Sjukdomen påvisas framförallt hos medelålders till äldre personer. De ärftliga varianterna drabbar även yngre personer men dessa former anses mycket ovanliga. Utöver hypertension är fysiska tecken på sjukdom ofta frånvarande men hypertensiv kris förekommer. Personer med PHA orsakad av adenom kan ha kraftigare hypertension än personer med hyperplasiorsakad PHA (Young, 2007; Funder *et al.*, 2008).

Hypokalemi förekommer i enbart 9-37% av de diagnostiserade fallen av PHA och ses framförallt i långt framskridna fall eller i kombination med diuretiska läkemedel (Young, 2007; Funder *et al.*, 2008). Personer med adenomvandlade binjurar har enligt fallbeskrivningar lägre plasmakoncentrationer av kalium och renin samt högre koncentrationer av aldosteron än personer med hyperplasiomvandlade binjurar (Wu *et al.*, 2008). Vid uttalad hypokalemi kan sjukdomstecken som bland annat muskeltrötthet, ökad törst och urinering samt huvudvärk förekomma (Young, 2007).

Hypertensionrelaterade komplikationer till följd av PHA är betydligt vanligare än för individer drabbade av annan form av hypertension. De skadliga effekterna vid PHA ses framförallt i form av kardiovaskulära skador såsom förstoring av vänster kammarvägg, ökad risk för myokardiella infarkter, stroke och arteriell stelhet. Andra kända komplikationer är skador på njurarna och albuminuri (Young, 2007). Enligt en studie var proteinurin och njurarnas funktionsnedsättning partiellt reversibla efter att en PHA behandlats (Sechi *et al.*, 2006) men troligen beror detta på sjukdomens duration då det finns fallbeskrivningar där den glomerulära filtrationshastigheten sjunkit efter att PHA behandlats via adenalektomi. Njurbiopsier från dessa individer uppvisade kronisk interstitiell fibros, hyalin glomeruliskleros samt tubulär atrofi - skador som delvis förklaras av långvarig hypertension som obehandlad även maskerar njursjukdomen (Park *et al.*, 2016). PHA har även kopplats till metabola syndrom såsom fetma och insulinresistens (typ II diabetes) (Brown, 2013).

Katt

De katter med PHA som hittills beskrivits har uppvisat varierande tecken på sjukdom. Det vanligaste akuta sjukdomstecknet som rapporterats hos katt är muskelsvaghet. Ofta härrör svagheten från den hypokalemi som kan uppstå och ge kliniska yttringar som oförmåga att höja nacken, ataxi och stelhet i benen. Dessa tecken blir oftast inte tydliga förrän serumkoncentrationen av kalium är lägre än 2,5 mmol/l men tecken på svaghet även kan ses vid kaliumkoncentrationer över 2,5 mmol/l. Akut blindhet till följd av näthinneavlossning och intraokulär blödning är heller inte ovanligt och tros vara en konsekvens av långvarig hypertension. Katter med PHA kan även uppvisa mer smygande tecken på sjukdom som generell muskelatrofi, viktförlust, hypertension, diarré och myokardiell hypertrofi. Hypertension är vanligt, vilket kan leda till västerkammarhypertrofi och hos vissa katter noteras blåsljud. Gränsen för hypertension är inte ordentligt fastställd hos katt och många gånger har man troligen tolkat förhöjda blodtryck som normala. I en studie föreslås att ett systoliskt blodtryck på >140 mmHg och ett diastoliskt tryck >95 mmHg ska betraktas som hypertension hos katt (Mishinia *et al.*, 1998). Uppmätt systoliskt medianblodtryck hos katter med PHA var i en studie 164 mmHg med en variation mellan 124-238 mmHg (Djajadiningrat-laanen, 2014) vilket talar för att hypertension är vanligt vid PHA hos katt men ses inte tydligt hos alla katter.

En del katter med PHA uppvisar dehydrering, polyuri/polydipsi samt polyfagi eller dysfagi. Man vet idag inte säkert varför dessa sjukdomsytringar uppstår men det kan bero på andra samtida sjukdomar som hyperkortisolism, hypertyreos eller som följd av hypokalemi (August, 2010; Schulman, 2010; Djajadiningrat-Laanen *et al.*, 2011). Katter med binjuretumörer kan förutom aldosteron även utsöndra kortisol och/eller könssteroider (hyperprogesteronism). Sjukdomstecken som då kan tillkomma, utöver tecken på PHA, är bukighet, dålig håråterväxt, alopeci, matt och mjällig päls samt tunn och skör hud där blodkärlen tydligt framträder under huden (Briscoe *et al.*, 2009; August, 2010).

Förändringar som setts vid biokemiska analyser är måttlig till kraftig hypokalemi där även kreatinkinasa kan vara förhöjd till följd av hypokalemisk polymyopati. I likhet med PHA hos människa är det inte alltid hypokalemi ses hos katter. Hos de katter som undersökts med PHA har man inte kunnat se någon signifikant skillnad i kaliumnivåerna mellan katter med PHA, sekundär hyperaldosteronism eller njursjukdom (Verhoek, 2011, Djajadiningrat-Laanen, 2014). Även blodkoncentrationen av natrium kan i ovanligare fall vara förhöjda på grund av den natriumretention som uppstår vid hyperaldosteronism. I likhet med hos människor med PHA, ses förhöjda serumkoncentration av kreatinin och urea hos katter och värdena förefaller stiga gradvis över tid. Hos katter med PHA och samtidig njursjukdom är serumkoncentrationen av fosfat ibland låg trots långt framskriden njursjukdom (Javadi *et al.*, 2005).

Diagnostik

För att särskilja primärt orsakad hyperaldosteronism från sekundär analyseras plasma-renin, ofta i form av renins enzymatiska aktivitet, som förväntas vara låg hos individer med PHA och hög hos de med sekundär hyperaldosteronism. Kvoten mellan aldosteron och renin, ARR, är därför högre hos patienter med PHA än de med sekundär hyperaldosteronism.

Människa

Diagnostik av PHA kan vara besvärlig och flera olika metoder används för att konfirmera diagnosen hos människa. Kontroll av ARR används som en första screening för PHA hos alla patienter med svårbehandlad hypertension, familjär hypertension/PHA eller om patienten drabbats av idiopatisk- eller iatrogen hypokalemi efter behandling med diuretiska läkemedel. Att ensamt mäta aldosteron eller renin anses inte vara en bra metod eftersom 60% av patienterna med konstaterad PHA har en aldosteronkoncentration inom referensintervallet (Doi *et al.*, 2006). Hos människa läggs även vikt på om patienten står eller ligger ner vid provtagning då halten aldosteron ökar i stående position, en konsekvens av att filtrationstrycket i njurarna minskas då blod omfördelas till benen vilket ger ökad utsöndring av renin och därmed aldosteron, men även minskat clearance av aldosteron när leverfiltrationen sjunker i stående position. Olika former av PHA hos människa kan ge olika effekter på aldosteron beroende på kroppsläge (stående eller liggande). Vanligast är att patienten får sitta upp i 5-15 minuter innan blodinsamling, som oftast sker på morgonen då aldosteronkoncentrationen kan variera under dygnet samt öka efter måltider (Stowasser *et al.*, 2010). Patienter med osäkra eller positiva ARR måste därefter genomgå konfirmerande tester för att säkerställa diagnosen PHA. För att konfirmera diagnosen PHA används ett hämningstest, där man tillför ett ämne (salt, mineralkortikoiden fludrokortison, ACE-hämmaren kaptopril eller angiotensin II receptorantagonisten losartan), som hos den friska individen orsakar en kraftig sänkning av aldosteronkoncentrationen, men inte hos patienter med PHA (Funder *et al.*, 2008; Kuo *et al.*, 2015). De olika konfirmerande testerna anses vara likvärdiga och har alla för och nackdelar. Saltbelastningen samt fludrokortison-hämningstestet medför en ökad risk för hypertension och vätskeretention och är därför sällan förstahandsval hos patienter som är äldre eller har av njur-, lever- eller hjärtsvikt alternativt redan är drabbad av kraftig hypertension (Kuo *et al.*, 2015). Captopril (ACE-antagonist)- och Losartan (Ang II-antagonist)-hämningstesten är snabba att genomföra och har likvärdig effektivitet, falskt positiva resultat har dock rapporterats (Funder *et al.*, 2008; Kuo *et al.*, 2015).

När PHA är bekräftad utökas undersökningarna för att fastställa vilken form av PHA patienten är drabbad av, som hos människa betraktas förekomma i sex olika former. Rekommendation är att en datortomografi utförs för att undersöka om patienten har en idiopatisk binjurehyperplasi eller tumöromvandling. Mikroadenom och idiopatisk hyperplasi av binjurebarken kan vara svåra att särskilja vid en datatomografisk undersökning och ett venöst prov från båda binjuror kan då avslöja om de förhöjda aldosteronnivåerna kommer från en eller båda binjuror (Mattsson *et al.*, 2006; Funder *et al.*, 2008).

Analys av aldosteron hos människa görs vanligtvis med hjälp av analysmetoder som radioimmunoassay (RIA). På senare tid har man även börjat använda masspektrometri då denna metod, oberoende av antikroppsanvändning och radioaktivitet, direkt påvisar aldosteronmolekylen (Funder., 2008).

Katt

Hos katt anses ARR vara golden standard för diagnostik. Någon dygnsvariation av aldosteronutsöndring har inte kunnat ses hos katt likt vad som ses hos människa. Skillnaden tros bero på att kattens aktivitet och födobeteende inte är dygnsberoende (Yu *et al.*, 1998). Det har konstaterats att referensintervallet för aldosteron hos katt är mycket lika människors blodkoncentration i liggande position. Detta gällde oavsett vilken position eller stressnivå katten befann sig i vid provinsamling (Yu *et al.*, 1998; Javadi *et al.*, 2004).

I de första rapporterna om hyperaldosteronism hos katt var de påvisade serumkoncentrationerna av aldosteron mycket höga (Yu & Morris 1998), framförallt hos de katter som hade adenomomvandlade binjuror (Feldman *et al.*, 2015). I dessa tidiga fall var sjukdomen troligtvis är långt framskriden. I senare studier, där man aktivt letat efter PHA hos katt, har aldosteronkoncentrationen i blodet i flera fall initialt legat inom referensintervallet (Djajadiningrat-Laanen, 2014), men ökat efterhand (Javadi *et al.*, 2005). I en studie hade katterna vid diagnos av PHA en median aldosteronkoncentration på 330 pmol/l med en spridning på 170-890 pmol/l (referensintervall 110-540 pmol/l), medan reninutsöndringen var mycket lågt och i flera fall omätbart hos dess katter (Djajadiningrat-Laanen, 2014). Det här kan innebära att diagnos uteblir alternativt undgår tidig upptäckt om endast aldosteronkoncentrationen analyseras.

