

Kristian Rongchuan Ye

Referanseområder for aldosteron, renin og aldosteron/renin-ratio (ARR) hos normotensive

Hovedoppgave i Profesjonsstudiet i medisin

Veileder: Gustav Mikkelsen

Medveileder: Ingrid Hov Odsæter, Ingrid Kristine Opsjøn Lindmark

Januar 2023

Kristian Rongchuan Ye

Referanseområder for aldosteron, renin og aldosteron/renin-ratio (ARR) hos normotensive

Hovedoppgave i Profesjonsstudiet i medisin

Veileder: Gustav Mikkelsen

Medveileder: Ingrid Hov Odsæter, Ingrid Kristine Opsjøn Lindmark

Januar 2023

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

Fakultet for medisin og helsevitenskap



Kunnskap for en bedre verden

Sammendrag

Bakgrunn: Primær hyperaldosteronisme (PHA) er en viktig og relativt vanlig årsak til høyt blodtrykk. Som screening ved mistanke om PHA måles aldosteron, renin og aldosteron/renin-ratio (ARR) i blodprøver. Referanseområdene for disse markørene er usikre, og hensikten med denne studien er å estimere relevante referansegrenser for St. Olavs hospital i Trondheim, Norge. Laboratoriene som utfører ARR-analysen i Norge, benytter i dag 35 pmol/mIU som beslutningsgrense for diagnosen PHA.

Metoder: 33 friske, normotensive deltakere fikk målt blodtrykk før sittende blodprøvetaking, etter minst 10 minutter hvile. Aldosteron ble målt med en væskrokromatografi/massespektrometri-metode (LC-MS/MS), mens renin ble analysert med en kjemiluminescensimmunoassay (CLIA, Liaison Direct Renin fra DiaSorin).

Resultater: Median alder for kvinner (n = 17) og menn (n = 16) var henholdsvis 52.0 og 26.0 år. Gjennomsnittlig blodtrykk var 119 mmHg systolisk og 77 mmHg diastolisk. 95 % referanseområder var 41-544 pmol/L for aldosteron, 5.2-61.7 mIU/L for renin og 2-37 pmol/mIU for ARR. Median renin var lavere og ARR var høyere hos kvinner enn hos menn, og renin sank mens ARR økte med alder. Antall deltakere var imidlertid for lavt til å estimere kjønns- og aldersspesifikke referanseområder.

Konklusjon: Våre resultater kan tyde på at man ved St. Olavs hospital bør benytte en noe lavere nedre referansegrense for aldosteron enn det som brukes i dag, mens det ikke er grunnlag for å foreslå nye grenser for renin. Dagens beslutningsgrense for ARR ligger nær den øvre referansegrensen estimert i vår studie, og støtter at beslutningsgrensen har en høy diagnostisk spesifisitet rundt 97.5 % i en normotensiv populasjon. Relativt få inkluderte deltakere og brede konfidensintervaller for estimatene gjør at videre forskning er ønskelig for å bekrefte validiteten av våre funn.

Innledning

Primær hyperaldosteronisme (PHA) betegner en tilstand med autonom overproduksjon av hormonet aldosteron fra en eller begge binyrer, og sekresjonen av aldosteron er da uavhengig av kroppens normale reguleringsmekanismer (1). Vanligvis skyldes den økte aldosteronfrigjøringen unilaterale adenomer i binyrene eller bilateral hyperplasi av binyrebarken (1). Aldosteron binder seg til mineralkortikoidreseptorer (MR) blant annet i nyrene, hvor det øker reabsorpsjon av natrium og sekresjon av kalium. Overskuddet av aldosteron ved PHA medfører væskeretensjon og økt ekstracellulært væskevolum, med økning av blodtrykket som konsekvens i tillegg til redusert serum-kalium (2, 3). Den vanligste kliniske presentasjonsformen ved PHA er hypertensjon, som ofte er behandlingsresistent (4), og tilstanden er en utbredt og underdiagnostisert årsak til sekundær hypertensjon (1). Man regner med at PHA finnes hos mellom 5 og 12 % av alle hypertensive pasienter, med særlig høy forekomst blant pasienter med medikamentresistent hypertensjon (1). Nyere studier antyder imidlertid at PHA er enda vanligere. Markou og medarbeidere (5) estimerer prevalensen av PHA blant hypertensive til 30 %, mens Funder (6) antyder prevalenstall helt opp mot 50 % av alle hypertensive.

Pasienter med PHA har høyere risiko for kardiovaskulære, renale og metabolske komplikasjoner sammenlignet med pasienter med essensiell hypertensjon. Eksempelvis er det påvist økt forekomst av hypertrofi av venstre ventrikel med sviktende diastolisk funksjon (7), hjerneslag, hjerteinfarkt og atrieflimmer (8) samt metabolsk syndrom og diabetes mellitus i denne gruppen (9). Økt aldosteronnivå fører dessuten til økt glomerulær filtrasjonsrate (GFR) og renalt perfusjonstrykk, det vil si en tilstand med hyperfiltrasjon i nyrene. I en studie som undersøkte nyrefunksjon hos PHA-pasienter sank GFR og perfusjonstrykk betydelig etter behandling av tilstanden, noe som kan forklares med at behandlingen avdekker en underliggende nyreskade forårsaket av overproduksjonen av mineralkortikoider (10). Behandlingen av PHA baseres på en individuell vurdering, og er enten medikamentell med en mineralkortikoidreseptor-antagonist (f.eks. spironolakton), eller kirurgisk fjerning av adenomer. Begge alternativer har vist god effekt på å forebygge ovennevnte komplikasjoner (3), slik at det er viktig å oppdage pasienter med PHA.

Klinisk mistanke om PHA oppstår hos hypertensive pasienter som har førstegradsslektning med PHA, svært høyt blodtrykk (over 150/100 mmHg) eller blodtrykk som er vanskelig å kontrollere medikamentelt, samt i en del andre situasjoner (1). Ved screening av pasienter med økt risiko for PHA måles blant annet konsentrasjonen av aldosteron og renin i venøst

blod, og disse markørene brukes til å regne ut aldosteron/renin ratio (ARR) (1). Pasienter med PHA vil som regel ha forhøyet konsentrasjon av aldosteron med samtidig supprimert renin, og følgelig blir ARR forhøyet. Til tross for at aldosteron fysiologisk sett stimulerer til ekskresjon av kalium, ses hypokalemi likevel kun hos opp til ca. 1/3 av pasientene (11). Dersom ARR måles over en definert grenseverdi kan autonom overproduksjon av aldosteron bekreftes ved å gjennomføre en intravenøs saltvannsbelastning, mens binyrevenekateterisering og eventuelt CT binyrer kan brukes til å skille mellom sykdom i én eller begge binyrer (1). Det har samtidig blitt stilt spørsmål ved validiteten av ARR som screeningtest for PHA (12).

Alternative diagnostiske metoder har blitt foreslått for å kunne fange opp flere pasienter med PHA, for eksempel måling av aldosteronkonsentrasjon i døgnurin (6). Dette begrunnes blant annet i at aldosteronsekresjonen gjennomgår en viss døgnvariasjon, noe som ikke nødvendigvis reflekteres i en blodprøve tatt på ett enkelt tidspunkt på dagen (6).

