

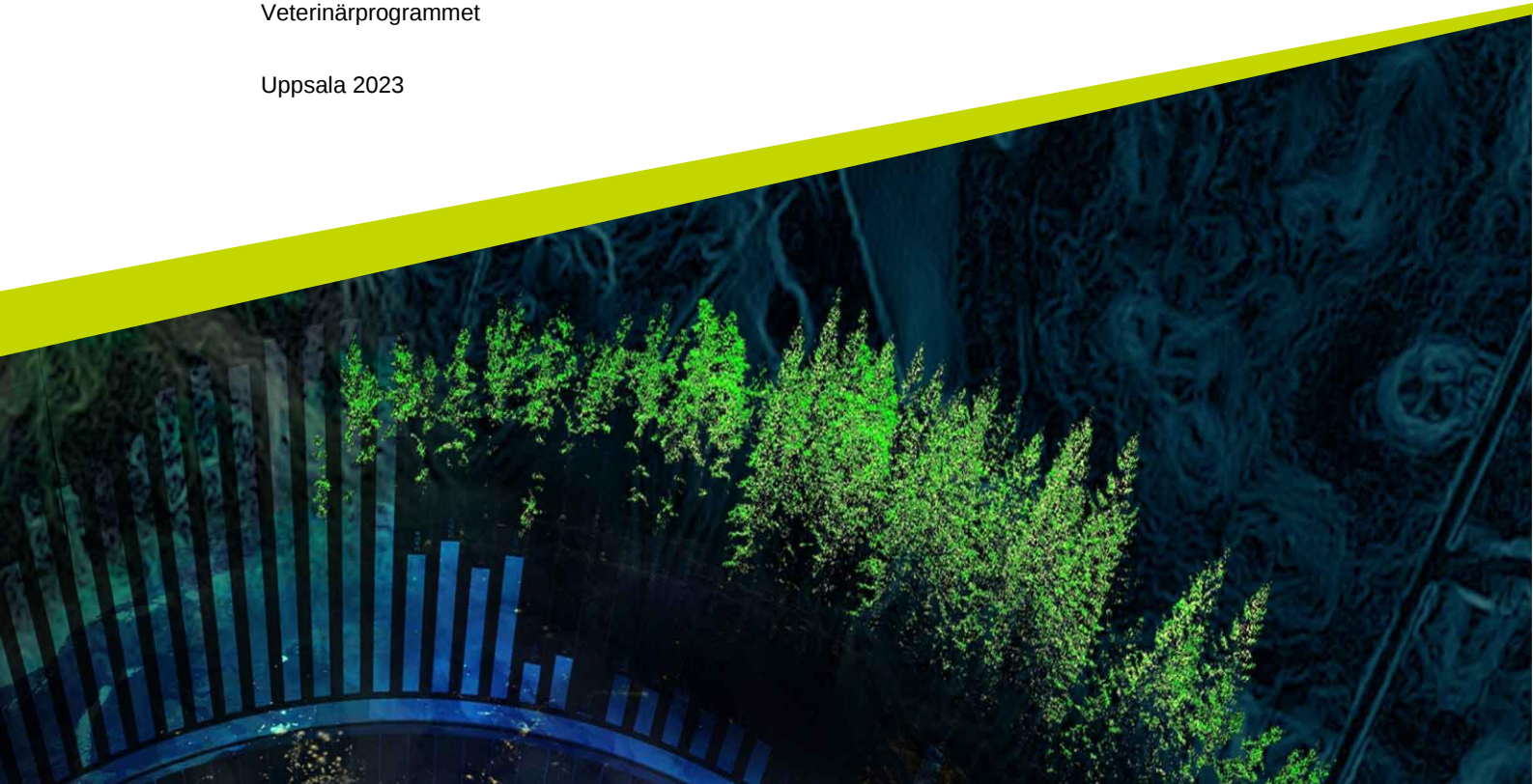


Cystatin C i urin som markör för akut njurskada hos hundar

Sanna Isaksson

Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet

Uppsala 2023



Cystatin C i urin som markör för akut njurskada hos hundar

Cystatin C in urine as a marker for acute kidney injury in dogs

Sanna Isaksson

Handledare: Inger Lilliehöök, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper

Bitr. handledare: Lena Pelander, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Anna Svensson, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX1003

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Kursansvarig inst.: Institutionen för kliniska vetenskaper

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2023

Nyckelord: Cystatin C, AKI, hund, tubuliskada, urinmarkör

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Veterinärprogrammet

Sammanfattning

Cystatin C är ett protein och en proteinasinhäbitor med låg molekylärvikt (13kDa) som är involverat i intracellulär proteinkatabolism och produceras med konstant hastighet. Urin-cystatin C (uCysC) hos en frisk hund resorberas fullständigt i proximala tubuli och finns normalt i mycket små, ej mätbara mängder i urinen. Ökad koncentration av uCysC har setts hos hundar med experimentella toxiska njurtubuliskador.

Syftet med studien var att undersöka om cystatin C i urin kan vara en presumtiv markör för njurskada hos hundar med olika typer av allvarliga sjukdomstillstånd. Urinprover samlades in från 46 hundar som uppsökte vård på SLU Universitetsdjursjukhus akutmottagning, hundarna hade nedsatt AT och var i behov av vätskebehandling. Urinproverna analyserades för uCysC, urinprotein och u-kreatinin. Data från journaler och urinproverna sammanställdes och statistisk analys genomfördes.

Hos de 46 provtagna hundarna hade 11 (24 %) förhöjt cystatin C i urinen. Av de 11 hundarna med förhöjt uCysC (grupp A) hade fem hundar olika former av akutisering av kronisk njursjukdom (ACKD), och sex hundar hade systemisk inflammatorisk sjukdom eller var ormbitna (*Vipera berus*). De resterande 35 hundarna hade uCysC nivåer under mätområdet (grupp B). Urinprotein-/u-kreatinin-kvot (UPC) och serum-kreatinin (sCr) var signifikant förhöjt i grupp A jämfört med grupp B. Hundarna i grupp A var signifikant mer cirkulatoriskt påverkade, samt hade signifikant mer påverkat allmäntillstånd jämfört med grupp B.

I studien var det ett antal hundar med systemisk inflammation eller ormbett som hade förhöjt uCysC i kombination med förhöjd urinprotein/u-kreatinin-kvot, vilket kan tala för sekundär njurskada hos dessa patienter. Ökning av cystatin C i urin kunde även observeras hos hundar med akutisering av kronisk njursjukdom. Cystatin C i urin har potential som markör för akut njurskada på hund men mer forskning med större studiepopulationer behövs för att kunna dra slutsatser om den kliniska användbarheten för denna urinmarkör och om den möjliggör tidigare upptäckt av akut njurskada hos hundar.

Nyckelord: Cystatin C, AKI, hund, tubuliskada, urinmarkör

Abstract

Cystatin C is a protein and a proteinase inhibitor with low molecular weight (13 kDa) that is involved in intracellular protein catabolism and is produced at a constant rate in all cells in the body. Concentrations of cystatin C (uCysC) in a healthy dog is reabsorbed in the proximal renal tubuli and exist in very small/unmeasurable amounts in urine. An increase in the concentration of uCysC has been shown in dogs with experimental toxic kidney tubuli damage.

The objective of this study was to investigate if cystatin C can be a presumptive marker for kidney injury in dogs with different types of serious medical conditions. Urine samples was collected from 46 dogs that were seen in the emergency room at SLU University Animal Hospital. The urine was analyzed for uCysC, u-protein and u-creatinine. Data from the dog's medical records and the urine analysis where compiled and statistical analysis was performed.