Då ytterligare konfirmerande tester ännu inte har validerats på katt kontrolleras ofta binjurorna med hjälp av ultraljud, datortomografi eller magnetresonanskamera vid positiv ARR. Djajadiningrat-Laanen (2014) påpekar dock problematiken i att en detekterbar hyperplasi eller neoplasi i binjurorna vid bilddiagnostisk undersökning inte alltid speglar tecken på sjukdom eftersom enbart hypertrofi/neoplasi av z. glomerulosa orsakar PHA. Äldre katter kan även få en hyperplasi av binjurorna utan tecken på sjukdom och ett mikroadenom går inte alltid att detektera vid datortomografi/magnetresonanskamera. Konfirmerande tester likt de som utförs på människa har efterfrågats. Konfirmerande tester har börjat undersökas och försök med fludrokortison-hämningstest har gjorts hos katt med varierande resultat (Djajadiningrat-Laanen *et al.*, 2008, 2013; Matsuda *et al.*, 2015).

Aldosteronanalys hos katt och hund

Antalet laboratorier som erbjuder validerade aldosteronanalyser för katt och hund är få. De analyser som utvärderats för hund och katt har framförallt använts sig av RIA-metodik. I en studie där 130 friska katter ingick validerades en RIA som visade en inomkörningsvariation på 6% och mellankörningsvariation på 14%. Referensintervallet hos katt bestämdes till 110-540 pmol/l (Javadi *et al.*, 2004). Hos hund förefaller aldosteronkoncentrationen vara något lägre. En RIA-metod (Coat-a-count, Diagnostic Products Corporation) som utvärderats för användning på hund visade en inomkörningsvariation på 4,7% samt en mellankörningsvariation på 11% (Sieber-Ruckstuhl *et al.*, 2006). En uppföljande studie baserat på samma RIA-metod visade ett referensintervall mellan 15-576 pmol/l hos friska hundar (Baumstark *et al.*, 2014).

En nackdel med RIA är att metoden medför hantering av radioaktivitet och att tillhörande reagenser har kort hållbarhet till skillnad från en ELISA. Om prover ska extraheras kräver

detta även en större mängd provmaterial. Någon utvärdering av en ELISA-metod för analys av aldosteron i katt- och hundserum finns inte publicerat. Däremot finns flera tillverkare av ELISA-kit för analys av aldosteron hos människa.

Svårigheter vid tolkning av ARR

Största utmaningen vid mätning av ARR är den känsliga analysen av renin där all hantering och förvaring av plasma fram till analys måste ske kylt. Antalet laboratorier som mäter renin hos katt är få och transport samt analys är mycket kostsam. Många förlitar sig ofta därför på aldosteronkoncentrationerna samt s-kalium för att ställa trolig diagnos på PHA (Schulman, 2010). Upprepad mätning av ARR kan även krävas för säkrare diagnos då ARR kan bli falskt lågt och maskera en PHA vid exempelvis dehydrering eller hypokalemi (Djajadiningrat-Laanen *et al.*, 2011). Andra fallgror för feltolkning är samtidig medicinering med läkemedel som påverkar aldosteron- och reninkoncentrationen framförallt i form av blodtryckssänkande läkemedel (Stowasser *et al.*, 2010; Javadi *et al.*, 2005). Samtidig behandling med läkemedel som påverkar aldosteron och renin bör därför tas i beaktning vid mätning av ARR.

Behandling av PHA

Människa

PHA kan behandlas kirurgiskt via adrenalektomi eller medicinskt med MR-blockerande läkemedel som spironolakton och eplerenon. Den medicinska behandlingen är inte botande men utgör en symtomatisk behandling för att minska hypertension och kaliumförlusterna när en operation inte är aktuell. Läkemedelsbehandling med spironolakton har använts länge hos människor med PHA och kan som monoterapi sänka blodtrycket med omkring 20% vid en dosering på 50-400 mg per dag (Funder *et al.*, 2008). En lägre dosering på 25-50 mg/dag som monoterapi har även visat sig kunna sänka blodtrycket till godtagbara nivåer hos cirka 50% av patienterna (Lim *et al.*, 1999). MR-antagonister kan orsaka hyperkalemi hos patienter med nedsatt njurfunktion och läkemedlen ska därför användas med försiktighet hos patienter med kronisk njursvikt i sena stadier där njurfunktionen är måttligt till kraftigt nedsatt. Vissa menar emellertid att rädslan för hyperkalemi är överdriven och att MR-antagonister har en värdefull roll vid behandling även vid kronisk njurinsufficiens. Det har föreslagits att även små doser av MR-antagonister har god effekt på proteinuri (Shavit *et al.*, 2012). Vid behandling av PHA har man sett att glomerulära filtrationshastigheten (GFR) initialt sjunker och höjningar i kreatinin och urea kan ses (Fourkionis *et al.*, 2013).

Katt

Hos katt används liknande behandlingsstrategier som hos människa. Den kirurgiska behandlingen i form av adrenalektomi är mest utvärderad jämfört med den medicinska behandlingen. Komplikationsrisken vid adrenalektomi har visat sig vara relativt hög i en studie då 40% (4/10) av katterna som genomgick adrenalektomi avlivades till följd av komplikationer i form av blödningar och sepsis (Ash *et al.*, 2005). I en nyligen publicerad studie där katter genomgått adrenalektomi rapporteras emellertid en lägre komplikationsrisk på 20% samt mycket goda behandlingsresultat hos katterna. De katter som klarade operationen utan komplikationer återfick normalt blodtryck och kalium inom referensintervallet och katterna behövde ingen ytterligare medicinering för sin PHA. Median

överlevnadstid var 1297 dagar och ingen av katterna dog till följd av tumören i binjurarna. Hos 70% (7/10) av katterna hittades vaskulär invasion. Man såg ingen skillnad i överlevnad beroende på om binjuretumören var höger- eller vänstersidig och inte heller beroende på om katten hade adenom eller carcinom. Enda faktorn som var signifikant för överlevnadsperioden var antalet timmar under anestesi. En operation som pågick över fyra timmar var kopplad till kort överlevnad (10 dagar) medan katter som genomgick en operation på under fyra timmar hade median överlevnad på 1329 dagar (Lo *et al.*, 2014).

Behandling med spironolakton har inte studerats i större omfattning hos katt. I en pågående studie för att utvärdera säkerheten av spironolakton hos katter med hjärtsvikt används samma godkända dosering som till hund (2 mg/kg q8h) (James *et al.*, 2013). I studier på katter med PHA uppges rekommenderad dos spironolakton vara mellan 2-4 mg/kg per oralt q12h (Djajadiningrat-Laanen *et al.*, 2011). Hos katter som medicinerats i ovanstående dosintervall innan adrenalektomi sågs en förbättring av hypokalemin hos samtliga katter men ingen katt blev normokalemisk. Av de hypertensiva katterna fick 73% (8/11) normalt blodtryck, vissa av katterna behandlades emellertid även med amlodipin (Ash *et al.*, 2005). Tecken på sänkt GFR liknande vad som ses hos människor vid behandling med spironolakton ses även hos katt (Javadi *et al.*, 2005; Ash *et al.*, 2005). Den medicinska behandlingen av PHA hos katt kan troligen behöva utvärderas ytterligare för att förbättra behandlingsresultaten då få studier är utförda. Troligen kan dosen sänkas då man på människa sett godtagbara resultat i form av blodtryckssänkning även vid låga doser spironolakton i monoterapi vid PHA (Lim *et al.*, 1999).

Då det finns behandlingsmöjligheter för katter med PHA, förutsatt att sjukdomen diagnosticeras i tid, är ökad kunskap kring sjukdomen önskvärt. Sjukdomen är i dagsläget till stora delar ett outforskat område och sannolikt finns goda möjligheter att förbättra båda diagnostik och behandling. Som första steg syftar studien till att utvärdera om en validerad analysmetod kan göras tillgänglig för mätning av serumaldosteron hos katt och hund i Sverige, samt med hjälp av denna undersöka om hyperaldosteronism kan påvisas hos katter med förhöjda njurvärden även i den svenska kattpopulationen.

MATERIAL OCH METOD

Djur

För validering av analys

För utvärderingen av aldosteron-ELISA användes sparad serum från hundar och katter som besökt Universitetsdjursjukhusets smådjursklinik (UDS) vid Sveriges Lantbruksuniversitet med varierande sjukdomstillstånd. En egen standard för varje djurslag tillverkades av serum från cirka 25 slumpvis valda katter respektive hundar av varierande ålder och ras med okänd sjukdomsstatus. Ett prov från standarden inkluderades i varje analysomgång som kontroll. Sparat serum med stor provvolym från ytterligare 15 katter och 15 hundar från den kliniska verksamheten vid UDS användes för att validera aldosteronanalysen (koncentration, linjäritet, inom- och mellankörningsvariation). Sjukdomsstatus, ålder och ras kontrollerades inte hos hundarna. Katternas serumkreatinin kontrollerades, 14/15 katter uppvisade normala njurvärden och inkluderades som kontrollgrupp för studiepopulationen.

Studiepopulation

Studiepopulationen (Tabell 1) bestod av privatägda katter med konstaterat förhöjda njurvärden vid två olika veterinärkliniker i Uppsala, UDS samt Uppsala Veterinärmottagning (UVM). Inklusionskriteriet var ett serum-kreatinin överstigande referensintervallet. Katter inkluderades i studien om förhöjt kreatininvärde hade konstaterats vid minst två tillfällen under flera månader, eller om det visat sig vara förhöjt vid ett tillfälle med klinisk misstanke om kronisk njursvikt, utan misstanke på laboratoriefel eller tecken på prerenal (till exempel dehydrering, överdriven muskelmassa) eller postrenala orsaker (urineringsbesvär). Totalt fjorton katter med förhöjda njurvärden inkluderades i studien. Hos majoriteten av katterna (11/14 katter) var kreatinin förhöjt över referensintervallet vid minst 2 (2 till >6) tillfällen över flera månader/års tid. Hos tre katter var kreatinin kontrollerat vid ett tillfälle, men då katterna var pigga och alerta vid provtagning, inte var dehydrerade, överdrivet muskulösa eller hade urineringsproblem betraktades kreatininökningen ha en renal orsak.