Den biokjemiske diagnostikken av PHA er utfordrende, blant annet fordi de gjeldende referanseområdene og beslutningsgrensene for aldosteron, renin og ARR har usikker gyldighet, og kan variere mellom laboratorier. Renin kan analyseres enten som direkte reninkonsentrasjon (DRC) eller som plasma-reninaktivitet (PRA). Analysemetodene for DRC og PRA utviser dårlig samsvar seg imellom, slik at omregning mellom metoder er problematisk (13). I tillegg oppgis verdiene med forskjellige måleenheter, noe som resulterer i en rekke numerisk ulike beslutningsgrenser for analysene for diagnosen PHA. I Norge brukes $ARR > 35 \text{ pmol/mIU}$ som felles beslutningsgrense ved samtlige laboratorier som analyserer ARR (St. Olavs hospital, Haukeland universitetssykehus og Oslo universitetssykehus), en verdi som er basert på måling av DRC (1). Internasjonalt er en grenseverdi for ARR på 30 ng/dL per ng/mL/h (da med PRA som mål på renin) i utstrakt bruk i henhold til Endocrine Societys retningslinjer fra 2016 (13). Retningslinjenes anbefaling som gjelder for samme analysemetode (DRC) og måleenheter som den norske grenseverdien, er på 91 pmol/mIU , selv om det bemerkes at verdien er usikker (13).

Hensikten med denne studien har vært å estimere referansegrenser for aldosteron, renin og ARR i en frisk populasjon med normalt blodtrykk og med bruk av de analysemetodene som er i klinisk bruk ved St. Olavs hospital (StOH) i dag. Vi antar som nullhypotese at resultatfordelingen for aldosteron, renin og ARR, målt med metodene som benyttes på StOH i en frisk, normotensiv populasjon, samsvarer med referanseområdene i bruk ved StOH i dag.

Materiale og metode

Deltakere og rekruttering

Deltakere ble rekruttert i perioden september-november 2022 ved hjelp av plakater hengt opp ved StOH, Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) og andre offentlige bygninger i Trondheim, Norge. En digital versjon av plakaten ble også delt på NTNUs interne kommunikasjonskanal Innsida i tillegg til sosiale medier (Facebook). For å kunne inkluderes i studien måtte deltakere anse seg selv som friske, være over 20 år og forstå norsk. Alle deltakere møtte opp fysisk ved StOH for prøvetaking. Definerte eksklusjonskriterier var kjent hypertensjon, bruk av faste medisiner som kan påvirke hormonanalysene (betablokkere, diuretika, angiotensin-konverterende enzym-hemmere (ACE-hemmere), angiotensin II-reseptorblokkere (AT-II-blokkere), kalsiumantagonister og andre antihypertensiva, og ikke-steroid antiinflammatoriske midler (NSAIDs)) eller hormonell prevensjon. Unntak ble gitt for personer som brukte allergimedisiner og kolesterolsenkende midler, da vi ikke har sett i litteraturen at disse har betydning for ARR. Dessuten ble det stilt krav til at deltakere ikke hadde vært syke de siste 4 ukene før prøvetaking, og man ekskluderte gravide og pasienter med kronisk nyresvikt, hypokalemi eller andre sykdommer som kan påvirke blodtrykket.

Prosjektet er godkjent av Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK), avdeling Midt-Norge, med saksnummer 465815.

Prøvetaking

Studiedeltakerne fikk avtale om prøvetaking ved StOH på formiddager mellom kl 8 og 12. Deltakerne var ikke fastende, men hadde blitt informert om at man måtte være oppegående i minst 2 timer før prøvetaking, i tråd med gjeldende retningslinjer for diagnostikk av PHA (1, 13). I tillegg ble deltakerne anbefalt å unngå kaffe og kraftig fysisk aktivitet på morgenen før prøvetaking, siden disse faktorene er kjent for å påvirke blodtrykket. Alle deltakere fikk skriftlig informasjon om studien og ga sitt skriftlige samtykke til deltakelse i studien og håndtering av biologisk materiale. Deretter fylte man ut et kort spørreskjema om helse og blodtrykk (se vedlegg 1), der det ble innhentet opplysninger om blodtrykksstatus, bruk av faste medikamenter (inkludert prevensjon), menstruasjonsstatus for kvinner, røyking, bruk av snus og saltinntak.

Etter en hvileperiode på minimum 5 minutter ble det målt blodtrykk hos alle studiedeltakerne ved hjelp av et digitalt blodtrykksapparat (WelchAllyn Connex ProBP 3400, Welch Allyn Inc, NY, USA eller BOSO Medicus X, BOSCH + SOHN GmbH, Jungingen, Tyskland).

Blodtrykket ble målt på høyre arm og i sittende stilling. Det ble gjennomført tre målinger med 3 minutters intervall mellom hver måling, og gjennomsnittet av 2. og 3. måling ble lagt til grunn for statistisk analyse. Deltakere som fikk påvist blodtrykk over 140/90 mmHg ved gjentatte prøvetakinger ble ekskludert fra studien, og oppfordret til å kontrollere blodtrykket sitt hos fastlege.

Deltakerne hvilte sittende i minimum 10 minutter (regnet fra første blodtrykksmåling) før venøs blodprøvetaking. Dette foregikk også i sittende posisjon, med punksjon av en albuevene på høyre eller venstre arm. Ved mislykket prøvetaking bisto bioingeniør ved StOHs prøvetakingspoliklinikker. I disse tilfellene måtte deltakeren gå ca. 100 meter til et nabobygg på sykehuset, og her ble det noe kortere hviletid før prøvetaking, rundt 5 minutter. Det ble tatt fem rør (totalt 25 ml blod) fra hver deltaker: to serumrør til aldosteron og generelle prøver (natrium, kalium, kalsium, klorid, fritt T4, TSH, kreatinin, eGFR), ett plasmarør til renin og to rør til biobanking. Prøvene ble sendt med rørpost til sykehusets laboratorium, oppbevart ved romtemperatur (20 °C) i opptil 120 minutter etter prøvetaking, og deretter sentrifugert i 10 minutter i 2200 G ved romtemperatur. Rørene til analyse av aldosteron og renin ble så avpipettert og fryst ned til -20 °C før de ble tint og analysert, mens generelle serumprøver ble analysert på laboratoriets automasjonssystem uten nedfrysing.

Laboratorieanalyse

Aldosteron i serum ble analysert ved hjelp av kombinert væskechromatografi/tandem massespektrometri (LC-MS/MS). Apparatene brukt i analysen er Agilent 1290 høytrykksvæskechromatograf koblet til Agilent 6490A Triple Quadropole LC-MS/MS detektor (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). En studie fra StOH (14) med aktuelle apparatur fant at laveste detekterbare verdi (LOD) for aldosteron var 5.00 pmol/L. Analysens totale måleområde var fra 10 pmol/L til 5 000 pmol/L. For (innen-serie) repeterbarhet var analytisk variasjonskoeffisient (CV) 4.0 % ved lave verdier (60.0 pmol/L) og 2.6 % ved høye verdier (637 pmol/L). Analytisk CV for reproducerbarhet (målinger i flere analyseserier) i løpet av 14 måneder var på 7.0 %, 4.8 % og 5.3 % ved konsentrasjoner på henholdsvis 45.4, 184 og 1080 pmol/L (14).

Laboratoriet ved StOH byttet analysemetode for renin i august 2022 (15). Analysemetoden som benyttes er Liaison Direct Renin, en kjemiluminescens-immunoassay (CLIA) som kjøres på analyseinstrumentet Liaison XL (DiaSorin, Saluggia, Italia). Renin i EDTA-plasma måles som direkte renin-konsentrasjon (DRC), med nedre grense for måleområdet på 2.0 mIU/L,

mens øvre målegrense er 500 mIU/L (16). CV for repeterbarhet på Liaison XL-instrumentet er oppgitt av produsenten til 4.9 % ved 3.471 mIU/L og 4.3 % ved 267.9 mIU/L. For reproduserbarhet i flere serier varierer CV fra 13.03 % ved lave verdier til 7.82 % ved høye verdier av renin (17).