Eleven dogs (24%) had elevated uCysC concentrations when urine samples from 46 dogs where analyzed. Five out of the 11 dogs with elevated uCysC (group A) concentrations were diagnosed with acute on chronic kidney disease (ACKD), and six dogs had systemic inflammation or snake bite toxicity (*Vipera berus*). The remaining 35 dogs had concentrations of uCysC below measurable concentrations (group B). The urine protein-/u-creatinine-ratio (UPC) and serum-creatinine (sCr) was significantly elevated in group A when compared to group B. Group A had significantly more affected general condition and was significantly more circulatory affected compared to group B.

There were some dogs in the study with systemic inflammation or snake bite toxicity that had increased concentrations uCysC in combination with an increased urine protein-/u-creatinine-ratio, this can indicate secondary kidney injury within these group of dogs. Urin-cystatin C was also elevated in dogs with acute on chronic kidney disease. Cystatin C is showing potential as a marker for acute kidney damage in dogs, but more research needs to be done on a larger study population to be able to draw conclusions about the clinical relevance of the marker in urine and if it makes it possible to detect kidney injury at an earlier stage in dogs.

Keywords: Cystatine C, AKI, tubule damage, urine marker

Innehållsförteckning

Tabellförteckning	8
Figurförteckning	9
Förkortningar	10
1. Inledning	11
1.1 Syfte och frågeställning	12
2. Litteraturoversikt.....	13
2.1 Akut njurskada hos hund	13
2.2 Diagnostiska markörer vid akut njurskada.....	14
2.2.1 Glomerulär filtrationshastighet	14
2.3 Cystatin C.....	15
2.3.1 Cystatin C i serum	15
2.3.2 Cystatin C i urin	17
2.4 Andra urinmarkörer i diagnostik av AKI	19
3. Material och metod	20
3.1 Studiepopulation och insamling av material	20
3.2 Hantering och analys av urinprov	21
3.3 Statistisk analys	22
4. Resultat	23
5. Diskussion	29
6. Slutsats	33
Referenser.....	34
Populärvetenskaplig sammanfattning	38
Tack	40

Tabellförteckning

Tabell 1. Studiepopulationen.....	27
Tabell 2. Analysresultat.....	28

Figurförteckning

Figur 1. Cystatin C-resultat	23
Figur 2. UPC-resultat.....	25
Figur 3. S-kreatinin-resultat	26

Förkortningar

AT	Allmäntillstånd
ACKD	Acute on Chronic Kidney Injury
AKI	Acute Kidney Injury
AUC	Arean under kurvan
CKD	Chronic Kidney Injury
Cr	Kreatinin
CRP	C-reaktivt protein
CysC	cystatin C
EVF	Erytrocyt volymfraktion
GFR	Glomerulär filtrationshastighet
IL	Interleukin
IRIS	International renal interest society
IVA	Intensivvårdsavdelning
KIM-1	kidney injury marker-1
sCr	Serum kreatinin
sCysC	Serum-cystatin C
SDMA	Symmetriskt dimetylarginin
SLU	Sveriges lantbruksuniversitet
uAlb	Urin-albumin
uCysC	Urin-cystatin C
UDS	Universitetsdjursjukhuset
uL-FABP	u-Liver-type fatty acid binding protein
uNAG	urin-N-acetyl- β -D-glucosaminidase
uNGAL	urin-neutrophil gelatinase associated lipocalin
UPC	Urinprotein-/u-kreatinin-kvot

1. Inledning

Njurarna spelar en viktig roll bland annat för upprätthållandet av den osmotiska balansen i kroppen, de resorberar och utsöndrar ämnen, är involverade i blodbildningen och bildar urin (Sjaastad *et al.* 2016). Den vanligaste orsaken till akut njurskada (AKI) sett i studier är ischemi, nefrotoxisk exponering och infektion (Rimer *et al.* 2022).

Historiskt sett har det varit svårt att hitta njurskada i ett tidigt skede då njuren har en stor reservkapacitet vilket ofta leder till att symtom tillsammans med förändringar i blodbilden upptäcks först när kroniska skador hunnit uppstå. De markörer som finns och används dagligen för att detektera njurskada anses ha för låg sensitivitet för att påvisa nedsatt njurfunktion i ett tidigt skede (Ghys *et al.* 2014). Det finns därför ett behov att hitta markörer som kan leda till tidigare upptäckt av AKI. Njurcortex tar emot 90 % av det renala blodflödet vilket gör detta område i njuren extra känsligt för toxiner från blodet (Lunn 2011). Cellerna i proximala tubuli och ascenderande Henles slynga är minst motståndskraftiga mot ischemiska skador på grund av den höga metaboliska aktiviteten i dessa celler (Lunn 2011). Detta gör lågmolekylärproteiner och tubulära proteiner, inklusive cystatin C (CysC) som normalt ska resorberas i tubuli, till lovande diagnostiska markörer för AKI (De Loor *et al.* 2013).

Cystatin C är ett protein som produceras i alla celler i kroppen, filtreras fritt genom glomeruli, resorberas och bryts ner i proximala tubuli (Grubb 2001; Kaseda *et al.* 2007; Tenstad *et al.* 2009). Det finns ett flertal studier som visar att urin-CysC (uCysC) är användbart i diagnostik av AKI hos hund (Sasaki *et al.* 2014; Gu *et al.* 2018). I studier när njursjuka hundar och hundar med andra sjukdomstillstånd utan primär njursjukdom ingått har det observerats att uCysC inte bara ökar vid kronisk njursjukdom (CKD) och AKI men även vid andra sjukdomstillstånd där njurarna inte primärt är inblandade i etiologin (Monti *et al.* 2012).

1.1 Syfte och frågeställning

Syftet med studien är att undersöka om cystatin C i urin kan vara en presumtiv markör för njurskada hos hundar med olika typer av allvarliga sjukdomstillstånd.

2. Litteraturöversikt

2.1 Akut njurskada hos hund

Akut njurskada (Acute kidney injury, AKI) definieras av en abrupt minskning av renal funktion som karaktäriseras av förhöjda serum-kreatinin (sCr) nivåer, akut uremi och förändringar i urinvolymen (Legatti *et al.* 2018). De vanligaste orsakerna till AKI är hemodynamiska förändringar, infektioner/inflammation, exponering för nefrotoxiner och obstruktion av urinvägarna, för att nämna några (Legatti *et al.* 2018, Rimer *et al.* 2022, Vaden *et al.* 1997). Sjukhusförvärvad AKI anses vara en vanlig anledning till AKI inom humanmedicinen och en liknande trend kan ses inom veterinärmedicinen (Rimer *et al.* 2022).

Etiologi till AKI hos hund finns väl beskriven i flera studier. I en retrospektiv studie där 99 hundar med akut njursjukdom ingick, var det möjligt att identifiera orsak till njursjukdom hos 77 hundar (Vaden *et al.* 1997). Isolerade ischemiska event var den vanligaste bakomliggande orsaken till njursjukdom, följt av nefrotoxisk exponering, multipla åkommor och andra njuråkommor. Vanligaste orsaken till ischemi var pankreatit följt av etylenglykolförgiftning, disseminerad intravaskulär koagulation (DIC), hypovolemisk/hypotensiv chock, leversvikt och slutligen minskad hjärtminutvolym. Majoriteten av hundarna i studien dog eller blev avlivade under behandlingstiden, av de som återstod utvecklade 24st (31 %) kronisk njursjukdom (CKD)(Vaden *et al.* 1997). Ormgift från huggorm (*V. berus*) är ett känt nefrotoxin och Harjen *et al.* (2021) undersökte 35 hundar med ormbett från *V. berus*, resultaten visade på en mild, övergående, icke-azotemisk AKI.