Referensintervallet för kreatininanalysen vid Klinisk kemiska laboratoriet, Sveriges lantbruksuniversitet i Uppsala var 70-160 mmol/l och vid UVM 71-212 mmol/l. En katt med förhöjt kreatininvärde på 155 mmol/l (övre referensintervall hos remitterande kliniken var 145 mmol/l) remitterades från annan klinik till UDS. En katt exkluderades om den var långt gången i sin njursvikt och uppvisade lågt body condition score index eller låg kroppsvikt med hänsyn till blodmängden som behövdes för studien. Av samma orsak exkluderades katter som hade anemi. Undantag från oavstående gjordes för katter där redan sparad serum användes för aldosteronanalys (N10-N14). Hos de inkluderade katterna registrerades ålder (Tabell 7), vikt, sjukdomstecken, medicinering, senast journalförda kreatininvärde och serum kaliumkoncentrationen i de fall de kontrollerats vid samma tillfälle som prov togs för aldosteronanalys. Kontrollgruppen bestod av sparad serum från 14 katter med normal serumkoncentration av kreatinin.

Tabell 1. *Inkluderade katter för mätning av serumaldosteronkoncentrationen*

Katter i studiepopulationen
▶ N1-N9: Katter med förhöjda njurvärden, provtagna vid Universitetsdjursjukhuset, Uppsala.
▶ N10-N14: Sparat serum från katter med förhöjda njurvärden
▶ Kontrollgrupp: 14 serumprover inkomna till Klinisk kemiska laboratoriet, Uppsala, från katter med normala njurvärden

Provinsamling

Samtliga katter som inkluderats i studien för senare mätning av ARR (N1-N9) undersöktes och provtogs vid UDS. Katternas identitet kontrollerades via avläsning av chip/örontatuering. Blodtryck togs, en enklare ögonundersökning samt blodprovstagning genomförde. Från varje katt samlades 1-7 ml blod för aldosteron, elektrolytanalys samt analys av plasma reninaktivitet. Renin, ARR, Na och K analyserna omfattas inte av denna studie, utan rapporteras i annan form.

Vid provinsamlingen användes blå permanentkanyl, två förkylda 2ml EDTA-rör samt ett 4ml serumrör. Blodinsamling skedde via en permanentkanyl i vena cephalica i höger eller vänster framben. Serum fick stå i minst 15 minuter innan centrifugering (Hettrich zentrifugen EBA 20) i 5 minuter, 4500 RPM. EDTA-rören centrifugerades i en kylcentrifug (4-5°C, Hettrich zentrifugen Rotina 380R) i 15 minuter, 1000 RPM. Serum/plasma pipetterades av till 2-4 kryorör och placerades därefter i en frys (-20 °C).

Serum från katt N10-N14 fanns redan tillgängligt i form av sparat serum och inget ny blodinsamling gjordes hos dessa katter.

Undersökning

Samtliga katter i studien ingående för senare mätning av ARR undersöktes med en allmän klinisk undersökning av författaren. Allmänstatus och undersökning på katt N10-N14 baseras på journalanteckningar från provtagningstillfället på UDS.

En enklare ögonundersökning med fokalt ljus utfördes av författaren med syfte att kontrollera förekomst av tydliga tecken på retinopati (tapetal hyperreflektivitet, blödning eller näthinneavlossning) hos katt N1-N9.

Blodtrycksmätning

För blodtrycksmätningen används en icke-invasiv oscillometrisk metod i form av en High Definition Oscillometry Unit (HDO) från DVM Solutions. Blodtrycksmanchetten placerades på kattens svans och djurägarna fick instruktioner om hur blodtrycksmätningen går till. De lämnades själva i rummet med dämpad belysning för att minska eventuell stress hos katten. Blodtrycket mättes när katten låg på mage i sin transportbur alternativt på en filt på bordet. Djurägarna utförde ett flertal mätningar i 15-20 minuter och genomsnittligt blodtryck beräknades baserat på minst 6 uppmätta värden. Övre gränsen för hypertension bestämdes till ett systoliskt tryck på ≥ 150 mmHg.

Etiskt godkännande

Etiskt tillstånd för blodprovstagning fanns från Uppsala djurförsöksetiska nämnd (diarienummer: C12/15). Djurägaren fick fylla i och signera en djurmedgivandeblankett vid undersökningstillfället. Djurägaren hade på förhand informerats om hur undersökning och provtagning skulle gå till.

Aldosteron-ELISA

Utvärdering av aldosteron-ELISA utfördes vid Klinisk kemiska laboratoriet, Sveriges lantbruksuniversitet i Uppsala.

För aldosteronanalysen användes en aldosteron-ELISA med Lot.nr. EIA-5298 från DRG diagnostics, Marburg, Tyskland. Det angivna mätområdet för analysen var från 15,8 pmol/l till 2770 pmol/l. Angiven medel inomkörnings CV vid olika medelkoncentrationer (angivet inom parentes) var 9,7% (312 pmol/l), 7,4% (771 pmol/l) samt 3,9% (1954 pmol/l). Angiven medel mellankörnings CV vid olika medelkoncentrationer (angivet inom parentes) var 9,9% (371 pmol/l), 8,6% (1156 pmol/l) samt 9,4% (2408 pmol/l). ELISA-kittet innehöll mikrotiterbrunnar med anti-aldosteron IgG, standardlösningar med kända koncentrationer av aldosteron (0, 55, 222, 554, 1385, respektive 2770 pmol/l) samt medföljande kontroller (låg och hög). Kittet innehöll även enzymkonjugat, substratlösning, stopplösning och tvättlösning. Övrig utrustning som användes var mikroplattvätt (BioTek ELx50), plattläsare (BioTek ELx800 med ett Gen5 2,06 inprogrammerat) samt en skakinkubator (Grant-bio PMS 1000i).

Förutom medföljande fabrikatlösningar (standardlösningar, hög- och låg kontroll) tillverkades en egen standard från sparad hund och kattserum som kunde användas som katt- och hundkontroller vid respektive analysomgång (Tabell 2). För vardera djurslaget poolades serum och fördelades på 20 kryorör innehållande 200 µl vardera. Av tillfällighet blev koncentrationen serumaldosteron hög hos kattkontrollen respektive låg hos hundkontrollen. 15 sparade serumprover med stor provvolym från katt respektive hund valdes ut för att användas i valideringsprocessen (inom- och mellankörnings CV samt linjäritet). För spädningsserierna användes standardlösning 0 för spädning enligt instruktion från tillverkaren. Samtliga analyser genomfördes med rumstempererade reagenser och serumprover. Standardlösningarna blandades genom att tillsätta 1,0 ml destillerat vatten till frysttorkat standardinnehåll och fick stå i minst 10 minuter. Den koncentrerade tvättbufferten (30 ml) späddes med destillerat vatten (1170 ml) till en total volym av 1200 ml. Samtliga prover, inklusive standardlösningar, serumprover, kontroller (låg/hög och katt/hund) samt serum för spädningsserier analyserades i dubbelprov med en provvolym på 50 µl. Till vardera reagensbrunn tillsattes 150 µl enzymkonjugat, följt av blandning och inkubering i 60 minuter i rumstemperatur. Plattan tvättades 5 gånger med 400 µl tvättlösning i plattvädden. Tvåhundra µl substratlösning tillsattes varje brunn och inkuberades i 30 minuter i rumstemperatur. Därefter tillsattes 100 µl stopplösning följt av avläsning inom 10 minuter i en spektrofotometer/plattläsare.

En standardkurva räknades ut med hjälp av kittets medföljande standardlösningar i kända koncentrationer. Plan för respektive ELISA-körning gjordes innan analys (Tabell 3).

Analysens linjäritet undersöktes med en rad seriespädningar (10–20%-steg) på hund- och kattserum (Figur 1, 2, 3, 4). Kontrollerna (hög/låg/katt/hund) analyserades i duplikat i fem olika analysomgångar och variationskoefficienten (CV) beräknades för att kontrollera den procentuella standardavvikelsen från medelvärdet (Tabell 5). Repeterbarheten undersöktes i mellan- och inomkörningar (Tabell 6). Alla analyser utfördes vid Klinisk kemiska laboratorier, UDS av en erfaren Biomedicinsk analytiker.

Statistisk analys

Fördelning av data inom respektive grupp undersöktes med hjälp av Kolmogorov-Smirnov test. Parametrar, som inte var normalfördelade redovisas som median med spridning. Jämförelser mellan grupper med icke-normalfördelat data utfördes med hjälp av Wilcoxon rangsummetest för oberoende grupper (Mann-Whitney-U test), ett icke parametrisk test för beräkning av icke normalfördelade variabler och små stickprov. Signifikansnivån sattes till 0,05. Korrelationsanalys mellan blodtryck och uppmätt aldosteronkoncentration hos de katter med förhöjda njurvärden beräknades med Pearsons korrelation och visualiserades i graf. Av statistiska skäl har katter med serumaldosteron koncentration >600 pmol/l inte tagits med i korrelationsanalysen, då dessa aldosteronnivåer inte är exakta.

Tabell 2. Använda substrat i valideringsprocessen av aldosteron-ELISA

I valideringsprocessen analyserades:
▶ Standardlösning i kända koncentrationer (medföljande ELISA-analysen)
▶ Låg- och hög kontroll (medföljande ELISA-analysen)
▶ Egentillverkad katt- respektive hundkontroll från poolat katt- och hundserum
▶ 15 serumprover från katt (för inom- och mellankörning samt spädningsserie)
▶ 15 serumprover från hund (för inom- och mellankörningsanalys samt spädningsserie)

Tabell 3. *Plan för de olika analysomgångarna för utvärderingen av aldosteron-ELISA*

Utöver standardkurva och kontroller (hög/låg/katt/hund) analyserades följande:

Analys 1

Serumprov från 15 katter
Serumprov från 15 hundar

Analys 2

Inomkörning CV (ett serumprov från respektive djurslag)
Mellankörning CV (två serumprover från respektive djurslag)
Spädningsserie 20%-steg (ett hundserum)
Spädningsserie 20%-steg (ett kattserum)

Analys 3

Inomkörning CV (två serumprover från hund samt ett serumprov från katt)
Mellankörning CV (ett serumprov från respektive djurslag)
Spädningsserie 20%-steg (ett hundserum)
Spädningsserie 20%-steg (ett kattserum)

Analys 4

Mellankörning CV (ett serumprov från respektive djurslag)
13 katter med förhöjda njurvärden
5 hundar med njursjukdom
3 hundar med binjurebarksinsufficiens

Analys 5

Mellankörning CV (ett serumprov från respektive djurslag)
Spädningsserie 10%-steg (ett hundserum)
Spädningsserie 10%-steg (ett kattserum)
1 katt med förhöjt njurvärde

RESULTAT

Utvärdering av aldosteron ELISA

Standardkurva

Uppmätta koncentrationer av aldosteron stämde bra överens med riktvärdena (Tabell 4). CV-värdet var i de flesta spädningar låga men ökade vid de lägre koncentrationerna. Medel CV var 21% (median, 13,1%; spridning, 8,3-53,3%) för koncentrationen 55 pmol/l. Vid näst lägsta koncentrationen (222 pmol/l) kunde ett CV-värde >10% noteras vid ett analystillfälle (16,3%).