Analysen av natrium (Na), kalium (K), kalsium (Ca), klorid (Cl), kreatinin, estimert glomerulær filtrasjonsrate (eGFR), fritt thyroxin (T4) og tyreostimulerende hormon (TSH) ble utført for å avdekke tilstander som kunne påvirke måleresultatene for aldosteron og renin. Disse ble målt i serumprøver, og prinsippene for metodene er som følger (15):

- Na, K og Cl måles via indirekte potensiometri med ioneselektiv elektrode.
- Ca bindes til fargestoffet Arsenazo III, og fargeintensiteten måles fotometrisk.
- Kreatinin baserer seg på en enzymatisk metode. eGFR ble beregnet ved hjelp av CKD-EPI-formelen.
- Fritt T4 og TSH estimeres ved hjelp av en immunologisk metode.

Alle disse analysene ble kjørt ved hjelp av instrumenter fra Siemens Healthineers (Erlangen, Tyskland), enten Siemens ADVIA Chemistry XPT (Na, K, Ca, kreatinin) eller Siemens ADVIA Centaur XPT (fritt T4, TSH) (15).

Statistisk analyse

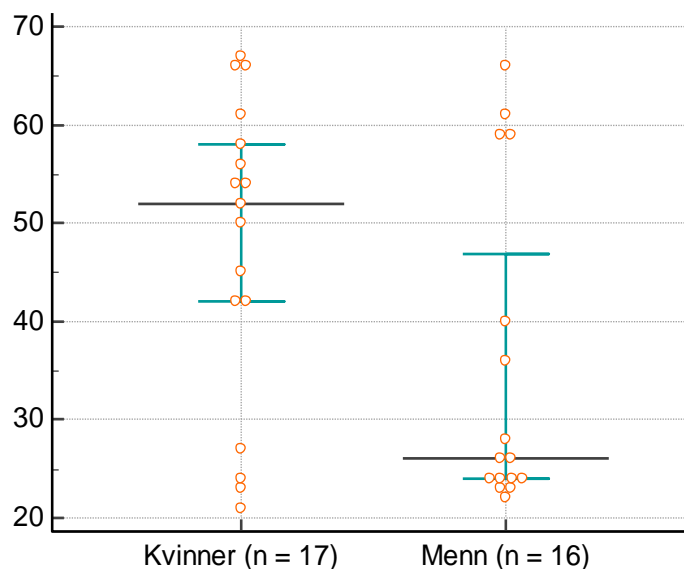
Variabler som passet med Gauss-fordeling etter Shapiro-Wilks test ble beskrevet med gjennomsnitt og standardavvik (SD), mens data som ikke var Gauss-fordelte ble beskrevet med median og verdier for nedre og øvre kvartil (Q1-Q3), hvis ikke annet er nevnt spesifikt. Referanseområder ble beregnet hovedsakelig etter parametrisk metode, med transformering av data til en tilnærmet Gauss-fordeling. Det blir presentert referanseområder definert som sentrale 95 %, altså verdier for 2.5- og 97.5-persentilene, i tillegg til sentrale 90 % med 5- og 95-persentilene. Analyser for forskjell i sentraltendens mellom Gauss-fordelte variabler ble gjort med t-test for uavhengige utvalg, mens for ikke-Gauss-fordelte variabler brukte man Mann-Whitney U-test, begge med signifikansnivå $p < 0.05$. Spearman-korrelasjonskoeffisienter ble beregnet for ikke-Gauss-fordelte resultater, med $p < 0.05$ som signifikansnivå for univariat analyse og $p < 0.001$ for multivariat analyse. Statistisk analyse ble fortrinnsvis gjort i MedCalc versjon 20 (MedCalc Software Ltd, Oostende, Belgia).

Resultater

Totalt 44 deltakere fikk avtale om prøvetaking i perioden september til november 2022. Av disse måtte 3 avlyse på grunn av sykdom, 1 på grunn av andre avtaler, og 1 grunnet mislykket prøvetaking. 3 andre deltakere fikk målt høyt blodtrykk over den definerte grensen på 140/90 mmHg ved oppmøte, mens ytterligere 3 møtte opp til prøvetaking uten på forhånd å ha oppgitt at de brukte hormonell prevensjon. Alle disse (n = 11) ble ekskludert fra studien, noe som ga en referansegruppe på totalt 33 personer, hvorav 17 kvinner og 16 menn.

Blant de 33 personene i referansegruppen var det 6 som fikk blodprøvene tatt av bioingeniør grunnet utfordrende prøvetaking, og hos 7 deltakere ble blodtrykket målt med BOSO Medicus X. De resterende fikk venepunksjon utført på samme sted som blodtrykksmålingen (n = 27), eller målt blodtrykket med apparat fra WelchAllyn (n = 26).

Yngste deltaker var 21 år, mens eldste var 67 år. Blant kvinnene var flest i aldersgruppen 50-60 år (n = 6), og median alder var 52.0 (Q1-Q3 38.3-58.8) år. Mennene i studien hadde en lavere median alder på 26.0 (Q1-Q3 24.0-49.5) år, men aldersforskjellen mellom menn og kvinner var ikke statistisk signifikant ifølge Mann-Whitney U-test (p = 0.07). Flertallet av mennene i referansegruppen (n = 10) var mellom 20 og 30 år.

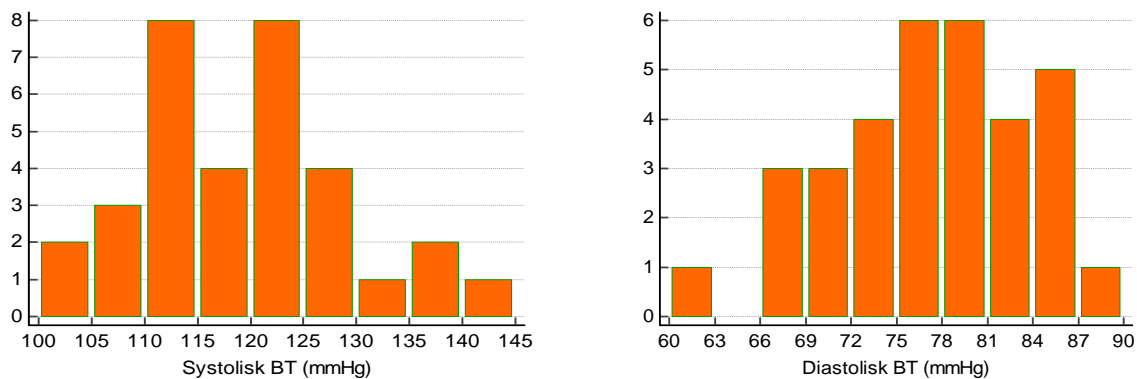


Figur 3.1 – Punktdiagram for aldersfordeling blant deltakerne, sortert på kjønn. De lange horisontale linjene er medianer, mens klammene viser 95 % CI for medianen.