Efter AKI kan njurarna läka och återgå till normal funktion eller övergå i kronisk njursjukdom med ett stabilt allmäntillstånd (Rimer *et al.* 2022). Akutisering av CKD (acute on chronic kidney disease, ACKD) definieras av en akut minskning av njurfunktion hos ett djur med CKD och kan ha samma etiologi som AKI (Dunaevich *et al.* 2020). I en retrospektiv studie inkluderades 100 hundar med diagnosen ACKD och orsaken till akutiseringen kunde fastställas för 55 % av hundarna. Inflammatoriska sjukdomar sågs ligga bakom ACKD hos 30 % av hundarna och pankreatit var en vanlig inflammatorisk orsak till ACKD i denna

studie (Dunaevich *et al.* 2020) likväl som i studien av Vaden *et al.* (1997) där orsaker till AKI undersöktes.

Inom humanmedicinen har det observerats att ischemiska skador i njurarna som leder till AKI beror på generell eller lokal påverkan i syre- och näringstillförsel till njurens celler och transport av restprodukter från cellerna (Bonventre & Yang 2011). Det sker en obalans i behov och tillgång i njurens vävnad samtidigt som restprodukter ackumuleras. Obalansen leder till att tubuliceller skadas och om skadan är omfattande går cellerna i apoptos och nekros som i sin tur påverkar organfunktionen negativt. Vatten och elektrolytbalansen rubbas vilket leder till minskad exkretion av restprodukter via njurarna (Bonventre & Yang 2011).

2.2 Diagnostiska markörer vid akut njurskada

När det finns klinisk misstanke om AKI hos en hund är det vanligt att blodprover tas för analys av sCr, fosfat, urea, elektrolyter samt hematologi (Grauer 2005). På senare år har intresset för biomarkörer i urinen ökat då GFR-markörer som sCr och urea saknar önskad sensitivitet för tidig upptäckt av njurskada (De Loor *et al.* 2013; Ghys *et al.* 2014).

Urinmarkörerna kan delas in i olika kategorier beroende på vilken njurkomponent som är skadad/brister i funktion, vilket resulterar i höjning eller sänkning av dem i urinen. Vissa markörer som albumin och immunoglobuliner stiger i urin vid skada i glomeruli. Skadade tubuliceller kan orsaka ökad frisättning av vissa enzym och bristande funktion i tubuliceller kan leda till minskat upptag av ämnen som uCysC (De Loor *et al.* 2013). Se mer under punkt 2.4.

2.2.1 Glomerulär filtrationshastighet

Glomerulär filtrationshastighet (GFR) är produkten av genomsnittliga filtrationshastigheten i ett nefron, multiplicerat med antalet nefron i båda njurarna (Stevens *et al.* 2010). Glomerulär filtrationshastighet anses vara ”gold standard” för att utvärdera njurfunktion (Ghys *et al.* 2014). Direkt mått på GFR är tidskrävande och används därför inte rutinmässigt i klinisk miljö, i stället används indirekta markörer, vanligen sCr och urea. Serum-Cr och urea har dock för låg sensitivitet för att upptäcka tidig renal dysfunktion då stora delar av njurarna behöver svikta innan indirekta markörer ökar i blodet (Ghys *et al.* 2014).

En ideal GFR-markör bör flöda fritt in i glomerulus via afferenta arteriolen och filtreras genom det glomerulära kapillärendotelet, basement-membran och podocyterna in i bowmans kapsels fria rum (Von Hendy-Willson & Pressler 2011).

Markören bör sedan passera genom tubuli utan resorption eller sekretion ut i urinen. Det är inte alla markörer som passerar in i glomerulus som sedan filtreras ut i urinen vid varje passering genom kapillärbädden, vissa markörer passerar för att sedan utgå via efferenta arteriolen och filtreras genom ett flertal passager genom njuren. GFR kan mätas genom plasma clearance eller renal clearance. Plasma clearance bestäms genom hastigheten en markör inte längre är mätbar i blodet. Renal clearance bestäms genom hastigheten en markör blir mätbar i urinen (Von Hendy-Willson & Pressler 2011). Kreatinin och urea, som rutinmässigt används som GFR-markörer, har några av dessa egenskaper men inte alla (Ferguson & Waikar 2012).

2.3 Cystatin C

Cystatin C är ett protein och en proteinasinhäbitor med låg molekylärvikt (13kDa) som är involverat i intracellulär proteinkatabolism och produceras med konstant hastighet då ämnets produktion styrs av en så kallad "housekeeping gene" (Abrahamson *et al.* 1990). Proteinet ansvarar för basala funktioner i cellen och CysC finns fritt i plasma och filtreras därför i glomeruli utan restriktioner (Tenstad *et al.* 2009), för att sedan resorberas i proximala tubuli via endocytos medierat av megalin, efter detta kataboliseras CysC fullständigt i proximala tubuliceller (Kaseda *et al.* 2007).

2.3.1 Cystatin C i serum

Serum-cystatin C (sCysC) har utvärderats både som markör för AKI och CKD. Vid jämförelser med sCr har studierna har gett olika resultat.

I en studie på hundar med AKI observerades förhöjda nivåer sCysC tidigare i ett sjukdomsförlopp jämfört med sCr (Paes-Leme *et al.* 2021). I studien ingick 28 hundar inskrivna på IVA. Resultaten visar att sCysC var en känsligare markör för AKI än sCr som under studiens gång låg inom de normala gränsvärdena för fler hundar än vad det gjorde gällande sCysC. Serum-CysC kunde detektera 78,6 % hundar med AKI jämfört med 67,9 % enligt IRIS kriterier där bland annat kreatinin används som markör för AKI. Genom att börja mäta sCysC vid inskrivning till IVA kan AKI upptäckas i tidigare stadier jämför med IRIS kriterier (Paes-Leme *et al.* 2021).

En annan studie på hund visade att sCysC korrelerar bättre med GFR än sCr vid exogena clearance-tester genomförda på hundar med renal och icke-renal sjukdom (neoplasi, CKD, infektion, endokrinopati och klaffinsufficiens) (Wehner *et al.* 2008). Femtiosex hundar ingick i studien och 24 av dessa hade CKD. Studien visade att bland annat att sCysC har en högre sensitivitet för att upptäcka en

minskad kreatinin-clearance vid jämförelse med sCr (Wehner *et al.* 2008).

Även Almy *et al.* (2002) utvärderade sCysC som en GFR-markör i en studie där 25 friska hundar och 25 hundar med kronisk njursjukdom ingick. Resultaten jämfördes med två tidigare studier, där GFR faststälts genom exogen kreatininclearance hos 20 hundar med nedsatt njurfunktion och 10 hundar där uttorkning framkallats medicinskt ("Volume depleted dogs") (Finco *et al.* 1991). Medelkoncentrationen av sCysC var signifikant högre hos hundarna med kronisk njursjukdom (Almy *et al.* 2002). Två veckor in i utvärderingen av GFR hos hundar med nedsatt njurfunktion korrelerade sCysC bättre med GFR än sCr. Vid 10 veckor korrelerade sCysC och sCr likvärdigt med GFR. Hos de dehydrerade hundarna korrelerade sCysC inte lika bra med GFR jämfört med sCr. Serum-CysC-koncentrationen hos de dehydrerade hundarna föll även inom referensintervall baserat på de 25 friska hundarna. Almy *et al.* (2002) drog slutsatsen att sCysC är användbar som endogen markör för GFR hos hundar med kronisk njursjukdom.