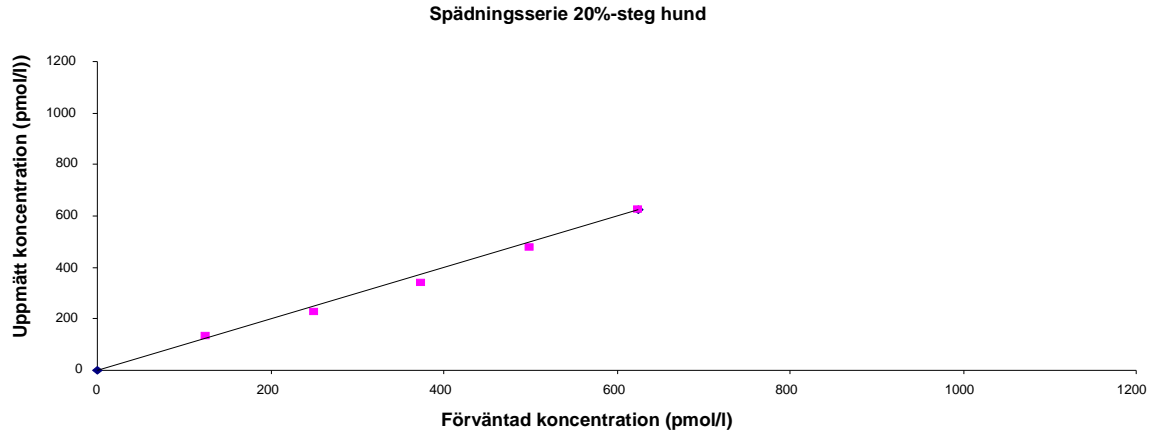
Linjäritet och precision

Tre hund- och kattprover med olika aldosteronkoncentration spädades i 10 eller 20% steg. Analysen var linjär mellan cirka 55 pmol/l upp till cirka 600 pmol/l i prover från katt och hund. För förväntade värden över 600 pmol/l, hos både hund och kattserum, blev de uppmätta värdena inte tillförlitliga då kurvan upphörde att vara linjär (Figur 2, 3).

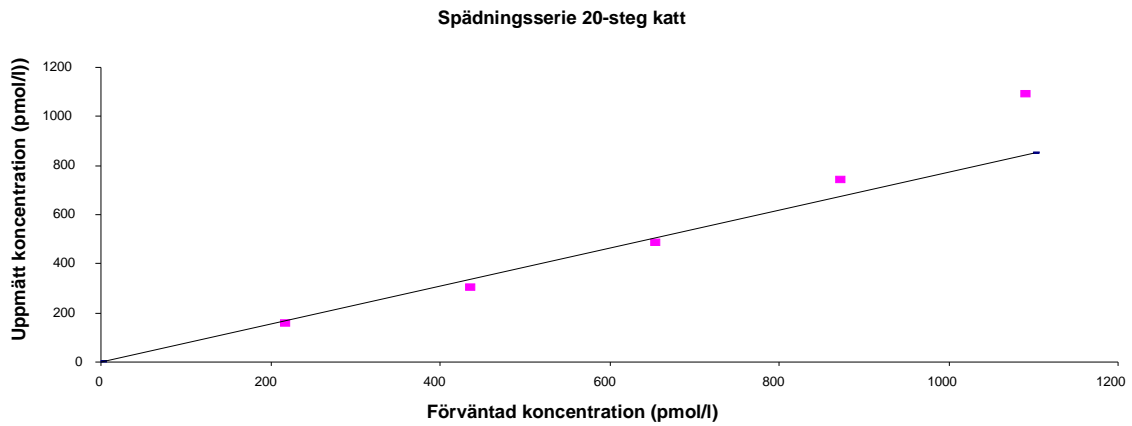
Den genomsnittliga mellankörningsvariationen vid analys av kattserum var 6,3% (median, 4,7%; spridning, 0,7-22,9%) och i hundserum medel 9,4% (median, 6,3%; spridning, 0,2-11,4%) (Tabell 6). För katt och hundproverna var den genomsnittliga inomkörningsvariationen för katt 4,4%, (median, 4,4%; spridning, 0,8-8,2%) respektive hund 10,4% (median, 9,7%; spridning, 1,3-26%) (Tabell 6). Den genomsnittliga mellankörningsvariation på egen kattkontroll var 12,2% (median, 5,8%; spridning, 0-7,0%) (Tabell 5). Genomsnittlig mellankörningsvariation på egen hundkontroll var 7,9% (median, 2,3%; spridning, 0-30,5%) (Tabell 5). Genomsnittlig mellankörningsvariation på medföljande höga/låga kontrollen var 6,4% (median, 1,2%; spridning, 0-10,1%) (Tabell 5). Genomsnittlig mellankörningsvariation på medföljande höga kontrollen var 9,0% (median, 1,4%; spridning, 0,3-6,0%) (Tabell 5).

Tabell 4. Resultat av uppmätta aldosteronkoncentrationer (ELISA, Lot.nr. EIA-5298, DRG diagnostics, Marburg, Tyskland) för medföljande standardlösningar med känd aldosteronkoncentrationer i fem analysomgångar

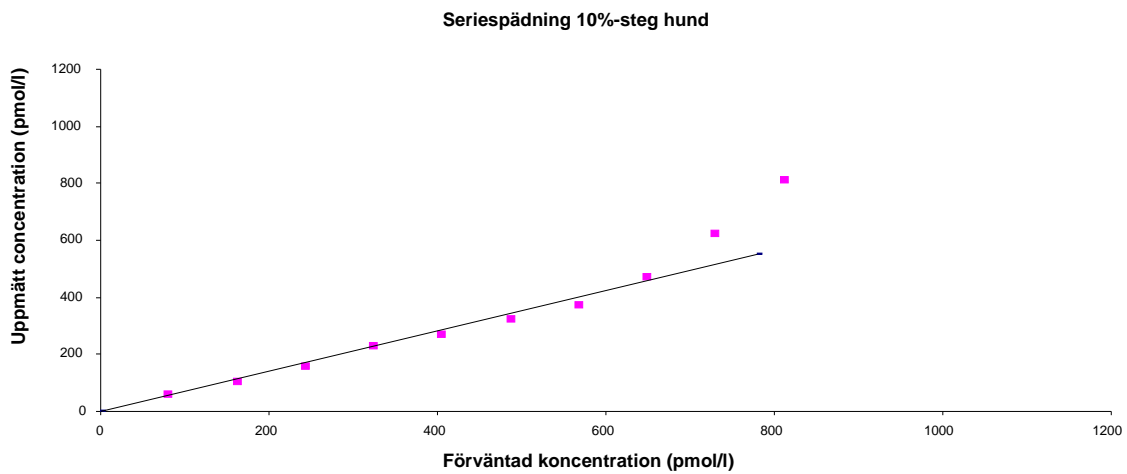
Riktvärde (pmol/l)	Uppmätt koncentration (pmol/l)	CV%
	Median (spridning)	Median (spridning)
0	2 (0 - 14)	141 (141 - 141)
55	52 (29 - 65)	13,1 (8,3 - 53,3)
222	226 (203 - 256)	2,5 (0,4 - 16,3)
554	560 (527 - 616)	4,4 (0,3 - 10,9)
1385	1322 (1250 - 1401)	2,4 (0 - 8,1)
2770	2870 (2712 - 2909)	2 (0,9 - 4,9)



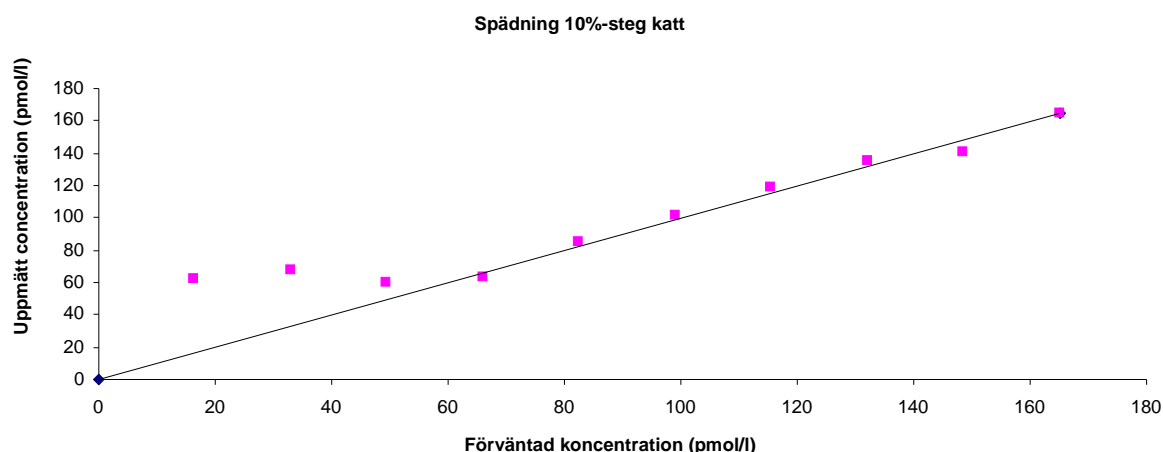
Figur 1. Seriespädning (20%-steg) av hundserum med medelhög aldostersonkoncentration (cirka 600 pmol/l) analyserat med ELISA, Lot.nr EIA-5298, DRG diagnostics, Marburg, Tyskland.



Figur 2. Seriespädning (20%-steg) av kattserum med hög aldostersonkoncentration (cirka 1100 pmol/l) ELISA, Lot.nr EIA-5298, DRG diagnostics, Marburg, Tyskland.



Figur 3. Seriespädning (10%-steg) av hundserum med hög aldostersonkoncentration (cirka 800 pmol/l) ELISA, Lot.nr EIA-5298, DRG diagnostics, Marburg, Tyskland.