26 av deltakerne oppga ingen kroniske sykdommer, 5 hadde astma, allergi eller begge deler, og 2 hadde andre tilstander (lichen sclerosus, vitamin B12-mangel, psoriasis og -artritt, artrose). Blant medisiner var antihistaminer vanligste preparat (n = 4), etterfulgt av statiner

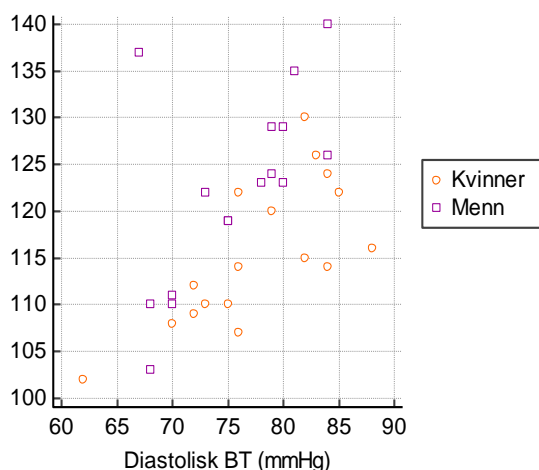
(n = 2). Jerntabletter, vitamin B12-tilskudd (Behepan), inhalasjonssteroider (Flutikason) og topikale steroider (Dermovat) ble alle brukt av henholdsvis én deltaker. 3 av deltakerne hadde vært forkjølet i løpet av de siste 4 ukene før prøvetakingen. Ingen deltakere hadde kjent høyt blodtrykk fra tidligere, mens rundt halvparten (n = 18) rapporterte forekomst av høyt blodtrykk hos minst ett biologisk familiemedlem. Av kvinnene i studien var det omtrent like mange postmenopausale (n = 9) som menstruerende (n = 8). Én deltaker røykte jevnlig, tre brukte snus, og én oppga et habituel lavt saltinntak.

Høyeste verdier for blodtrykk blant deltakerne i referansegruppen var 140 mmHg systolisk og 88 mmHg diastolisk. Både systolisk og diastolisk blodtrykk var tilnærmet Gauss-fordelte (figur 3.2), med henholdsvis 118.8 ± 9.6 mmHg og 76.7 ± 6.2 mmHg som gjennomsnitt og standardavvik.



Figur 3.2 – Histogrammer for resultatfordelingene for systolisk og diastolisk blodtrykk

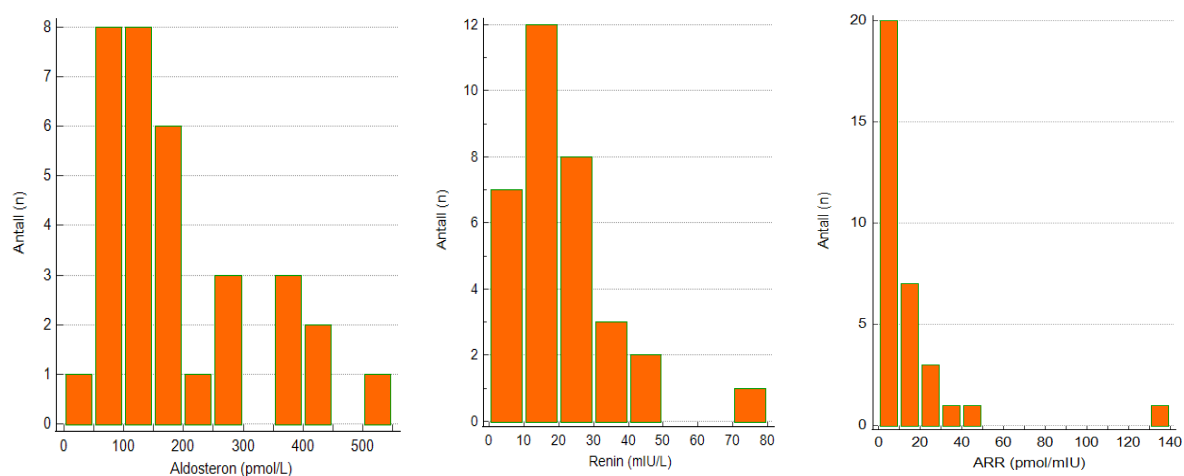
Figur 3.3 på neste side viser forholdet mellom systolisk og diastolisk blodtrykk gruppert på kjønn. Hos menn var det systoliske trykket i gjennomsnitt 7.1 mmHg høyere enn hos kvinner ($p = 0.03$), mens forskjellen i diastolisk trykk (1.9 mmHg høyere blant kvinner) ikke var statistisk signifikant ($p = 0.39$). Det ble funnet en statistisk signifikant positiv korrelasjon mellom systolisk og diastolisk blodtrykk både hos kvinner ($p = 0.001$) og menn ($p = 0.010$). Én observasjon skilte seg markant fra de andre, med relativt høyt systolisk trykk i forhold til det diastoliske. Den aktuelle deltakeren brukte allergimedisin og hadde høyt blodtrykk i familien, men alle prøveresultatene var innenfor de respektive referanseområdene.



Figur 3.3 – Spredningsplott med forholdet mellom systolisk og diastolisk BT, fordelt etter kjønn. Merk en avvikende observasjon i øvre venstre kvadrant.

Resultatene for kalium, natrium, kalsium og klorid var for de fleste deltakerne innenfor laboratoriets referanseområder. Unntaket var klorid, der man målte en verdi hos en enkelt deltaker på 109 mmol/L, som oversteg referanseområdet på 101-108 mmol/L. Med et referanseområde på 12.2-19.6 pmol/L for fritt T4 var det 2 deltakere som lå under nedre referansegrense (laveste 11.9 pmol/L), og 2 deltakere over øvre grense (høyeste 21.7 pmol/L). For TSH var alle målte verdier innenfor referanseområdet på 0.50-4.00 mIU/L. Kreatinin varierte mellom 45 og 73 $\mu\text{mol/L}$ hos kvinner, og 60 og 85 $\mu\text{mol/L}$ hos menn. Medianene var henholdsvis 65 (60-67) og 78 (72-80) $\mu\text{mol/L}$. Den laveste verdien for eGFR var 79 mL/min/1.73 m², og flertallet av deltakerne (n = 26) hadde eGFR over 90 mL/min/1.73 m².

Resultatfordelingene for aldosteron, renin og ARR er fremstilt i figur 3.4. Dataene var ikke Gauss-fordelte, og medianer med tilhørende 90 % CI er oppgitt i tabell 3.1.



Figur 3.4 – Histogrammer for resultatfordelingene for aldosteron, renin og ARR

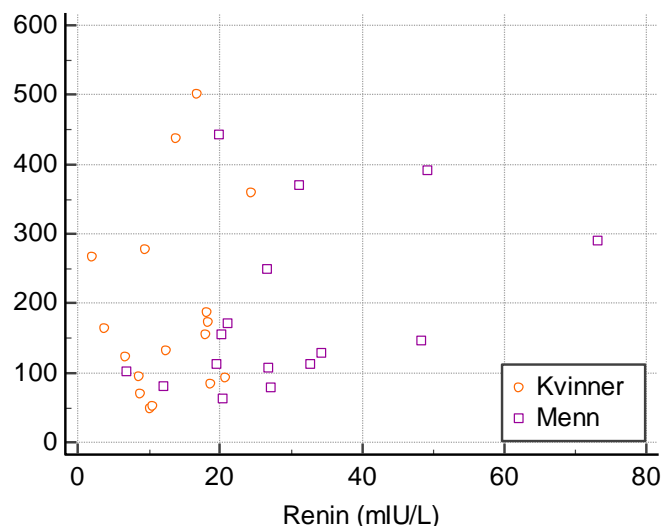
Tabell 3.1 – Deskriptiv statistikk for aldosteron, renin og ARR

	Antall (kvinner/menn)	Laveste-høyeste verdi	Median	95 % CI for median
Aldosteron (pmol/L)	33 (17/16)	47.9-501.0	145.0	108.6-180.8
Renin (mIU/L)	33 (17/16)	2.0-73.2	18.7	13.0-21.1
ARR (pmol/mIU)	33 (17/16)	2.8-133.5	8.1	5.2-10.8

Medianverdier med tilhørende 95 % konfidensintervaller sortert på kjønn er angitt i vedlegg 2, tabell 1. Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom aldosteronnivåene hos kvinner og menn ($p = 0.9713$). Renin var statistisk signifikant lavere hos kvinner enn hos menn ($p = 0.0002$), og følgelig var også ARR statistisk signifikant høyere hos kvinner ($p = 0.0062$).