I en annan studie där sCysC och symmetriskt dimetylarginin (SDMA) jämfördes med sCr som endogena GFR-markörer hos hundar med CKD. I studien ingick 97 hundar; 67 med CKD-diagnos (eller stark misstanke om CKD) samt 30 friska hundar (Pelander *et al.* 2019). Studien visade på att sCysC var underlägsen sCr då arean under kurvan (AUC) för sCr översteg 0,93 för båda GFR-värdena som testades och AUC för sCysC var som högst 0,87. Symmetrisk dimetylarginin hade likande AUC som sCr. I studien kunde det även observeras en signifikant ökning av sCysC vid ökande ålder (Pelander *et al.* 2019).

Serum-CysC har även utvärderats som en endogen GFR-markör hos hundar som väger <20 kg (Miyagawa *et al.* 2020). I studien där 56 hundar med CKD, sju med misstänkt CKD och 39 friska hundar ingick undersöktes både små och stora hundar med syfte att utvärdera sCysC som GFR-markör. Både sCr- och sCysC-koncentrationer korrelerade med kroppsvikt när friska hundar <20 kg och >20 kg jämfördes och friska hundar som vägde <20kg hade signifikant lägre sCr och sCysC-koncentrationer jämfört med hundar som vägde >20kg. Hos sjuka hundar som vägde <20kg hade sCysC högre sensitivitet och specificitet (100 % respektive 100 %) än sCr (76 % respektive 92,9 %) för GFR <1,8 ml/min/kg. Serum-CysC var däremot inte överlägsen sCr vid minskad GFR hos sjuka hundar som vägde >20kg. Författarna använde olika referensintervall för hundar >20 kg och hundar <20 kg baserat på friska populationens sCr och sCysC resultat och menar att definierade "cut off"-värden/referensvärden behöver tas fram för olika vikter och raser för att kunna använda resultaten i denna studie vid utvärdering av njurfunktion (Miyagawa *et al.* 2020).

Inom humanmedicinen anses serum-cystatin C (sCysC) vara överlägsen serum-kreatinin (sCr) för detektion av renal dysfunktion (Grubb 2001). Serum-CysC som markör har även en låg intraindividuell variabilitet och saknar extrarenal clearance, dessa egenskaper samlade gör sCysC till en lämplig endogen GFR-markör (Abrahamson *et al.* 1990; Grubb 2001; Tenstad *et al.* 2009). Inom humanmedicin används ekvationer framtagna för patienter med CKD för att uppskatta GFR, ekvationerna är baserade antingen på sCr eller sCysC (Tidman *et al.* 2008). Ekvationer baserade på sCysC har visat sig vara mer exakta i sin uppskattning av GFR än de baserade på sCr. Bäst uppskattning av GFR har kunnat uppnås när uppskattningen görs genom ekvationer som inkluderar både sCr och sCysC, särskilt om patienten befinner sig i tidigt stadiet av nedsatt njurfunktion (Tidman *et al.* 2008). Även Grubb (2001) har dragit samma slutsats i sin review att kombinationen av sCysC och sCr ger bästa möjliga informationen om GFR när mer invasiva, korrekta och mer kostsamma metoder inte är möjliga att genomföra.

2.3.2 Cystatin C i urin

I studier gjorda på råttor har det observerats att CysC filtreras fritt genom glomeruli, resorberas och kataboliseras i tubuliepitelceller (Tenstad *et al.* 2009). Vid normal renal funktion ses uCysC enbart i mycket små mängder i urinen hos människa (Löfberg & Grubb 1979) och vid proximal tubuliskada observerades en ökning av uCysC (Uchida & Gotoh 2002; Conti *et al.* 2009). Studier inom humanmedicinen visar att uCysC var högre hos patienter med renal tubuliskada jämfört med patienter med proteinuri utan tubuliskada och friska kontroller (Uchida & Gotoh 2002). Proximal tubulär dysfunktion resulterar i minskad resorption av proteiner med låg molekylär vikt och en ökning av CysC ses i urinen vilket gör uCysC till en känslig markör för att upptäcka sjukdomsprocesser som påverkar proximala tubuli (Abrahamson *et al.* 1986; Grubb 2001). Vid tolkning av uCysC behöver värdet jämföras med proteinuri då det observerats att massiv proteinuri inhiberar tubulär resorption av CysC när man inducerat nefropatier hos råttor (Thielemans *et al.* 1994).

Precis som observerast hos människa är uCysC mycket lågt i urinen hos friska hundar (Damm 2020). Vid experimentell njurtubuliskada observeras en ökning av uCysC (Sasaki *et al.* 2014; Gu *et al.* 2018). Gentamicin (40mg/kg/dag), som är nefrotoxiskt, gavs till fyra hundar under sju dagar (Sasaki *et al.* 2014). Hundarna följdes med GFR-mätning och analys av 14 urinmarkörer. Vid histopatologisk undersökning som genomfördes under dag åtta i studien kunde degeneration och nekros av proximala tubuliepitelceller ses. Urin-CysC började stiga dag fyra och var kraftigt förhöjd dag åtta vid avlivning. Även andra urinmarkörer som indikerar tubuliskada som glukos och kidney injury marker-1 (KIM-1) var förhöjda vid provtagningen dag åtta (Sasaki *et al.* 2014).

I en annan studie användes Tenofovir för att inducera tubuliskada hos hundar (Gu *et al.* 2018). Syftet var att utvärdera ett flertal urinbiomarkörer för njurskada inklusive uCysC. Fyra beaglar fick läkemedlet och behandlades under 10 dagar innan de avlivades och obducerades på dag 11. Serum och urin samlades in innan första dosering samt vid studiedag fyra, åtta och 11. Doseringsmängd av tenofovir syftade att orsaka minsta möjliga tubuliskada för att efterlikna tidigt skede av AKI och var baserat på tidigare studier. Tre av hundarna som fick läkemedlet uppvisade förhöjda uCysC-nivåer dag fyra i studien, alla fyra uppvisade förhöjda nivåer av uCysC vid dag åtta och 11. En av kontrollerna hade även en ökning av uCysC som ej kunde förklaras. Urea (BUN) ökade mer än 1,5 gånger hos två av hundarna och sCr ökade 1,5 gånger hos alla behandlade hundar vid dag fyra samt två gånger ökat vid dag 11 (Gu *et al.* 2018).

Monti *et al.* (2012) utvärderade en analysmetod för uCysC samt undersökte om uCysC/Cr var förhöjd hos hundar med kronisk njursjukdom jämfört med hundar med icke-renala sjukdomar. I studien ingick 14 hundar som klassades som friska, 17 hundar som diagnostiserats med varierande sjukdomar (malign neoplasi och inflammationssjukdomar) samt 15 hundar med njursjukdom, där 13 hade kronisk njursjukdom och två akut njursjukdom. Hundar med njursjukdom hade förhöjd uCysC (2,05–10,42 mg/L). Det fanns ingen signifikant skillnad i distribution av uCysC och uCysC/Cr vare sig mellan kön eller ålder. Däremot sågs en statistiskt signifikant ökning av serum-cystatin C vid ökande ålder. Urin-CysC/Cr-kvoten skilde sig statistiskt mellan friska hundar och hundar med ickerenal sjukdom ($p=0,004$), men dessa hundar med ickerenal sjukdom uppvisade små stegringar (0,02-0,2mg/L)(Monti *et al.* 2012).

2.4 Andra urinmarkörer i diagnostik av AKI

Heiene *et al.* (2001) undersökte 55 hundar med pyometra för att utvärdera njurförändringar som kan uppstå sekundärt till pyometra. Hos 53 av hundarna togs njurbiopsier under operation och olika grader av njurtubuliförändringar sågs i alla njurbiopsier som gick att bedöma. Höga nivåer av alkaliskt fosfatas i urin (uALP) och gamma-glutamyltransferas i urin (uGGT) associerades med svåra histopatologiska lesioner i proximala tubuliceller (Heiene *et al.* 2001).