Figur 4. Seriespädning (10%-steg) av kattserum med låg aldosteronkoncentration (cirka 165 pmol/l) ELISA, Lot.nr EIA-5298, DRG diagnostics, Marburg, Tyskland.

Tabell 5. Mellankörningsvariation i 5 analysomgångar av medföljande höga- och låga kontroller, samt egentillverkade kontroller från katt- och hundserum för utvärdering av aldosteron-ELISA analysen

	Medelkoncentration (pmol/l)	Mellankörningsvariation		
		Medel CV	Median CV	Intervall CV
Kittets låga kontroll	148	3,7%	1,0%	0 – 10,1%
Kittets höga kontroll	1564	9,0%	1,4%	0,3 – 6,0%
Egen kontroll katt	1059	12,2%	5,8%	0 – 7,0%
Egen kontroll hund	87	7,9%	2,3%	0 – 30,5%

Tabell 6. Inom- och mellankörningsvariation vid analys av katt- och hundserum analyserat med ELISA, Lot.nr EIA-5298, DRG diagnostics, Marburg, Tyskland

	Medelkoncentration (pmol/l)	Inomkörningsvariation		
		Medel CV	Median CV	Intervall CV
Katt 1	795	3,4%	3,3%	0,8 – 5,8%
Katt 2	131	5,4%	5,9%	1,3 – 8,2%
Hund 1	139	8,9%	9,7%	1,3 – 14,5%
Hund 2	1367	11,7%	10,1%	2,8 – 26%
		Mellankörningsvariation		
	Medelkoncentration (pmol/l)	Medel CV	Median CV	Intervall CV
Katt	441	6,3%	4,7%	0,7 - 22,9%
Hund	176	9,4%	6,3%	0,2 - 11,4%

Undersökning av katter med förhöjda njurvärden

Totalt 14 katter med förhöjda njurvärden inkluderades i studien, varav 12 huskatter och 2 st birmor (N1 och N4). Medianålder var 9,5 år (intervall 4-19 år) (Tabell 7). Majoriteten av katterna (12/14) åt njurdietfoder framförallt i form av Royal Canin renal eller Hill's k/d. Katt N3 och N5 åt inte njurdietfoder.

Två katter stod under behandling med läkemedel vid undersökningen: en katt (N6) behandlades för redan konstaterad hypertension med en Ang II-antagonist telmisartan (Semintra; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Ingelheim/Rhein, Tyskland) i dosen 1,3 mg/kg q24h. En katt (N10) med samtidig astma, hypertyreos och hypokalemi behandlades med tiamizol (Felimazole vet; Dechra Limited, North Yorkshire, Storbritannien) 1,25 mg / 2,5 mg q12h, metylprednisolon (Medrol, Pfizer AB, Sollentuna, Sverige) 2 mg q24h, Amlodipin (Norvasc, Pfizer AB, Sollentuna; Sverige) 0,625 mg q12h, telamisartan (Semintra; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Ingelheim/Rhein, Tyskland) 1 mg/kg q24h, gabapentin (Ex Tempore, APL) 5 mg q24h, flutikasonpropionat (Flutid, GlaxoSmithKline AB, Solna, Sverige) 125 mcg 2 pumpsdrag q12h samt kaliumtillskott (RenalK, Vetoquinol, Quebec, Kanada) 2 skopmått q8h. En katt (N9) hade tidigare jodbehandlats mot hypertyreos och var i remission.

Varken N1 eller N10 inkluderades i de statistiska analyserna med hänsyn till att ingen spädning av serum genomfördes för att bestämma verklig aldosteronkoncentration samt då katt N10 medicinerades med många läkemedel, bland annat antihypertensiva läkemedel.

En katt (N6) hade enligt djurägaren polydipsi och var muskelatrofisk över höft och bakben. Den katt (N9) som jodbehandlats för hypertyreos hade svarat bra på behandlingen avseende T4 som vid senaste mätning uppvisade 23 nmol/l (referensintervall 14-45 nmol/l), men inte gått upp i vikt de kilo som katten enligt djurägaren tappat innan diagnos. Matt och dålig skött päls noterades hos tre katter (N2, N6 och N9). Tre katter (N1, N2, N9) hade synlig katarakt och N2 upplevdes ha tapetal hyperreflektivitet. För en av katterna (N1) uppgav djurägaren att njursjukdom förekom hos ett flertal av närbesläktade katter.

Blodtryck mättes på 10 av de 14 katter som inkluderades i studien. Median systoliskt blodtryck var 148 mmHg (spridning, 132-188 mmHg) hos samtliga katter. Fem katter (N2, N4, N6, N7 och N10) hade ett systoliskt blodtryck ≥ 150 mmHg (Tabell 8) med median systoliskt blodtryck på 165 mmHg (spridning, 150-188 mmHg) och klassas i studien som

Tabell 7. Ålder och ras hos katter med förhöjda njurvärden som inkluderades för mätning av aldosteronkoncentrationen i serum

Katt	Ålder (År)	Ras
N1	10	Birma
N2	14	Huskatt
N3	7,5	Huskatt
N4	9	Birma
N5	4	Huskatt
N6	13	Huskatt
N7	9	Huskatt
N8	6	Huskatt
N9	Okänt >14	Huskatt
N10	18	Huskatt
N11	7	Huskatt
N12	4	Huskatt
N13	18	Huskatt
N14	19	Huskatt

hypertensiva. Median systoliskt blodtryck på de katter som klassades som normotensiva var 142 mmHg (spridning, 132-146 mmHg).

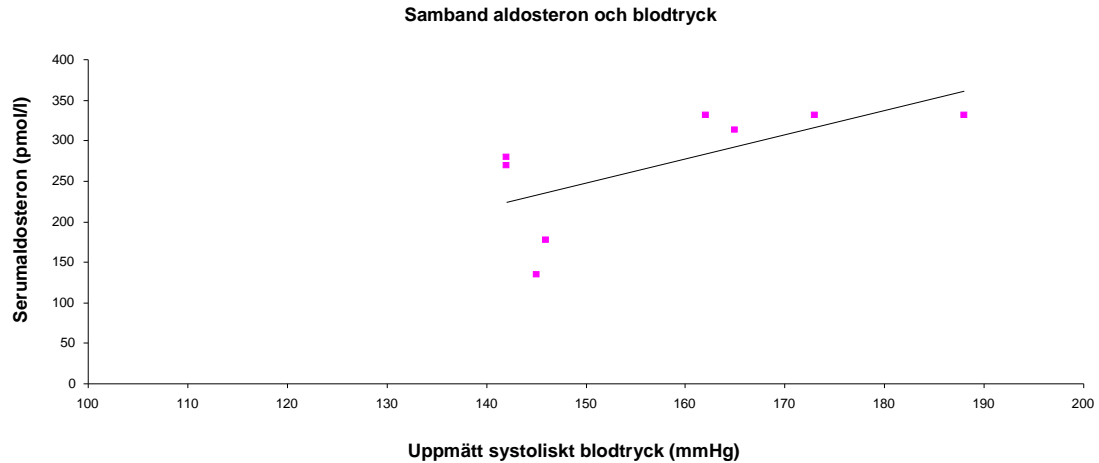
Median serumkoncentration av kalium var 4,5 mmol/l (spridning, 3,2-5,1 mmol/l) baserat på mätningar hos 8/14 katter i studien. Median serumaldosteronkoncentration hos kontrollkatterna var 230 pmol/l (spridning, 92-436 pmol/l). Median serumaldosteronkoncentration hos katter med förhöjda njurvärden var 322 pmol/l (spridning, 106 till >600 pmol/l).

Någon signifikant skillnad kunde inte ses i aldosteronkoncentration mellan katter med förhöjda njurvärden och katter i kontrollgruppen ($p=0,14$, Mann-Whitney-U test). Hos katter med förhöjda njurvärden sågs en signifikant skillnad i aldosteronkoncentration mellan hypertensiva och normotensiva katter ($p=0,03$, Mann-Whitney-U test), där hypertensiva katter med förhöjda njurvärden hade högre uppmätta aldosteronkoncentrationer (Tabell 9). Pearsons korrelationskoefficient av uppmätta aldosteronkoncentrationer och systoliskt blodtryck hos katter med förhöjda njurvärden var 0,7, ($p=0,07$) (Figur 5).

Tabell 8. Uppmätt blodtryck, serum- kreatinin (Krea), kalium (K) och aldosteron (Aldo) samt ögonundersökning (ögon us) hos katter med förhöjda njurvärden (katt) och kontrollkatter (kontroll). Kreatinin referensvärden: \blacklozenge = 70-160 mmol/l; * övre referensvärde 141 mmol/l; Utan symbol = 71-212 mmol/l

Katt	Sys	Dia	MAP	Ögon us	Aldo medel (pmol/l)	Krea (mmol/l)	K (mmol/l)	Kontroll	Aldo medel (pmol/l)
N1	132	72	92	K	>600 (1903)	245	4,0	K1	330
N2	188	84	119	HypR+K	332	301	3,2	K2	92
N3	142	87	105	UA	269	220		K3	237
N4	165	89	114	UA	313	281		K4	305
N5	146	63	91	UA	177	155 *		K5	353
N6	173	83	113	UA	331	286		K6	409
N7	162	80	107	UA	331	161 \blacklozenge	4,7	K7	308
N8	142	72	95	UA	280	168 \blacklozenge	4,6	K8	166
N9	145	81	102	K	135	323 \blacklozenge		K9	436
N10	150	90	110		>600 (1406)	189 \blacklozenge	3,2	K10	123
N11					106	170 \blacklozenge	4,8	K11	223
N12					405	254 \blacklozenge	4,4	K12	128
N13					271	180 \blacklozenge		K13	174
N14					498	225 \blacklozenge	5,1	K14	165

Sys = systoliskt blodtryck; Dia= diastolisk blodtryck; MAP= medelartärblodtryck; Ögon us= Ögonundersökning; K=katarakt; HypR= tapetal hyperreflektivitet; UA= utan anmärkning



Figur 5. Uppmätt serumkoncentration av aldosteron och systoliskt blodtryck hos åtta katter med förhöjda njurvärden och serumaldosteronkoncentration mellan 135-332 pmol/l. Pearsons korrelationskoefficient: 0,67 ($p=0,07$). Katter med serumaldosteronkoncentration >600 pmol/l är ej inkluderade i analysen på grund av osäkerhet i mätvärdet.