Siden resultatene for aldosteron, renin og ARR i utgangspunktet ikke var Gauss-fordelte, gjorde man analyser for statistiske ekstremverdier etter logaritmisk transformering av måleresultatene. For aldosteron og renin resulterte dette i Gauss-fordelte data, og ifølge generalisert ESD-test med alfa-nivå 0.01 var det ingen sikre ekstremverdier. For ARR var ikke logaritmisk transformering tilstrekkelig til å gjøre dataene Gauss-fordelte. Vi benyttet derfor en Box-Cox-transformering med $\lambda = -0.427$ (beregnet automatisk i MedCalc) for å konvertere til en akseptabel Gauss-fordeling, og generalisert ESD-test (alfa-nivå 0.01) ga ingen utslag.

Til tross for at formell testing ikke viste noen sikre ekstremverdier, ser man av histogrammene (figur 3.4) at en observasjon for ARR var langt høyere enn flertallet. Den aktuelle målingen hadde en verdi under den minste målbare verdien for analysemetoden for renin, og ble oppgitt som <2 mIU/L. I statistiske analyser ble verdien satt til 2 mIU/L, og med en korresponderende aldosteronverdi på 267 pmol/L ble ARR beregnet til 133.5 pmol/mIU. Aldosteronverdien er godt over medianen i datasettet, men i referanseområdet og illustrerer hvordan ekstremt lave verdier av renin har stor innflytelse på ARR. Man bør være oppmerksom på at ARR-verdien i dette tilfellet er enda høyere enn beregnet, siden reninverdien er sensurert og egentlig lavere enn 2 mIU/L.



Figur 3.5 – Spredningsplott for aldosteron mot renin, fordelt etter kjønn

Vi ser av spredningsplottet for aldosteron mot renin (figur 3.5) at flertallet av deltakerne, uavhengig av kjønn, ligger i nedre venstre kvadrant for disse to nøkkelmarkørene. Det kan se ut som at det er større spredning i reninverdiene for menn sammenlignet med kvinner, men ifølge F-test etter logaritmisk transformering var denne forskjellen ikke statistisk signifikant ($p = 0.575$). I dette plottet kommer også observasjonen med sensurert renin frem som punktet lengst til venstre i figuren, og stigningstallet for en rett linje fra origo gjennom punktet vil være ARR, som er svært høy i dette tilfellet – betydelig høyere enn for de andre observasjonene i datasettet.

Referanseområder for aldosteron, renin og ARR

Sentrale 95 % og 90 % referanseområder for aldosteron, renin og ARR ble beregnet ved hjelp av parametriske metode etter konvertering av resultater til en tilnærmet normalfordeling, og er fremstilt i kolonnene under «Med sensurert verdi (n = 33)» i tabell 3.2. Fordi resultatene inneholdt en sensurert verdi for renin, må bruken av parametriske metode anses som en forenkling, og estimatene må tolkes med forsiktighet. Referansegrensene er tilbaketransformert basert på logaritmisk transformerte data for aldosteron og renin. For ARR var dataene ikke Gauss-fordelte etter logaritmisk transformering, og samme Box-Cox-transformering som ovenfor ($\lambda = -0.427$) ble anvendt til estimering av referanseområdet.

Tabell 3.2 – Sentrale 95 % og 90 % referanseområder for aldosteron, renin og ARR, beregnet med og uten en observasjon med sensurert verdi for renin. Til sammenligning er nåværende referanseområder ved St. Olavs hospital listet opp. Intervallene i parentes er respektive 90 % konfidensintervaller (CI) for hver referansegrense.

	Med sensurert verdi (n = 33)		Uten sensurert verdi (n = 32)		Referanseområder StOH
	Nedre grense	Øvre grense	Nedre grense	Øvre grense	
Aldosteron (pmol/L), 95 %	42.1 (30.3-58.4)	550.8 (396.4-765.2)	41.1 (29.4-57.5)	543.9 (389.0-760.6)	76-588 ¹
Aldosteron (pmol/L), 90 %	51.7 (37.2-71.9)	447.9 (322.4-622.3)	50.6 (36.2-70.8)	442.0 (316.1-618.1)	76-588 ¹
Renin (mIU/L), 95 %	4.0 (2.8-5.8)	69.9 (48.5-100.8)	5.2 (3.8-7.1)	61.7 (44.7-85.1)	N/A
Renin (mIU/L), 90 %	5.0 (3.5-7.3)	55.6 (38.5-80.1)	6.3 (4.6-8.7)	50.6 (36.7-69.8)	4.4-46.1
ARR (pmol/mIU), 95 %	2.47 (1.98-3.16)	86.58 (35.91-360.41)	1.91 (1.30-2.80)	36.60 (24.94-53.70)	N/A (> 35) ²
ARR (pmol/mIU), 90 %	2.87 (2.27-3.74)	47.97 (23.57-133.67)	2.42 (1.65-3.55)	28.87 (19.67-42.35)	N/A (> 35) ²

1) Det er usikkert hvilke persentiler referanseområdet representerer.

2) For ARR er oppgitt verdi dagens beslutningsgrense for diagnosen PHA.

Sensitivitetsanalyser

Som beskrevet tidligere hadde en observasjon svært lav verdi for renin, og ARR for dette tilfellet ble dermed betydelig høyere enn resten av datasettet. Selv om observasjonen ikke kunne påvises som en statistisk ekstremverdi, kan det være relevant å gjøre analysene uten den. Med en referansegruppe bestående av de resterende 32 deltakerne, får man referanseområder som vist i kolonnene under «Uten sensurert verdi (n = 32)» i tabell 3.2. Parametrisk metode ble benyttet også her, og alle dataene er tilbaketransformert etter logaritmisk transformering.

Korrelasjoner og multivariat analyse

Det ble ikke funnet en statistisk signifikant korrelasjon mellom aldosteron og alder ($p = 0.63$). For renin var det en synkende trend med alder ($\rho = -0.42$, $p = 0.015$), mens ARR økte samlet sett med alder ($\rho = 0.45$, $p = 0.0091$). Se tabell 2 og figur 1 i vedlegg 2 for detaljer. Til multivariabel-analyse ble Spearman-korrelasjonskoeffisienter beregnet ved hjelp av SAS versjon 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, USA) for alle de biokjemiske markørene som inngår i prosjektet. Det ble funnet en statistisk signifikant korrelasjon mellom resultatene av kreatinin og renin ($p = 0.0005$), med $\rho = 0.576$. Likeledes hadde man for klorid og natrium en statistisk signifikant korrelasjon ($p = 0.0004$) med $\rho = 0.583$.