Det finns många urinmarkörer för att påvisa akut njurskada hos hund, men få av dem finns tillgängliga för klinisk djursjukvård. Vid akut njurskada stiger bland annat kidney injury marker-1 (KIM-1) och inflammationsmarkörerna urin-neutrophil gelatinase associated lipocalin (uNGAL) och interleukin 2 och 8 (IL-2, IL-8) i urinen. Det finns även molekyler (proteiner med hög och intermediär molekylvikt) som normalt sett inte passerar glomeruli som kan ses i urinen vid akut glomeruliskada (De Loor *et al.* 2013).

Vid gentamicininducerad njurtubuliskada hos hund sågs utöver stegring av uCysC även ökade nivåer av u-albumin (u-Alb), uNGAL och u-Liver-type fatty acid binding protein (uL-FABP) (Sasaki *et al.* 2014). Urin-L-FABP och uNGAL ökade vid dag fyra men det var ingen signifikant ökning, uAlb och urin-N-acetyl- β -D-glucosaminidase (uNAG) ökade vid dag fyra, medan ingen förändring sågs i KIM-1 (Sasaki *et al.* 2014).

När njurskada hos hund framkallades med Tenofovir sågs kraftigt förhöjda nivåer av NGAL, albumin, clusterin, uCysC och totalprotein i urinen från dag fyra i studien (Gu *et al.* 2018). NAG analyserades även i studien men ökade bara marginellt i urinen hos tre av fyra hundar, samt hos en kontroll (Gu *et al.* 2018).

Urinbiomarkörer kvotas ofta med uCr för att korrigera för urinens koncentration, kvotning med uCr kan leda till över- eller underskattning beroende på hur omfattande utsöndringshastigheten av en specifik markör är samt beroende på det kliniska sammanhanget (Conti *et al.* 2009; Waikar *et al.* 2010).

3. Material och metod

3.1 Studiepopulation och insamling av material

Urinprov samlades in från hundar >6 månaders ålder som inkom på Universitetsdjursjukhusets (UDS) akutmottagning, intensivvårdsavdelningen (IVA) samt vårdavdelning för smådjur vid Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) mellan perioden 13/6–31/10 2022. Hundar som skrevs in för vätskebehandling med nedsatt allmäntillstånd och cirkulatorisk påverkan rekryterades till studien. Majoriteten av hundarna som rekryterades triagerades med gul triagefärg vid ankomst vilket innebär att patienten behöver gå före andra patienter men att omedelbart insättande av behandlingsåtgärder inte behövs för tillfället. Målsättning var att samla urinprov spontant eller via cystocentes innan vätsketerapi startades, urinproverna samlades så nära inskrivning som möjligt för att undvika utspädnings effekter från vätsketerapi intravenöst.

Studien hade etiskt godkännande för urinprovsinsamling (Dnr 5.8.18-15533/2018). Djurägarmedgivande för insamling av prov samt användande av journaluppgifter till studien skrevs under vid inskrivning och djurägare skrev även under en blankett för GDPR. I några fall kontaktades djurägare för ett muntligt/skriftligt medgivande efter inskrivning. I några fall användes UDS blankett vid inskrivning som medgivande för att använda samlad urin till studien.

Urinprover som samlades spontant antingen med en uripet (Rocket® URIPET™ Pet Urine Collection, Storbritannien) eller med en slev i rostfritt stål. I de fall där patienten skulle genomgå ultraljudsundersökning och urinprovstagning via cystocentes användes överbliven urin för analys. Ett av de deltagande djuren avlivades innan urinprovsinsamling kunde genomföras spontant, därför samlades urinprovet genom ett försiktigt tryck på urinblåsan inom 15 minuter efter avlivning.

Djurens journaler granskades för insamling av data från blodprovsanalyser, diagnos och eventuella bestående skador efter det akuta sjukdomsförloppet. Blodproverna var oftast analyserade vid klinisk kemiska laboratoriet, men i några fall analyserades de av UDS jourlaboratorium eller hos remitterande veterinär. De analyser som presenteras i studien är sCr, hematokrit i form av erytrocytvolymsfraktion (EVF), och c-reaktivt protein (CRP). Vid bedömning om patologisk förändring föreligger har referensintervallet för respektive metod använts. Det noterades om djuret tillfrisknat och gått hem (Hemgång) eller avlivats (Avlivad). Det noterades även om de ådragit sig ”kroniska förändringar” om de kommit för återbesök eller om det framgick i journalen att tillståndet var av kronisk karaktär. Alla hundar som deltog tillfrisknade eller avlivades medicinskt, ingen av hundarna i studien självdog under studiens gång.

Tidpunkt för insamlande av urinprov noterades samt hur länge djuret fått vätsketerapi, allmäntillstånd (AT) och uttorkningsgrad (0–10 %) vid ankomst, samt AT och uttorkningsgrad vid urinprovssamling. Allmäntillstånd fick olika poäng där AT: ua=0, AT: lindrigt dämpad=1, AT: dämpad=2, AT: måttligt dämpad=3, AT: kraftigt dämpad= 4. Om uppgiften ”uttorkningsgrad” i % saknades i journalen gjordes en uppskattning utifrån information i journal där ”slemhinnor rosa och fuktiga” och/eller hudturgor ua bedömdes som dehydreringsgrad 0 %, lindrigt dehydrerad och/eller lindrigt klubbiga slemhinnor bedömdes som dehydreringsgrad 3 %, klubbiga slemhinnor och/eller lindrigt kvarstående hudturgor bedömdes som dehydreringsgrad 5–8 % och måttligt-kraftigt dehydrerad och/eller kvarstående hudturgor bedömdes som dehydreringsgrad 10 %.

Studiepopulationen delades in i grupperna A och B, där grupp A är hundarna med förhöjt uCysC (>0,1 mg/L) och grupp B är hundarna med uCysC under mätområdet (<0,1 mg/L). Grupp A delades även in undergrupperna A1 och A2 beroende på om det fanns tecken på underliggande CKD eller inte. Grupp A1 är hundarna med misstänkt ACKD och grupp A2 är hundarna med förhöjda koncentrationer uCysC utan tecken på primär njursjukdom.

3.2 Hantering och analys av urinprov

Urinprov som samlats spontant eller via cystocentes lämnades in i direkt anslutning till samlandet till klinisk kemiska laboratoriet vid SLU för analys av urin-cystatin C (uCysC), urin-kreatinin (uCr), urinprotein (uPr) samt urinprotein/u-kreatininkvot (UPC). Urinproverna centrifugerades och prov från supernatanten användes för analys. Ett automatiserat biokemiinstrument, Beckman Coulter DxC 700AU (Beckman Coulter, Brea Kalifornien, USA) användes för analys av uCysC, uCr, urinprotein, uGGT och uALP. Reagens från Beckman-Coulter användes för alla

analyser utom för uCysC. För uCysC användes reagens från Gentian Diagnostics (Moss, Norge). Alla prover som kom till lab analyserades inom tre timmar.

I de fall där uCysC > 0,2 mg/L analyserades koncentrationen av γ -glutamyltransferas (GGT) och alkalisk fosfatas (ALP) med metoder för GGT och ALP i serum enligt metod ovan. Värden på uGGT > 1 ukat/L och uALP > 0,2 ukat/L tolkades som förhöjda.