Tabell 9. Uppmätta aldosteronkoncentrationer i serum hos 10 katter med förhöjda njurvärden, med och utan hypertension. Katter med serumaldosteronkoncentration >600 pmol/l exkluderades i den statistiska analysen. Signifikant högre aldosteronkoncentrationer sågs hos hypertensiva katter jämfört med normotensiva katter med förhöjda njurvärden (Mann-Whitney-U test, $p=0,03$.) Katt N10 åt två blodtryckssänkande läkemedel

Hypertensiva katter			Normotensiva katter		
	<u>Sys</u>	<u>Aldo</u>		<u>Sys</u>	<u>Aldo</u>
N2	188	332	N3	142	269
N4	165	313	N5	146	177
N6	173	331	N8	142	280
N7	162	331	N9	145	135
N10	150	>600	N1	132	>600

Aldo = uppmätt serumkoncentration av aldosteron (pmol/l); Sys = uppmätt systoliskt blodtryck (mmHg)

DISKUSSION

I denna studie utvärderades en aldosteron-ELISA för analys på hund och kattserum, med goda valideringsresultat. Analysen var linjär upp till serumkoncentration på cirka 600 pmol/l, vilket överskreds av endast två katter med förhöjda njurvärden och en hund. Inomkörningsvariationen var 4,4% för katt respektive 10,4% för hund. Mellankörningsvariationen för katt var 6,3% respektive 9,4% för hund. Någon signifikant skillnad i aldosteronkoncentration kunde inte ses mellan katter med och utan förhöjda njurvärden, men hos katter med förhöjda njurvärden var serumaldosteronkoncentrationen signifikant högre hos hypertensiva jämfört med normotensiva katter.

Den utvärderade aldosteron-ELISA visade sig kunna användas för analys av serumaldosteron i hund och kattserum i koncentrationsintervaller upp till cirka 600 pmol/l. Avvikelser i form av CV-värden över 10% noterades vid lägsta standardpunkten (55 pmol/l) och vid ett tillfälle även vid näst lägsta standardpunkten (222 pmol/l) i standarskurvan – i sistnämnda fall handlade det om ett CV värden på <20% och kan möjligen ha orsakats av kontaminering mellan brunnar eller mänsklig faktor (pipettering).

Den uppmätta precision som erhöles i denna studie på katt- och hundserum (Tabell 6) har god överensstämmelse med tillverkarens produktbeskrivning, som anger ett inomkörnings CV för olika serumaldosteronkoncentration (inom parantes) i prov från människa på 9,7% (236 pmol/l), 7,4% (583 pmol/l) samt 3,9% (1474 pmol/l) och en mellankörningsvariation på 9,9% (280 pmol/l), 8,6% (873 pmol/l), samt 9,4% (1819 pmol/l). Precisionen var även snarlik den som angivits för validerade analysmetoder (RIA) för katt och hund. En för katt utvärderad RIA-metod uppger medel inom- och mellankörningsvariation på 6% respektive 14% i kattserum (Javadi *et al.*, 2004) – vilket är likvärdigt med de resultat som aldosteron-ELISA uppvisade (Tabell 6). I hundserum sågs något högre inomkörningsvariation (10,4%) jämfört med en för hund utvärderad RIA-metod där inom- och mellankörningsvariation uppgått till 4,7% respektive 11% (Sieber-Ruckstuhl *et al.*, 2006). Det här kan troligen förklaras av att ett hundserum (hund 2) som analyserades för inomkörningsvariation hade mycket hög serumaldosteronkoncentration (medelkoncentration 1367 pmol/l) och ett analystillfälle (analys 3) där förhöjda CV-värden påvisades lokalt på mikroplattan. Vid samma tillfälle ökade även ett CV-värde för hundkontrollen (CV>30%) och detta beror sannolikt på en lokal kontamination mellan mikrobrunnar. I övrigt sågs ingen större skillnad i mellankörningsvariation mellan kittets medföljande kontrollösningar (hög/låg kontroll) och de egna kontrollstandarderna (hund/katt).

Analysen var linjär mellan koncentrationen 55-600 pmol/l hos katt och hund, vilket är lägre koncentrationer än vad som förväntades från produktbeskrivningen. Uppmätta koncentrationer över 600 pmol/l kan sannolikt hanteras genom spädning enligt instruktion från tillverkaren, men är något som måste kontrolleras framöver då det inte gjordes inom ramen av denna studie.

Aldosteron analyserades även från tre hundar med känd hypoadrenokortisism (addisons sjukdom). Analysresultaten uppvisade förväntade låga serumkoncentrationer av aldosteron (resultaten ej visade), vilket minskar risken att den utvärderade testen korsreagerar med annat

ämne än det förväntade. Referensintervallen för aldosteron hos hund och katt är inte fastställd för ELISA-analysen och är något som får undersökas framöver. Koncentrationsintervallet av aldosteron hos studiens kontrollkatter var 92-436 pmol/l, vilket är jämförbart med referensintervallet på 110–540 pmol/l för plasmaaldosteron hos katt med en RIA-analys (Javadi *et al.*, 2004).

Förhöjda serumkoncentrationer av aldosteron sågs endast hos katter med förhöjda njurvärden i den här studien, med undantag för en katt som hade kraftig leversvikt med ikterus samt hos en katt som precis genomgått en operation (redovisas inte bland resultaten). Dessa fall skulle kunna förklaras av nedsatt leverclearance respektive RAAS aktivering till följd av hypotension. Resterande serumprover som analyserade under studiens gång från katter med varierande sjukdomstillstånd uppvisade till synes normala aldosteronkoncentrationer. Baserat på denna observation är det viktigt att man väger in katten kliniska status när man tolkar provsvar.

Trots att studiegruppen var liten så kunde hyperaldosteronism påvisas hos 14% (2/14) av katterna med förhöjda njurvärden, samt misstänkas hos ytterligare en katt (N2). Detta på grund av att katten hade relativt hög aldosteronkoncentration (332 pmol/l) trots samtidig hypokalemi, vilket borde ha resulterat i en minskad aldosteronsekretion, samt hypertension som svarade dåligt på telmisartanbehandling (systoliskt blodtryck minskade med 8,5% medan diastoliskt blodtryck ökade med 6%). Hos en av dessa katter (N10) återfanns senare en unilateral binjuretumör vid ett ultraljud vilket talar för en primärt orsakad hyperaldosteronism. Reninaktiviteten måste analyseras för att bekräfta misstanke samt för att särskilja mellan en primär- och sekundär hyperaldosteronism. En onormal aldosteronkoncentration i förhållande till renin kan inte uteslutas hos övriga njursjuka katter som medverkat i studien. Hos människa vet man att omkring 60% av patienterna med PHA har en normal aldosteronkoncentration men undertryckt reningutsöndring och liknande tendenser har setts i studier av katter med misstänkt PHA (Djajadingraat-Laanen, 2014).

Någon signifikant skillnad i aldosteronkoncentration kunde inte ses mellan katter med och utan förhöjda njurvärden i den här studien – men katter med höga njurvärden och hypertension hade signifikant högre aldosteronkoncentrationer än de som var normotensiva. Ett positivt, linjärt samband sågs mellan serumkoncentrationen av aldosteron och blodtryck hos katter med höga njurvärden, men det var inte statistiskt signifikant.

Katter med uppmätt systoliskt blodtryck på ≥ 150 mmHg räknades i studien som hypertensiva. Gränsen för hypertension är inte ordentligt fastställd hos katt och studier pekat mot en allt för generöst gränsdragning för hypertension hos katt. Författarens egna iakttagelse av blodtrycksmätning i lugn hem- eller klinikmiljö talar för att de flesta katter utan misstanke om hypertension har ett systoliskt blodtryck < 145 mmHg. Dessa observationer stämmer överens med den föreslagna gräns där ett systoliskt blodtryck > 140 mmHg respektive diastoliskt blodtryck > 95 mmHg ska betraktas som hypertension hos katt (Mishina *et al.*, 1998). Med hänsyn till detta fastslogs gränsen för hypertension något lägre än ofta gällande 160 mmHg. En av katterna (N1) vars serumaldosteron uppmättes till > 600 pmol/l var normotensiv (systoliskt blodtryck, 132 mmHg). Orsaken till detta är oklar men kan handla om mätfel

alternativt så har katten ännu inte utvecklat hypertension. Normotensiva katter med hyperaldosteronism har även noterats i tidigare studier (Djajadiningrat-laanen, 2014).

Samtidig medicinering skulle kunna påverka uppmätta aldosteronkoncentrationer. I denna studie medicinerades två katter (N6 och N10) med blodtryckssänkande läkemedel som kan minska renin-stimulerad aldosteronfrisättningen. Optimalt bör läkemedelsbehandling som påverkar renin- och/eller aldosteronfrisättningen avbrytas innan provtagning. Trots medicinering med telmisartan och amlodipin sågs förhöjda aldosteronkoncentrationer hos katt N10. Möjliga orsaker till detta kan vara inadekvat medicinering, aldosteron- escape/breakthrough eller mera troligt, i detta fall, PHA då en binjuretumör senare även sågs hos katten vid ultraljud. Det är oklart om telmisartan är verksamt för att sänka blodtrycket hos katt. Enligt The Merck Veterinary manual är rekommenderad dos 1 mg/kg q24h vid behandling av hypertension hos katt och enligt en studie har en signifikant sänkning av det systoliska blodtrycket setts hos katter vid tillförsel av telmisartan i dosen 0,5-3 mg/kg (Jenkins *et al.*, 2016). I studien medicinerades två hypertensiva katter (N2 och N6) med telmisartan i dosen 1,3 mg/kg q24h. Ingen signifikant skillnad i systoliskt blodtryck kunde ses hos katterna ($p=0,07$) före och efter behandling med telmisartan (resultaten ej visade) och båda katter förblev hypertensiva. Iakttagelsen överensstämmer med tidigare studier som visat att hypertensiva katter svarar dåligt på RAAS-hämmande läkemedel (ACE-antagonister) (Jensen *et al.*, 1997, Steel *et al.*, 2002) och kan tala för en renin-angiotensin oberoende mekanism.

Telmisartan kan fortfarande vara intressant att använda som ett aldosteronhämningstest hos katt, som ett alternativ till det fludrokortison-hämningstest som föreslagits (Djajadiningrat-Laanen *et al.*, 2008, 2013), som teoretiskt innebär en risk att förvärpa effekterna av hyperaldosteronism. Ang II-antagonister används som konfirmernade test hos människa, där friska individer svarar med en kraftig sänkning av aldosteronnivåerna, medan hämningseffekten är sämre hos patienter med PHA. Telmisartans effekt på aldosteronutsöndringen hos katter måste emellertid studeras närmare innan någon konklusion kan dras.