Diskusjon

I denne studien har vi estimert referanseområder for aldosteron, renin og ARR i en frisk, normotensiv populasjon, rekruttert fra regionen rundt St. Olavs hospital i Trondheim (tabell 3.2). Det har ikke vært mulig å avklare hvilke persentiler som er lagt til grunn for de gjeldende referansegrensene for aldosteron, men heretter vil vi bruke estimatene for sentrale 95 % referanseområder som utgangspunkt for drøfting dersom ikke annet er oppgitt. Sammenlignet med gjeldende referanseområder ved StOH, beregnet vi en lavere nedre referansegrense for aldosteron, mens grensene for renin samsvarer forholdsvis godt med dagens grenser. Øvre referansegrense for ARR beregnet uten en sensurert verdi for renin ($n = 32$) var 36.60 pmol/mIU, og er nær dagens kliniske beslutningsgrense for ARR ved mistenkt PHA på 35 pmol/mIU.

Referanseområder for aldosteron

Gjeldende referansegrenser for aldosteron ved StOH er omregnet fra referanseområdene som ble brukt med metoden Coat-A-Count Aldosterone, en radioimmunoassay (RIA) fra Siemens (18). Grensene som er vist i tabell 3.2, gjelder for oppegående personer. Produsenten av analysemetoden oppgir at grensene er basert på et normalt saltinntak (19), men utover dette foreligger ingen detaljer vedrørende prøvetaking og preanalytiske faktorer.

De empiriske dataene i vår studie tyder på at nedre referansegrense for aldosteron kan ligge noe lavere enn dagens grense, da 76 pmol/L ligger utenfor våre 90 % CI både med og uten sensurert verdi. En mulig årsak til den observerte forskjellen i de nedre referansegrensene for aldosteron er forskjell mellom studiepopulasjonene, samt at omregningen av referanseområdene fra RIA-metoden til LC-MS/MS medfører usikkerhet på grunn av systematiske forskjeller mellom metodene. Referanseområder for aldosteron med LC-MS/MS har også blitt estimert av Baron (20) og Meunier (21), som oppgir nedre referansegrenser på henholdsvis 42 pmol/L (verdi for 5-persentilen) og 50.8 pmol/L (2.5-persentilen).

Flere studier har dessuten vist at kroppsstilling ved prøvetaking har betydning for resultatene for aldosteron, så vel som for renin og ARR (22, 23). Prøvene ble tatt sittende etter oppegående aktivitet i vår studie, men ettersom aldosteron øker fra liggende til stående stilling (23), kan forskjeller i kroppsstilling tilsynelatende ikke bidra til å forklare den lavere referansegrensen som ble estimert ved sittende prøvetaking. Ut ifra dette styrkes mistanken om at StOHs nedre referansegrense for aldosteron kan være noe for høy.

For øvre referansegrense for aldosteron viser våre funn i tabell 3.2 relativt brede 90 % CI, og fordi våre estimater inneholder den gjeldende referansegrensen, er det ikke grunnlag for å foreslå justeringer her. I andre studier fant Baron (20) en ganske mye lavere verdi for øvre referansegrense enn Meunier (21) og vår studie, men vi bemerker at Barons øvre grense på 309 pmol/L er definert som 95-persentilen, kontra 97.5-persentilen hos Meunier, som var 618 pmol/L. Studiene skilte seg også i det at deltakerne hos Baron satt i minst 30 minutter før prøvetaking, begrunnet i at nivåene av markørene kan bruke opptil 30 minutter på å stabilisere seg etter en endring i kroppsstilling. Meunier (21) gjennomførte prøvetaking etter minst 10-15 minutter sittende hvile, i likhet med praksis i vår studie. Dersom man antar at deltakerne gikk fra stående til sittende før prøvetaking, er det sannsynlig at aldosteron sank til lavere nivåer hos de som satt i en lengre periode.

Referanseområder for renin

Referanseområdet for renin ved StOH er oppgitt av produsenten av analysemetoden Liaison Direct Renin, basert på blodprøver tatt av 89 friske individer med normalt blodtrykk og normalt fastende blodsukker (15). Gjeldende referansegrenser er 5- og 95-persentilene (sentrale 90 %) for personer som har vært oppegående i mer enn 30 minutter, og til sammenligning bruker vi derfor også sentrale 90 % referanseområder. Nedre referansegrense for renin er så vidt utenfor 90 % CI i vårt estimat uten sensurert verdi. Ellers ligger dagens referansegrenser innenfor de respektive 90 % CI, og vi har ikke grunnlag for å anbefale å ta i bruk nye grenser for renin.

Referansegrenser for Liaison Direct Renin er undersøkt i flere andre studier, med til dels svært varierende funn. Studiene som er referert i dette avsnittet, bruker alle sentrale 95 % referanseområder, og dermed bruker vi også våre tilsvarende grenser som utgangspunkt for diskusjon. Vår nedre referansegrense på 5.2 mIU/L ligger nær resultatene til Dorrian (24) og Gruson (25), mens Deng (26) beregnet nedre referansegrense for renin til ca. 3 mIU/L. For øvre referansegrense er spredningen stor mellom ulike studier, som har rapportert verdier fra 44.9 mIU/L (24) til ca. 100 mIU/L (26). Våre funn ligger omtrent midt i sjiktet med 61.7 mIU/L. Det er vanskelig å si noe sikkert om betydningen dette har for StOHs referansegrenser, siden variasjonen blant annet kan skyldes ulikheter i studiepopulasjon og studiedesign.

Referanseområder for ARR

ARR har klinisk nytteverdi som screeningprøve for PHA hos hypertensive når visse kriterier er oppfylt (1). Vår øvre referansegrense for ARR beregnet uten sensurert verdi er 36.60 pmol/mIU, altså vil omtrent 97.5 % av friske individer ha verdier for ARR under denne grensen. StOHs gjeldende kliniske beslutningsgrense er 35 pmol/mIU, og våre funn indikerer at denne grensens diagnostiske spesifisitet er ca. 97.5 % når man undersøker en frisk, normotensiv populasjon. Dersom dette er et akseptabelt nivå for spesifisiteten, kan våre resultater støtte bruken av $ARR > 35$ pmol/mIU som beslutningsgrense for å vurdere videre utredning for PHA. Arbeidet gjort i denne studien gir derimot ikke grunnlag for å vurdere testens sensitivitet, det vil si andelen av personer med PHA som har ARR-verdi over beslutningsgrensen. Det kan heller ikke sies noe sikkert om spesifisiteten for $ARR > 35$ pmol/mIU i en hypertensiv populasjon, som sannsynligvis vil omfatte de fleste med klinisk mistenkt PHA. Årsaken er at studien ikke har inkludert deltakere med hypertensjon eller bekreftet PHA, og disse aspektene må derfor undersøkes videre i annen forskning.

Vi vil understreke at våre estimater må betraktes som noe usikre, da konfidensintervallene for referansegrensene er relativt vide. Ytterligere usikkerhet kommer også av at estimatet med sensurert verdi ($n = 33$) gir en atskillig høyere øvre referansegrense på 86.58 pmol/mIU og svært vide konfidensintervall. Den sensurerte observasjonen var under måleområdet for reninanalysen, og demonstrerer den dominerende effekten av svært lave reninverdier på ARR. Siden aldosteronverdien ikke var veldig høy, er PHA heller ikke veldig sannsynlig hos den aktuelle deltakeren. Dersom dette skyldes en feilmåling eller av andre årsaker ikke kan regnes som gyldig, vil resultatene i studien vår i større grad kunne styrke valget av 35 pmol/mIU som beslutningsgrense for PHA.