3.3 Statistisk analys

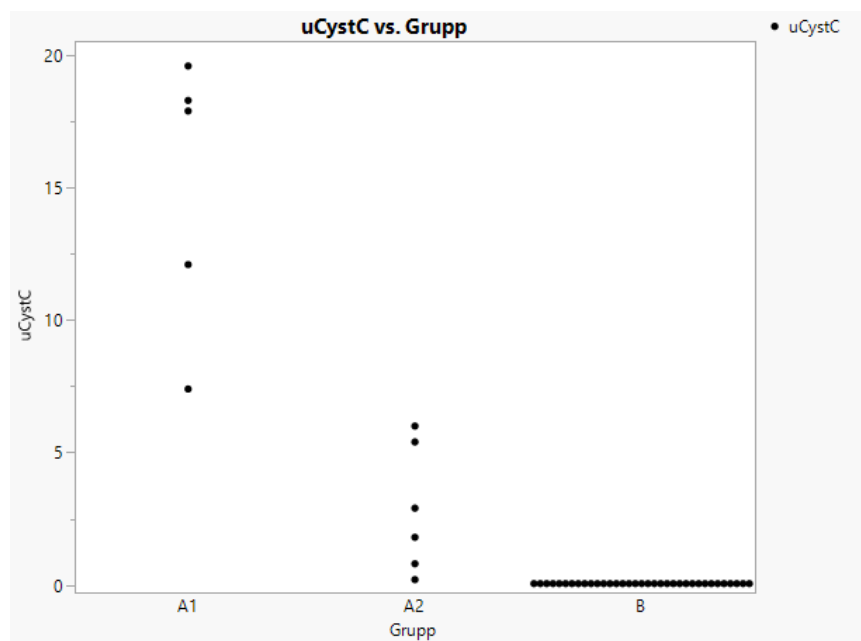
Insamlad data sammanställdes. Övriga laboratoriefynd, diagnos och kliniskt utfall sammanställdes och därefter delades hundarna in i två grupper utifrån uCysC-resultat, hundar med förhöjt uCysC > 0,1 mg/L (grupp A) samt hundar med uCysC < 0,1 mg/L (grupp B). Hundarna med förhöjd uCysC granskades och delades in i 2 grupper utifrån typ av sjukdom, hundar med tecken ACKD och hundar utan tecken på ACKD (grupp A1 respektive A2).

Microsoft Excel användes för att ta fram värden för median. För statistiska analyser användes JMP pro 15 (SAS Institute Inc). Wilcoxon rangsummetest (Mann-Whitney's test) användes för att jämföra resultaten för grupp A och B. P-värden < 0,05 bedömdes som statistiskt signifikanta.

4. Resultat

I studien ingick 46 hundar med nedsatt AT i behov av stationärvård och vätsketerapi (Tabell 1). Alla hundarna utom en kom till Universitetsdjursjukhusets akut-mottagning för smådjur mellan 13/6–31/10 2022. En av hundarna kom på en polikliniklista men visade sig vara en akutpatient och inkluderades därför i studien.

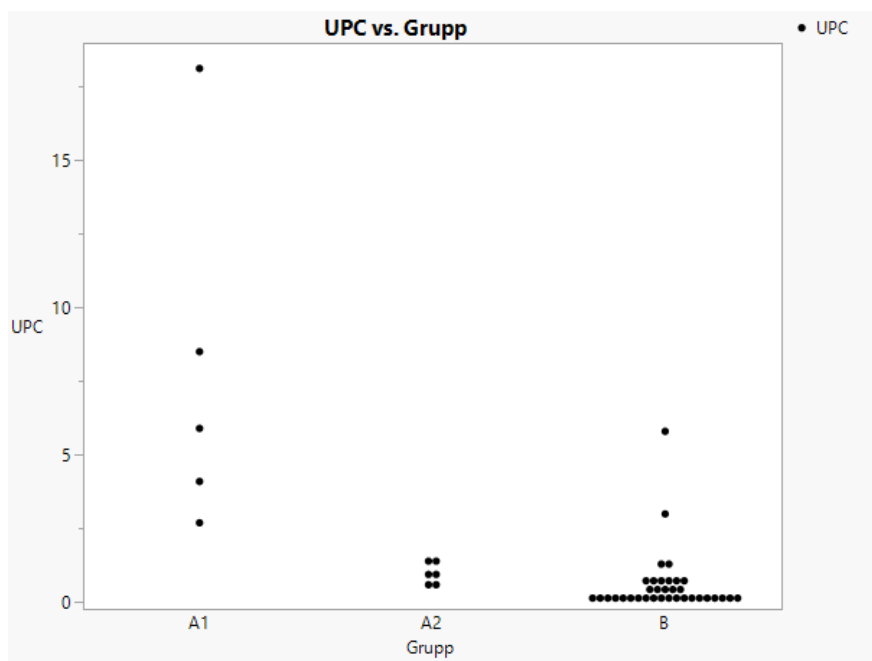
Elva (24 %) av de 46 hundarna hade förhöjda cystatin C nivåer i urinen (grupp A) (tabell 2, Figur 1). Fem (45 %) av dessa 11 hundar hade akutisering av kronisk njursjukdom (ACKD), 55 % av hundarna hade sjukdomar utan tecken på underliggande njursjukdom. Resterande 35 (76 %) hundar som ingick i studien hade cystatin C-koncentrationer under mätområdet (0,1 mg/L) och varierande diagnoser (Tabell 1). Grupp A med förhöjt uCysC ($>0,1$ mg/L) delades in i A1 och A2 utifrån den kliniska sjukdomsbilden. Grupp A1 är hundarna med uCysC ($>0,1$ mg/L) som visade sig ha ACKD, grupp A2 är hundarna med uCysC $>0,1$ mg/L utan tecken på primär njursjukdom.



Figur 1. Urin-cystatin C-resultat hos hundar med förhöjt uCysC och ACKD (grupp A1, $n=5$), hundar med förhöjt uCysC utan primär njursjukdom (grupp A2, $n=6$) och hundar med uCysC under mätvärdet 0,1 mg/L (grupp B, $n=35$).

Hundarna i grupp A med förhöjda koncentrationer av uCysC ($>0,1$ mg/L) var signifikant äldre än hundarna i grupp B med uCysC under mätområdet ($<0,1$ mg/L) ($p=0,0054$). Hundarna i grupp A hade även signifikant högre UPC och signifikant ökade koncentrationer sCr vid jämförelse med grupp B ($p<0,0001$, resp. $p=0,0016$). Inga signifikanta skillnader kunde ses mellan grupp A och B vid jämförelse av EVF, CRP, temp och dehydreringsgrad vid ankomst. Hundarna i grupp A var däremot signifikant mer påverkade i AT vid ankomst och provtagning i jämförelse med grupp B ($p=0,0010$, resp. $p=0,0056$). Hundarna i grupp A var även signifikant mer påverkade cirkulatoriskt i jämförelse med grupp B ($p=0,0053$).