Till den föreliggande studiens svaghet hör en liten gruppstorlek och ett brett inklusionskriterium för katter med förhöjda njurvärden. Trots detta kunde höga aldosteronvärden påvisas hos 2 av katterna, varav en hade påvisad binjuretumör, vilket tyder på att förekomst av hyperaldosteronism är värt att studera vidare i en större population katter. Kompletterande undersökningar, så som aktuell serumkreatinin, ultraljudsundersökning av buk (binjurstorlek), hjärta (förekomst av vänsterkammarhypertrofi) och urinanalyser (protein/kreatinin-kvot, sediment, odling) skulle då vara intressanta. Dessa undersökningar var inte möjliga att genomföra inom ramen för denna studie av ekonomiska och tidsmässiga skäl.

Det finns behov av en större inventering kring förekomsten av PHA hos katter. Särskilt intressanta grupper av katter där PHA skulle kunna misstänkas i högre utsträckning är katter med kronisk njurinsufficiens, hypokalemi och sannolikt även vänsterkammarhypertrofi. Sjukdomen är intressant och idag finns stora kunskapsluckor kring hyperaldosteronism hos katt beträffande förekomst, diagnostik och behandling, men även om dess betydelse för bland annat njurskador.

Tack till

Jag vill först och främst rikta ett enormt stort tack till min handledare Jeanette Hanson (kliniska vetenskaper, SLU) som visat stort stöd och engagemang under hela arbetet gång. Tack för att du alltid har ställt upp (på flera olika sätt) och bidragit med både kunskap och intressanta diskussioner!

Jag vill även rikta ett stort tack till Inger Lilliehöök (Klinisk kemi, SLU) som hjälpt mig med utvärderingen av aldosteron-ELISA samt lotsat rätsida på alla mina frågor och funderingar. Tack även till Rosemarie Klausson (Klinisk kemi, SLU) som har skött all praktisk hantering av analysen.

Tack riktas också till Stiftelsen Elsa Paulssons minnesfond som bidragit med ett generöst stipendium för utförandet av examensarbetet.

Sist men inte minst vill jag tacka alla djurägare och katter som medverkat och möjliggjort studien.

REFERENSER

- Artunc, F., Amann, K., Nasir, Q., Friedrich, B., Sandulache, D., Jahovic, N., Risler, T., Vallon, V., Wulff, P., Kuhl, D., Lang, F. (2006). Blunted DOCA/high salt induced albuminuria and renal tubulointerstitial damage in gene-targeted mice lacking SGK1. *Journal of human hypertension*, 26(8):502-506.
- Ash, R.A., Harvey, A.M., Tasker, S. (2005). Primary Hyperaldosteronism in the cat: a series of 13 cases. *Journal of feline medicine and surgery*, 7(3):173-182.
- August JR., (2010). *Consultations in feline internal medicine*. St Louis, Saunders Elsevier
- Baumstark, M.E., Sieber-Ruckstuhl, N.S., Muller, C., Wenger, M., Boretti, F.S., Reusch, C.E. (2014). Evaluation of aldosterone concentrations in dogs with hypoadrenocorticism. *Journal of veterinary internal medicine*, 28(1):154-159.
- Bianchi, S., Batini, V., Bigazzi, R. (2015). The renal effects of mineralocorticoid receptor antagonists. *International Journal of Cardiology*, 200, 1:20-24
- Bianchi, S., Bigazzi, R. & Campese, V.M. (2006). Long-term effects of spironolactone on proteinuria and kidney function in patients with chronic kidney disease. *Kidney international*, 70: 2116–2123
- Blasi, E.R., Rocha, R., Rudolph, A.E., Blomme, E.A., Polly, M.L., McMahon, E.G. (2003). Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney International*, 63:1791–1800.
- Briscoe, K., Barrs, V.R., Foster, D.F., Beatty, J.A. (2009). Hyperaldosteronism and hyperprogesteronism in a cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11(9): 758-762.
- Brown N.J. (2013). Contribution of aldosterone to cardiovascular and renal inflammation and fibrosis. *Nature review nephrology* 9(8): 459-469.
- Calò, L.A., Zaghetto, F., Pagnin, E., Davis, P.A., De Mozzi, P., Sartorato, P., Martire, G., Fiore, C., Armanini, D. (2004). Effect of aldosterone and glycyrrhetic acid on the protein expression of PAI-1 and p22(phox) in human mononuclear leukocytes. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 89(4):1973-1976.
- Conn, J.W, Knopf, R.F., Nesbit, R.M. (1964). Clinical characteristics of primary aldosteronism from an analysis of 145 cases. *The American Journal of Surgery*, 107:159-172.
- Djajadiningrat-Laanen, S.C. (2014). *Primary Hyperaldosteronism: Expanding the diagnostic net*. Diss. Utrecht University.
- Djajadiningrat-Laanen, S.C., Galac, S., Cammelbeeck, S.E., van Laar, K.J., Boer, P., Kooistra, H.S. (2008). Urinary aldosterone to creatinine ratio in cats before and after suppression with salt or fludrocortisone acetate. *Journal of veterinary internal medicine*. 22(6):1283-8
- Djajadiningrat-Laanen, S.C., Galac, Boevé, M.H., Boroffka, S.A., Naan, E.C., IJzer, J., Kooistra, H.S. (2013). Evaluation of the oral fludrocortisone suppression test for diagnosing primary hyperaldosteronism in cats. *Journal of veterinary internal medicine*, 27(6):1493-9
- Djajadiningrat-Laanen, S.C., Galac, S., Kooistra, H. (2011). Primary hyperaldosteronism Expanding the diagnostic net. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 13: 641-650.

- Doi, S.A.R., Abalkhail, S., Al-Qudhaiby, M.M., Al-Humood, K., Hafez, M.F., Al-Shoumer, K.A.S. (2006). Optimal use and interpretation of the aldosterone renin ratio to detect aldosterone excess in hypertension. *Journal of Human Hypertension*, 20:482–489.
- DRG instruments GmbH/DRG diagnostics GmbH (2014-04). DRG Aldosterone ELISA (EIA-5298). http://www.drg-diagnostics.de/files/eia-5298_ifu--aldosterone_2014-04-03_ende.pdf (15-10-10).
- Ettinger, S.J. & Feldman, E.C. (2010). Textbook of Veterinary Internal Medicine. 7. ed. St. Louis, Missouri: Saunders.
- Feldman, E.C., Nelson, F.W., Reusch, C., Scott-Moncrieff, J.C. (2015). Canine and feline endocrinology, 4 ed. St Louis, Missouri: Saunders.
- Fourkiotis V, Vonend O, Diederich S, Fischer E, Lang K, Endres S, Beuschlein F, Willenberg HS, Rump LC, Allolio B, Reincke M, Quinkler M. (2013). Effectiveness of eplerenone or spironolactone treatment in preserving renal function in primary aldosteronism. *European journal of endocrinology*, 168(1):75-81.
- Fujita, T. (2010). Mineralocorticoid Receptors, Salt-Sensitive Hypertension, and Metabolic Syndrome. *Hypertension*, 55:813-818
- Fujita, T. (2014) Mechanism of Salt-Sensitive Hypertension: Focus on Adrenal and Sympathetic Nervous Systems. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(6): 1148–1155.
- Fuller, P.J & Young, M.J. (2005). Mechanisms of the mineralocorticoid action. *Hypertension*, 46: 1227-1235.
- Funder, J.W., Carey, R.M., Fardella, C., Gomez-Sanchez, C.E., Mantero, F., Stowasser, M., Young, W.F., Montori, V.M. (2008). Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: An endocrine society clinical practice guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(9):3266-3281.
- Greene, E.L., Kren, S., Hostetter, T.H. (1996). Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *Journal of Clinical Investigation*, 98(4): 1063-1068.
- Halimi, J.M., Mimran, A., Hypertens, J. (1995). Albuminuria in untreated patients with primary aldosteronism or essential hypertension. *Journal of hypertension*, 1801-1302.
- Han, J.S., Choi, B.S., Yang, C.W., Kim, Y.S. (2009). Aldosterone-induced TGF- β 1 expression is regulated by mitogen-activated protein kinases and activator protein-1 in mesangial cells. *Journal of Korean Medical Science*, 24: 195-203.
- Hollenberg, N.K. (2004). Aldosterone in the development and progression of renal injury. *Kidney international*, 66:1-9.
- Huang, S., Zhang, A., Ding, G., Chen, R. (2009). Aldosterone-induced mesangial cell proliferation is mediated by EGF receptor transactivation. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 296(6):F1323-33.
- James, R., Cobb, M., Gilmour, J., Guyonnet, J., (2013). Safety of oral administration of spironolactone in cats with heart failure: Interim results of the seiscat study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27:604–756.
- Javadi, S., Djajadiningrat-Laanen, S.C., Kooistra, H.S., van Dongen, A.M., Voorhout, G., van Sluijs, F.J., van den Ingh, T.S., Boer, W.H., Rijnberk, A. (2005) Primary hyperaldosteronism, a mediator of progressive renal disease in cats. *Domestic Animal Endocrinology*, 28(1):85-104.