En gjennomgang viste at deltakeren med det sensurerte prøveresultatet hadde diastolisk blodtrykk nær vår øvre grense (88 mmHg) og var en av to som gikk på kolesterolmedisin (statiner). Statiner er vist å påvirke reninsekresjonen, men det kan se ut som at påvirkningen er usikker (27), og man kan ikke sikkert slå fast at statinbruk var årsaken til suppressert renin i dette tilfellet. Den nøyaktige reninverdien er ukjent, men under 2 mIU/L, og en verdi for renin på 1 mIU/L ville for eksempel blitt regnet som en ekstremverdi etter logaritmisk transformering (riktignok uten akseptbar Gauss-fordeling). Vi har derfor valgt å presentere to sett med referanseområder, beregnet med og uten denne ene observasjonen.

Frem til august 2022 benyttet man en reninanalyse fra Cisbio (Renin III GENERATION) ved StOH, med en tilhørende beslutningsgrense for ARR på 100 pmol/ng. Grunnlaget for

grenseverdien var usikkert, men den ble satt for å «prioritere spesifisitet framfor sensitivitet» (28). En metodesammenligning viser at ARR målt med dagens Liaison-metode for renin oftest blir lavere i forhold til det man ville ha målt med Cisbio-teknikken (se figur 2 og 3 i vedlegg 2). For eksempel med aldosteronkonsentrasjoner på 500 og 2000 pmol/L vil en ARR-verdi på 100 med Cisbio tilsvare ARR på henholdsvis ca. 75 og 50 med Liaison, som begge er over beslutningsgrensen for Liaison-metoden på 35. Dette underbygger at dagens beslutningsgrense på 35 pmol/mIU gir en høyere diagnostisk sensitivitet enn den tidligere grensen på 100 pmol/ng, samtidig som den teoretiske spesifisiteten ligger på 97.5 %.

Øvre referansegrense for ARR er klinisk sett viktigst for PHA-diagnostikken, men også her er det stor variasjon mellom ulike studier, selv om metodikken er sammenlignbar. Baron (20) ligger lavest med en verdi for 95-persentilen på 22.3 pmol/mIU, og er eneste grenseverdi for ARR vi har funnet basert på tilsynelatende samme analysemetodikk som ved StOH. Med våre data er 95-persentilen som øvre grense 28.87 pmol/mIU, noe som fortsatt er en god del høyere enn Barons funn. Forskjellen er sannsynligvis ikke statistisk signifikant, da verdien hos Baron ligger innenfor 90 % CI for vårt estimat. CLIA som metode for måling av aldosteron synes generelt å føre til høyere øvre referansegrense for ARR enn når aldosteron måles med LC-MS/MS. De høyeste verdiene for øvre referansegrense (97.5-persentil) for ARR basert på CLIA-aldosteron er beregnet av Gruson (25) med 64 pmol/mIU og Deng (26) med 68.4 pmol/mIU, sistnevnte kun hos kvinner.

Vår opprinnelige 97.5-persentil for ARR med sensurert reninverdi (86.58 pmol/mIU) er betraktelig høyere enn det som ellers er rapportert i litteraturen, men vi minner om at Endocrine Societys retningslinjer oppgir 91 pmol/mIU som beslutningsgrense (13). Sistnevnte er likevel et usikkert anslag, presentert første gang i retningslinjene fra 2008 og basert på eldre metoder og måleteknikker. Samlet sett virker kanskje referansegrensen der den sensurerte verdien er ekskludert (36.60 pmol/mIU) mest realistisk blant våre funn, da den ligger nærmest funnet med tilsvarende metodologi (20). Dette unngår også problemet med at laveste renin- og høyeste ARR-verdi er sensurert.

Korrelasjoner og trender

I vårt datamateriale var det ingen statistisk signifikant forskjell mellom aldosteronverdier hos menn og kvinner. Kjønnforskjeller for aldosteron er omdiskuterte, og mens en studie (29) har rapportert høyere verdier hos kvinner, har andre funnet motsatt tendens (26, 30). I en studie som kartla referanseområder hos 50 friske deltakere var det ingen statistisk signifikant kjønnforskjell for aldosteron (31). Samtidig fant Arnold (32) i en populasjonsbasert studie i

Tyskland av over 5000 normotensive individer kun en «marginal forskjell» mellom kjønnene for aldosteron. Våre og andres funn gir derfor ikke grunnlag for å ta i bruk kjønnsesifikke referanseområder for aldosteron.

Median reninkonsentrasjon var lavere blant kvinner i vår studie, og ikke overraskende ble da også ARR høyere hos kvinner. Denne tendensen samsvarer generelt med det som er observert i litteraturen (29, 30, 32). Hos Deng (2018) var det riktignok ingen statistisk signifikant kjønnsforskjell for renin, selv om ARR var signifikant høyere hos kvinner. Vi har imidlertid ikke beregnet og sammenlignet referansegrenser for hvert kjønn, på grunn av et lavt antall deltakere og usikre estimater. Det blir dermed vanskelig å vurdere behovet for kjønnsesifikke referansegrenser.

For aldosteron var det ingen statistisk signifikant alderskorrelasjon, i tråd med funn hos Deng (26) og Abd-Allah (33). Renin sank og ARR steg med økende alder, en trend tilsvarende det som ble observert av Deng (26) og Hermanns (34), mens Hannemann (30) fant at alle tre markører sank med økende alder. Her kan videre forskning med et større populasjonsutvalg bidra til å avklare behovet for aldersesifikke referanseområder, slik blant annet Hermanns (34) har presentert tidligere.

Styrker og svakheter

Vår studie hadde kun 33 deltakere, siden det var relativt få personer som meldte interesse for å delta. En mulig årsak til dette er de nokså strenge eksklusjonskriteriene som ble definert for å rekruttere en adekvat referansegruppe. Dette resulterte i brede konfidensintervaller for estimatene, som gjør det vanskelig å trekke sikre konklusjoner ut ifra funnene. Det har kun vært mulig å beregne grenser for referansegruppen som helhet, da en inndeling etter kjønn og alder ville gitt for små subgrupper til å gjøre tilstrekkelig presise estimater. Effekten av andre faktorer som menstruasjonssyklus, kroppsstilling og saltinntak har av samme årsak ikke blitt undersøkt. Eksklusjon av gravide, personer som står på hormonell prevensjon og de fleste medikamenter betyr at våre estimater kan ha usikker gyldighet for slike individer.

Så langt vi vet er dette første studie som søker å estimere referansegrenser for aldosteron, renin og ARR ved StOH ved å studere en lokal, frisk normotensiv populasjon. Funnene våre kan først og fremst være til nytte for klinikere i Midt-Norge som er involvert i diagnostikk av PHA, ikke minst fordi vi har forsøkt å utforme studien tettest mulig opp mot gjeldende praksis her. Studieprotokollen ble lagt opp for å kontrollere kjente variabler som påvirker markørene

av interesse, og datamaterialet gir derfor et bilde av ARR-profilen hos friske normotensive individer i Trondheimsregionen.

Veien videre

For å kunne estimere mer robuste referansegrenser for aldosteron, renin og ARR er det ønskelig at man gjennomfører en ny, tilsvarende studie som inkluderer flere deltakere enn vi har maktet i denne studien. Dette vil også kunne muliggjøre inndeling av referanseområdene etter alder og kjønn, og man kan studere effekten av ulike faktorer på hormonnivåene.

Anerkjennelser

Takk til Endokrinologisk poliklinikk ved St. Olavs hospital, som stilte med lokaler for prøvetaking, samt blodtrykksapparat. En stor takk også til alle frivillige deltakere i prosjektet.