Hundarna i grupp A1 hade sannolik akutisering av en tidigare kronisk njursjukdom (ACKD). Dessa hundar hade måttligt till kraftigt förhöjt uCysC, UPC och sCr (Fig. 1–3). Sjukdomsförloppet varierade mellan 30 dygn och 180 dygn (baserat på anamnestiska djurägaruppgifter i journal) och alla hundarna hade någon form av akutisering av symtombild som ledde till att djurägarna uppsökte akutvård. Hundarna med ACKD i grupp A1 hade tecken på olika former av kroniska förändringar på njurarna och grad av bristande njurfunktion baserat på kliniska fynd vid undersökning, blodprovsresultat (kreatinin, urea, fosfat, calcium, kalium, sCysC), ultraljudsundersökning och urinprovsanalys (UPC). Den kliniska bilden kombinerat med blodprovsanalyser (med indikation på bristande njurfunktion) och ultraljud (med tecken på kronisk njursjukdom) användes för att ställa diagnosen ACKD hos hundarna i denna grupp. Obduktion visade på CKD hos två av fem hundar; hos ena sågs kronisk nefrit med tecken på uremi och retentionscystor och hos den andra hunden sågs kronisk glomerulonefrit bilateralt. Två av hundarna (ID: 24 och 47) hade andra sjukdomstillstånd utöver ACKD. Hund nr 24 hade anemi och vid gastroskopi samt vid obduktion sågs multipla ulcerationer i magsäcken. Hund nr 47 hade cystisk endometriehyperplasi som bifynd. För hundarna som hade förhöjt uCysC ($>0,1$ mg/L), analyserades även uGGT och uALP. Ingen av hundarna i grupp A1 hade förhöjda värden av vare sig uGGT eller uALP, vilket eventuellt bero på avsaknad av fungerande tubuli och låg produktion av uGGT och uALP som följd. Samtliga av hundarna i denna grupp avlivades under studiens gång på grund av långt fortskriden CKD utan svar på behandling mot akutisering eller avrådan att behandla på grund av dålig prognos. En av hundarna (ID:24) avlivades på grund av anemi som förvärrades trots blodtransfusioner.

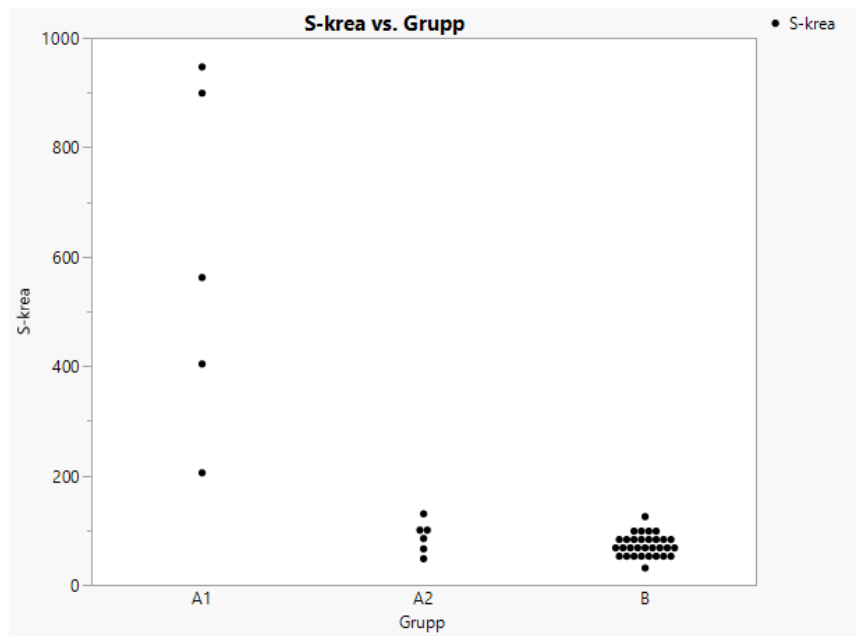


Figur 2. Urinprotein/u-kreatinin-kvoten hos hundar med förhöjt uCysC och ACKD (grupp A1, n=5), hundar med förhöjt uCysC utan njursjukdom (grupp A2, n=6) och hundar med uCysC under mätvärdet 0,1 mg/L (grupp B, n=35). Punkterna representerar varje enskilt UPC-resultat i respektive grupp.

Hundarna med förhöjt uCysC utan primär njursjukdom i grupp A2 var ormbitna eller hade olika typer av inflammatorisk sjukdom (pankreatit, pyometra och gastroenterit). De hade måttligt-kraftigt påverkat allmäntillstånd och fyra av fem (80 %) hade högt CRP (för en av hundarna analyserades inte CRP i samband med övrig diagnostik). Hundarna i denna grupp hade sCr-värden inom referensintervall, men UPC var över referensintervall (Fig. 2–3). Tre hundar i grupp A2 hade förhöjda värden vid analys av uGGT och uALP. En hund med ormbett hade lindrigt förhöjt uALP (0,4 ukat/L) och uGGT (2,2 ukat/L). Hunden med pankreatit hade lindrigt förhöjt uALP (0,4 ukat/L) och måttligt förhöjt uGGT (9,8 ukat/L). Hunden med hemorragisk gastroenterit och myxomatös klaffsjukdom (MMVD) hade enbart lindrigt förhöjt uGGT (1,8 ukat/L). Alla hundar i denna grupp återhämtade sig från de akuta sjukdomarna, och för de hundar där återbesök och uppföljande värden fanns sågs inga tecken på kroniska förändringar efter den aktuella sjukdomen.

Hundarna i grupp B med uCysC under mätvärdet (0,1 mg/L) hade varierande sjukdomstillstånd där gastroenterit och olika symtom från urinvägarna var vanligast förekommande (Tabell 1). Nitton av 35 hundar (54 %) hade högt CRP och 25 % var cirkulatoriskt påverkade. Enbart en hund i denna grupp hade förhöjt sCr (azetomi). 10/35 (28,6 %) av hundarna hade förhöjt UPC. 11 % av hundarna i denna grupp avlivades under studiens gång.

TVå avvikelser från provtagningsrutinerna finns i studiematerialet. Hos en av hundarna i grupp A1 samlades urin 10–15 minuter efter att hunden avlivats med pentobarbital (Alfatal vet. 100 mg/ml, Omnidea). Hos en av hundarna med ormbett samlades urin innan en storhelg, urinprovet förvarades sedan i frysen (-18 °C) innan upptining och analys.



Figur 3. S-kreatinin hos hundar med förhöjt uCysC och CKD (grupp A1, n=5), hundar med förhöjt uCysC utan njursjukdom (grupp A2, n=6) och hundar med uCysC under mätvärdet 0,1 mg/L (grupp B, n=35). Punkterna representerar varje enskilt sCr-resultat i respektive grupp.

Tabell 1. 46 hundar som ingick i studien, tilldelade nummer i studien, diagnos och ålder. Diagnos och ålder erhöles från hundarnas journaler. Listan är sorterad efter diagnos.

ID	Ålder	Urin-cystatin C (mg/L)	Diagnos
4	9	7,4	ACKD
28	13	12,1	ACKD
38	14	19,6	ACKD
47	7	17,9	ACKD
24	9	18,3	ACKD, Anemi
15	5	<0,1	Ascites, Hydrothorax utan fastställd diagnos
26	13	<0,1	Diabetes
20	5	<0,1	Feber
32	3	<0,1	Förgiftning, vindruvor
13	6	<0,1	Kräkning, utan fastställd diagnos
31	6	<0,1	Kräkningar, utan fastställd diagnos
42	14	<0,1	Gastroenterit
2	4	<0,1	Gastroenterit, corp al
22	1	<0,1	Gastroenterit, Hemorragisk
23	14	<0,1	Gastroenterit, Hemorragisk
29	2	<0,1	Gastroenterit, Hemorragisk
30	6	<0,1	Gastroenterit, Hemorragisk
27	13	5,4	Gastroenterit, Hemorragisk + myxomatös klaffsjukdom
16	3	<0,1	Immunmedierad hemolytisk anemi
37	6	<0,1	Immunmedierad hemolytisk anemi
44	2	<0,1	Pankreatit
45	6	0,2	Pankreatit
12	3	<0,1	Anaplasma
46	6	<0,1	Infektion/inflammation utan fastställd diagnos
36	11	<0,1	Cholecystit
41	12	<0,1	Hepatit
21	9	<0,1	Hepatit
40	5	<0,1	Mastit
9	12	0,8	Pyometra
25	8	1,8	Pyometra
33	6	<0,1	Pyometra
39	0,58	<0,1	Pyelonefrit
10	1	<0,1	Infektion/inflammation urinblåsa
11	6	<0,1	Infektion/inflammation urinblåsa
17	3	<0,1	Intestinal lymfangiektasi
3	3	<0,1	Ormbett
7	4	6	Ormbett
8	1	<0,1	Ormbett
34	8	2,9	Ormbett
14	11	<0,1	Polyuri, Idiopatiska, ospecifika, multifaktoriella tillstånd utan fastställd diagnos
18	9	<0,1	Polyuri, urinrängningar
19	13	<0,1	Symtom på sjukdom utan fastställd orsak
5	2	<0,1	Urinsten, njursten
6	4	<0,1	Urinsten
35	5	<0,1	Trombocytopeni, hemoragisk kräkning
43	10	<0,1	Trombocytopeni, symtom på sjukdom utan fastställd orsak