- Javadi, S., Slingerland, L.I., van de Beek, M.G., Boer, P., Boer, W.H., Mol, J.A., Rijnberk, A., Kooistra, H.S. (2004). Plasma renin activity and plasma concentrations of aldosterone, cortisol, adrenocorticotrophic hormone, and alpha-melanocyte-stimulating hormone in healthy cats. *Journal of veterinary internal medicine*, 18(5): 625-31.
- Jenkins, T.L., Coleman, A.E., Schmiedt, C.W., Brown, S.A. (2015). Attenuation of the pressor response to exogenous angiotensin by angiotensin receptor blockers and benazepril hydrochloride in clinically normal cats. *American Journal of Veterinary Research*, 76:807–813.
- Jensen, J., Henik, R.A., Brownfield, M., Armstrong, J. (1997). Plasma renin activity and angiotensin I and aldosterone concentrations in cats with hypertension associated with chronic renal disease. *American Journal of Veterinary Research*, 58(5):535-540.
- Jepson, R.E., Syme, H.M., Elliot, J. (2014). Plasma renin activity and aldosterone concentrations in hypertensive cats with and without azotemia and in response to treatment with amlodipine besylate. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 28:144-153.
- Juknevicus, I., Segal, Y., Kren, S., Lee, R., Hostetter, TH. (2004). Effect of aldosterone on renal transforming growth factor-beta. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 286(6):1059-1062.
- Kalluri, R. & Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6): 1420–1428.
- Kuo, C.C., Balakrishnan, P, Hsein, Y.C., Wu, V.C., Chueh, S.C., Chen, Y.M., Wu, K.D., Wang, M.J. (2015). The value of losartan suppression test in the confirmatory diagnosis of primary aldosteronism in patients over 50 years old. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 16(3):587-598.
- Kuo, CC., Wu, V.C., Tsai, C.W., Wu, K.D. (2011). Relative kidney hyperfiltration in primary aldosteronism: a meta-analysis. *Journal of the Renin-Angiotensin- Aldosterone System*, 12(2) 113–122.
- Lim, P.O., Jung, R.T., MacDonald, T.M. (1999). Raised aldosterone to renin ratio predicts antihypertensive efficacy of spironolactone: a prospective cohort follow-up study. *British journal of clinical pharmacology*, 48(5): 756-760.
- Lo, A.J., Holt, D.E., Brown, D.C., Schlicksup, M.D., Orsher, R.J., Agnello, K.A. (2014). Treatment of aldosterone-secreting adrenocortical tumors in cats by unilateral adrenalectomy: 10 cases (2002-2012). *Journal of veterinary internal medicine*, 28(1):137-143.
- Long, D.A., Price, A.L., Herrera-Acosta, J., Johnson, R.J. (2004). How does angiotensin II cause renal injury? *Hypertension*, 43:722-723.
- Mario, C.L., Lascelles, B.D., Vaden, S.I., Gruen, M.E., Mars, S.L. (2014). The prevalence and classification of chronic kidney disease in cats randomly selected from four age groups and in cats recruited for degenerative joint disease studies. *Journal of feline medicine and surgery*, 16(6): 465-472.
- Matsuda, M., Behrend, E.N., Kemppainen, R, Refsal, K., Johnson, A., Lee, H. (2015). Serum aldosterone and cortisol concentrations before and after suppression with fludrocortisone in cats: a pilot study. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 27(3):361-8.
- Mattsson, C., Young W.F. (2006). Primary aldosteronism: diagnostic and treatment strategies. *Nature Clinical Practice Nephrology*, 198-208

- Mishina, M., Watanabe, T., Fujii, K., Maeda, H., Wakao, Y., Takahashi, M. (1998). Non-invasive blood pressure measurements in cats: clinical significance of hypertension associated with chronic renal failure. *Journal of Veterinary Medical Science*, 60:805–808.
- Nagase, M., Shibata, S., Yoshida, S., Nagase, T., Gotoda, T., Fujita, T. (2006). Podocyte injury underlies the glomerulopathy of Dahl salt-hypertensive rats and is reversed by aldosterone blocker. *Hypertension*, 47:1084–1093.
- Nishiyama, A., Yao, L., Fan, Y., Kyaw, M., Kataoka, N., Hashimoto, K., Nagai, Y., Nakamura, E., Yoshizumi, M., Shokoji, T., Kimura, S., Kiyomoto, H., Tsujioka, K., Kohno, M., Tamaki, T., Kajiya, F., Abe, Y. (2005). Involvement of aldosterone and mineralocorticoid receptors in rat mesangial cell proliferation and deformability. *Hypertension*, 45(4):710-716
- Nishiyama, A., Yao, L., Nagai, Y., Miyata, K., Yoshizumi, M., Kagami, S., Kondo, S., Kiyomoto, H., Shokoji, T., Kimura, S., Kohno, M., Abe, Y. (2004). Possible contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertension*, 43:841– 848.
- Park, S.M., Jung, W.J., Park, J.M., Rhee, H., Kim, I.L., Seong, E.Y., Lee, D.W., Lee, S.B., Kwak, I.S., Shin, N., Song, S.H. (2016). Unmasked chronic renal function deterioration after unilateral adrenalectomy in patients with primary aldosteronism. *Kidney Research and Clinical Practice*, 35(4): 255–258.
- Ponda, M.P., Hostetter, H. (2006). Aldosterone antagonism in chronic kidney disease. *Clinical Journal of the American society of nephrology*, 1(4): 668-677.
- Quinkler, M., Zehnder, D., Eardley, K.S., Lепенies, J., Howie, A.J., Hughes, S.V., Cockwell, P., Hewison, M., Stewart, P.M. (2005). Increased expression of mineralocorticoid effector mechanisms in kidney biopsies of patients with heavy proteinuria. *Circulation*, 112: 1435-1443
- Ribstein, J., Cailar, G.D., Fesler, P., Mimran, A. (2005). Relative Glomerular Hyperfiltration in Primary Aldosteronism. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16: 1320–1325.
- Ritz, E. & Tomaschitz, A. (2014). Aldosterone and the kidney: a rapid moving frontier (an update). *Nephrology Dialysis Transplantation*, 29:2012-2019.
- Sansom, J. Rogers, K. Wood, J.L.N. (2004). Blood pressure assessment in healthy cats and cats with hypertensive retinopathy. *American journal of veterinary research*, 65(2):245-252.
- Schirpenbach, C. & Reincke, M. (2007). Primary aldosteronism: current knowledge and controversies in Conn's syndrome. *Nature Reviews Endocrinology*, 3: 220–227.
- Schulman, R.L. Feline primary hyperaldosteronism. (2010). *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 40(2):353-359.
- Sechi, L.A., Novello, M., Lapenna, R., Baroselli, S., Nadalini, E., Colussi, G.L. & Catena, C. (2006) Long-term renal outcomes in patients with primary aldosteronism. *Journal of American Medical Association*, 295:2638–2645.
- Shavit, L., Lifschitz, M.D., Epstein, M. (2012). Aldosterone blockade and the mineralocorticoid receptor in the management of chronic kidney disease: current concepts and emerging treatment paradigms. *Kidney international*, 81(10):955-968.
- Shibata, S., Nagase, M., Yoshida, S., Kawachi, H., Fujita, T. (2007). Podocyte as the target for aldosterone: roles of oxidative stress and Sgk1. *Hypertension*, 49: 355-364

- Sieber-Ruckstuhl, N.S., Boretti, F.S., Wenger, M., Maser-Gluth, C., Reusch, C.E. (2006). Cortisol, aldosterone, cortisol precursor, androgen and endogenous ACTH concentrations in dogs with pituitary-dependant hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Domestic animal endocrinology*, 31(1):63-75.
- Steele, J.L., Henik, R.A., Stepien, R.L. (2002). Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on plasma aldosterone concentration, plasma renin activity, and blood pressure in spontaneously hypertensive cats with chronic renal disease. *Veterinary Therapeutics*, 3(2):157-166.
- Stowasser, M. (2015). Update in primary aldosteronism. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100:1-10.
- Stowasser, M., Taylor, P.J., Pimenta, E., Al-Asaly Ahmed, A.H., Gordon, R.D. (2010). Laboratory Investigation of Primary Aldosteronism. *Clinical Biochemist Reviews*, 31(2): 39–56.
- Sun, Q.L., Li, M., Rui, H.L., Chen, Y.P. (2015). Inhibition of local aldosterone by eplerenone reduces renal structural damage in a novel model of chronic cyclosporine A nephrotoxicity. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 16(2): 301–310.
- Syme, H.M., Barber, P.J., Markwell, P.J., Elliot, J. (2002). Prevalence of systolic hypertension in cats with chronic renal failure at initial evaluation. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 220(12):1799-804.
- Terada, Y., Kobayashi, T., Kuwana, H., Tanaka, H., Inoshita, S., Kuwahara, M., Sasaki, S. (2005). Aldosterone stimulates proliferation of mesangial cells by activating mitogen-activated protein kinase 1/2, cyclin D1, and cyclin A. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16: 2296–2305.
- The Merck Veterinary manual (2013-okt). Renal Dysfunction in Small Animals.
http://www.merckvetmanual.com/mvm/urinary_system/noninfectious_diseases_of_the_urinary_system_in_small_animals/renal_dysfunction_in_small_animals.html [2015-12-12].
- Verhoek, J. H. P. (2011). Hyperaldosteronism: The Prevalence and Role in Cats with Chronic Kidney Disease. Utrecht: Utrecht University. Studentno.: 0462284, Faculty of Veterinary Medicine)
- Weiner, D. (2013). Endocrine and Hypertensive Disorders of Potassium Regulation: Primary Aldosteronism. *Seminars in Nephrology*, 33(3): 265–276.
- White, W.B., Duprez, D., St Hillaire, R., Krause, S., Roniker, B., Kuse-Hamilton, J., Weber, M.A. (2003). Effects of the Selective Aldosterone Blocker Eplerenone Versus the Calcium Antagonist Amlodipine in Systolic Hypertension. *Hypertension*, 41:1021-1026.
- Williams, T.L., Elliot, J. Syme, H.M. (2013). Renin-Angiotensin-Aldosterone System Activity in Hyperthyroid Cats with and without Concurrent Hypertension. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(3):522-529.
- Wu, V.C., Chueh, S-C., Chang, H.W., Lin, W.C., Liu, K.L., Li, H.Y., Lin, Y.H., Wu, K.D., Hsieh, B.S. (2008). Bilateral aldosterone-producing adenomas: differentiation from bilateral adrenal hyperplasia. *QJM: An International Journal of Medicine*, 101(1):13-22.
- Young, W.F. (2007). Primary aldosteronism: renaissance of a syndrome. *Clinical Endocrinology*, 66:607-18.
- Yu, S. & Morris, J.G. (1998). Plasma Aldosterone Concentration of Cats. *The Veterinary journal*, 155:63-68.

- Yuan, Y., Chen, Y., Zhang, P., Huang, S., Zhu, C., Ding, G., Liu, B., Yang, T., Zhang, A. (2012). Mitochondrial dysfunction accounts for aldosterone-induced epithelial-to-mesenchymal transition of renal proximal tubular epithelial cells. *Free radical biology and medicine*, 53(1): 30-43.
- Zhang, A., Jia, Z., Guo, X., Yang, T. (2007). Aldosterone induces epithelial-mesenchymal transition via ROS of mitochondrial origin. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 293(3):723-731.
- Zhu, C., Huang, S., Yuan, Y., Ding, G., Chen, R., Liu, B., Yang, T., Zhang, A. (2011). Mitochondrial dysfunction mediates aldosterone-induced podocyte damage: a therapeutic target of PPAR γ . *American Journal of Pathology*, 178(5):2020-2031.