Referanser

1. Grytaas MA, Bakke Å, Ueland G, Jørgensen A. Primær hyperaldosteronisme: metodebok.no; 2022 [opdatert 18.09.2022]. Tilgjengelig fra: <https://metodebok.no/index.php?action=topic&item=tqYvFfuM>.
2. Sand O, Sjaastad Ø, og Haug E. Menneskets fysiologi. 2 utg. Oslo: Gyldendal Akademisk; 2016.
3. Grytaas MA. Primær hyperaldosteronisme – vanligere enn vi tror? Indremedisineren [Internett]. 2016 sitert 2016; 1: s. 8-10. Tilgjengelig fra: <https://indremedisineren.no/indremedisineren/pdf/2016-01-indremedisineren.pdf>.
4. Young WF, Jr. Pathophysiology and clinical features of primary aldosteronism. 2022. I: UpToDate [Internett]. Waltham, USA: Wolters Kluwer.
5. Markou A, Sertedaki A, Kaltsas G, Androulakis, II, Marakaki C, Pappa T, et al. Stress-induced Aldosterone Hyper-Secretion in a Substantial Subset of Patients With Essential Hypertension. J Clin Endocrinol Metab. 2015;100(8):2857-64.
6. Funder JW. Primary Aldosteronism: At the Tipping Point. Ann Intern Med. 2020;173(1):65-6.
7. Stowasser M, Sharman J, Leano R, Gordon RD, Ward G, Cowley D, et al. Evidence for Abnormal Left Ventricular Structure and Function in Normotensive Individuals with Familial Hyperaldosteronism Type I. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90(9):5070-6.
8. Milliez P, Girerd X, Plouin P-F, Blacher J, Safar ME, Mourad J-J. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. J Am Coll Cardiol. 2005;45(8):1243-8.
9. Hanslik G, Wallaschofski H, Dietz A, Riestler A, Reincke M, Allolio B, et al. Increased prevalence of diabetes mellitus and the metabolic syndrome in patients with primary aldosteronism of the German Conn's Registry. Eur J Endocrinol. 2015;173(5):665-75.
10. Ribstein J, Du Cailar G, Fesler P, Mimran A. Relative Glomerular Hyperfiltration in Primary Aldosteronism. J Am Soc Nephrol. 2005;16(5):1320-5.
11. Young WF. Diagnosis of primary aldosteronism. 2021. I: UpToDate [Internett]. Waltham, USA: Wolters Kluwer.
12. Hung A, Ahmed S, Gupta A, Davis A, Kline GA, Leung AA, et al. Performance of the Aldosterone to Renin Ratio as a Screening Test for Primary Aldosteronism. J Clin Endocrinol Metab. 2021;106(8):2423-35.
13. Funder JW, Carey RM, Mantero F, Murad MH, Reincke M, Shibata H, et al. The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. J Clin Endocrinol Metab. 2016;101(5):1889-916.
14. Lie M, Thorstensen K. A precise, sensitive and stable LC-MSMS method for detection of picomolar levels of serum aldosterone. Scand J Clin Lab Invest. 2018;78(5):379-85.
15. Medisinsk biokjemi og immunologi: Laboratoriemedisinsk klinikk, St. Olavs Hospital; Tilgjengelig fra: https://data.stolav.no/labhandboker/Medisinsk_biokjemi/ask/TestFinder.html.
16. Dypdalsbakk T, Hagh B. Renin Direct analysert på LiaisonXL EQS: St. Olavs Hospital; 2022 [opdatert 23.09.2022].
17. LIAISON® Direct Renin (kit insert). DiaSorin, Saluggia, IT. 2020.
18. Hansen T. Aldosteron i serum, LC/MS-MS. AMB EQS: St. Olavs Hospital; 2022 [

19. Coat-A-Count® Aldosterone (kit insert). DPC; 2005.
20. Baron S, Amar L, Faucon AL, Blanchard A, Baffalio L, Faucard C, et al. Criteria for diagnosing primary aldosteronism on the basis of liquid chromatography-tandem mass spectrometry determinations of plasma aldosterone concentration. *J Hypertens*. 2018;36(7):1592-601.
21. Meunier C, Blondelle D, Faure P, Baguet J-P, Le Goff C, Chabre O, et al. Development and validation of a method using supported liquid extraction for aldosterone determination in human plasma by LC-MS/MS. *Clin Chim Acta*. 2015;447:8-15.
22. Yin G, Zhang S, Yan L, Wu M, Xu M, Li F, et al. One-hour upright posture is an ideal position for serum aldosterone concentration and plasma renin activity measuring on primary aldosteronism screening. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2012;120(7):388-94.
23. Lamarre-Cliche M, de Champlain J, Lacourcière Y, Poirier L, Karas M, Larochelle P. Effects of circadian rhythms, posture, and medication on renin-aldosterone interrelations in essential hypertensives. *Am J Hypertens*. 2005;18(1):56-64.
24. Dorrian CA, Toole BJ, Alvarez-Madrazo S, Kelly A, Connell JMC, Wallace AM. A screening procedure for primary aldosteronism based on the diasorin liaison automated chemiluminescent immunoassay for direct renin. *Ann Clin Biochem*. 2010;47(3):195-9.
25. Gruson D, Maisin D, Lison P, Maiter D, Persu A. Two-site automated chemiluminescent assay for measurement of immunoreactive renin. *Biomarkers*. 2011;16(7):605-9.
26. Deng L, Xiong Z, Li H, Lei X, Cheng L. Analytical validation and investigation on reference intervals of aldosterone and renin in Chinese Han population by using fully automated chemiluminescence immunoassays. *Clin Biochem*. 2018;56:89-94.
27. Kiaie N, Gorabi AM, Reiner Ž, Jamialahmadi T, Ruscica M, Sahebkar A. Effects of Statins on Renin-Angiotensin System. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2021;8(7).
28. Dokumentasjon ved Avdeling for medisinsk biokjemi, St. Olavs Hospital.
29. Newton-Cheh C, Guo C-Y, Gona P, Larson MG, Benjamin EJ, Wang TJ, et al. Clinical and Genetic Correlates of Aldosterone-to-Renin Ratio and Relations to Blood Pressure in a Community Sample. *Hypertension*. 2007;49(4):846-56.
30. Hannemann A, Friedrich N, Ludemann J, Volzke H, Rettig R, Peters J, et al. Reference intervals for aldosterone, renin, and the aldosterone-to-renin ratio in the population-based study of health in pomerania (SHIP-1). *Horm Metab Res*. 2010;42(6):392-9.
31. Baas SJ, Endert E, Fliers E, Prummel MF, Wiersinga WM. Establishment of reference values for endocrine tests. III: Primary aldosteronism. *Neth J Med*. 2003;61(2):37-43.
32. Arnold N, Hermanns IM, Schulz A, Hahad O, Schmitt VH, Panova-Noeva M, et al. Renin, aldosterone, the aldosterone-to-renin ratio, and incident hypertension among normotensive subjects from the general population. *Cardiovasc Res*. 2022.
33. Abd-Allah NM, Hassan FH, Esmat AY, Hammad SA. Age dependence of the levels of plasma norepinephrine, aldosterone, renin activity and urinary vanillylmandelic acid in normal and essential hypertensives. *Biol Res*. 2004;37(1):95-106.
34. Hermanns MI, Grossmann V, Mattheis S, Schnabel RB, Zeller T, Schulz A, et al. Reference intervals for aldosterone, renin, and the aldosterone-to-renin ratio in the population-results from the gutenber health study. *Clin Chem Lab Med*. 2015;1:1176.