Tabell 2. Analysvärden för de 46 hundarna i studiepopulationen sorterat efter grupp. Median och min-max värden för Grupp A1: hundar med uCysC >0,1mg/L och ACKD. Grupp A2: hundar med uCysC>0,1mg/L utan primär njursjukdom. Grupp B: hundar med uCysC<0,1mg/L.

Analys	Grupp A1 n= 5	Grupp A2 n= 6	Grupp B n= 35
uCysC mg/L	17,9 (7,4–19,6)	2,35 (0,2–6)	0,05 (0,00–0,1)*
UPC	5,9 (2,7–18,1)	0,95 (0,6–1,4)	0,2 (0,1–5,8) ^a
EVF %	36 (7–50,5)	48,15 (35,3–60,4)	47,8 (11–74,5)
sCr µmol/L	562 (205–947)	87,5 (48–130)	70 (31–125) ^a
CRP mg/L	16,5 (9–49,1)	124 (8–257)	37 (6–228)
Temp °C	38 (37,6–38,7)	39 (37,6–40)	38,55 (35,7–40,5)
AT vid ankomst	3 (1–4)	3 (3–4)	1 (0–4) ^a
Dehydrering vid ankomst %	5 (0–10)	5 (0–10)	5 (0–10)
Cirkulatorisk påverkad (%)	80	67	25 ^a
Avlivade %	100	0	11

Urin-cystatin C (uCysC), urinprotein/u-kreatinin-kvot (UPC). Hematokrit i form av erytrocyt-volympfraktion (EVF). Serum-kreatinin (sCr). C-reaktivt protein (CRP). Temp, rektaltemperatur i °C. AT vid ankomst där AT ua: 0, AT lindrigt dämpad: 1, AT dämpad: 2, AT måttligt dämpad: 3, AT kraftigt dämpad: 4. Grad av dehydrering vid ankomst. Andel cirkulatoriskt påverkade. Andel avlivade.

^a skiljer sig signifikant från grupp A (A1+A2)

* jämförande analys genomfördes ej för uCysC då det var kriteriet för gruppindelningen

5. Diskussion

Syftet med studien var att undersöka om cystatin C i urin kan vara en presumtiv markör för njurskada hos hundar med olika typer av allvarliga sjukdomstillstånd. Efter insamling av urin från 46 hundar hade elva hundar i studiepopulationen förhöjd uCysC, varav fem visade sig ha akutiserad CKD. Dessa hundar hade kraftigt förhöjd koncentration av uCysC (7,4–19,6 mg/L) vilket stämmer väl överens med tidigare forskning av Monti *et al.* (2012) där hundar med njursjukdom hade förhöjda uCysC koncentrationer mellan 2,1–10,4 mg/L. Ingen av hundarna med ACKD hade förhöjda nivåer av uGGT eller uALP vilket eventuellt kan tala för avsaknad av tillräcklig tubulifunktion för produktion av markörerna. CRP analyserades för tre av hundarna i denna grupp och var lindrigt förhöjt hos samtliga.

I studien ingick fyra hundar med förhöjt uCysC och olika inflammatoriska sjukdomar, bland annat pyometra, pankreatit och hemorragisk gastroenterit. Tidigare studier har visat att akut tubuliskada kan uppkomma hos patienter med pyometra. Heiene *et al.* (2001) undersökte 55 hundar med pyometra för att utvärdera njurförändringar som kan uppstå sekundärt till pyometra. I studien kunde höga nivåer av uALP och uGGT associeras med svåra skador i proximala tubuli (Heiene *et al.* 2001). I den här studien ingick det tre hundar med pyometra varav två hade förhöjda nivåer av uCysC men utan förhöjningar av uALP och uGGT. Då tidigare studier visat på samband mellan pyometra och njurtubuliskada är det rimligt att anta att hundarna med pyometra och högt uCysC i den här studien hade en mild form av akut njurskada utan samtidigt förhöjda nivåer av sCr eller uALP och uGGT. Ingen av hundarna hade återbesök på UDS, en av hundarna med pyometra hade uppföljande blodprover från annan klinik där sCr fortsatt låg inom referensintervall. Hunden med pyometra utan förhöjt uCysC var till skillnad från de två andra pyometrahundarna inte allmänpåverkad eller uttorkad och hade inga tecken på peritonit under operationen.

Det finns även studier som visat att pankreatit är en vanlig bakomliggande etiologi vid AKI. Vaden *et al.* (1997) undersökte hundar med olika sjukdomar i en retrospektiv studie där hundar som uppfyllde kriterierna satta för AKI utifrån journaldata inkluderades i studien. Etiologin till AKI gick att fastställa hos 77 av hundarna där 14 hundar hade pankreatit, vilket var den vanligaste förekommande

sjukdomen som kunde identifieras som orsak till AKI (Vaden *et al.* 1997). I en annan studie där journaler från 249 hundar studerade kunde pankreatit ses som orsak till AKI hos 22 % av hundarna (Rimer *et al.* 2021).

I grupp A med förhöjt uCysC ingick även två hundar med huggormsbett (*vipera berus*). Huggormsgift är ett känt nefrotoxin som kan orsaka skador på proximala tubuli och leda till AKI (Sutton *et al.* 2011; Palviainen *et al.* 2013; Harjen *et al.* 2022). I studien av Harjen *et al.* (2021) undersöktes 35 hundar med bett från huggorm (*V. berus*), signifikant stegring sågs i bland annat i uGGT, uNGAL och uKIM-1, men ingen signifikant stegring av uCysC kunde ses hos de 35 huggormsbitna hundarna jämfört med de friska kontrollerna. Harjen *et al.* (2021) använde en annan mätmetod för uCysC än vad som användes i den här studien, vilket kan vara en av förklaringarna varför tecken på AKI kunde ses men ingen signifikant ökning av uCysC. Totalt ingick fyra ormbitna hundar i den här studien. De två hundarna i grupp A2 hade tydligt ökad uCysC och en av hundarna hade även en markant ökning i uALP- och uGGT-koncentration vilket tyder på tubulipåverkan. De ökade koncentrationerna av uALP och uGGT i den här studien stämmer överens med resultat från en studie av Palviainen *et al.* (2013) där samband hittats mellan uALP och uGGT och svårighetsgrad av kliniska symtom efter ormbett. De ormbitna hundarna i grupp B provtogs mycket senare i förloppet (ca 24h efter ankomst) jämfört med hundarna i grupp A2 och hade fått vätsketerapi längre jämfört med grupp A2 vilket kan ha påverkat njurarna positivt. En tydlig begränsning i den här studie var dock den låga andelen huggormsbitna hundar. Det kan vara av intresse att utvärdera fler ormbitna hundar avseende uCysC med metoden som användes i den här studien för att utvärdera om uCysC är en bra markör för att påvisa AKI hos hundar med ormbett.

Hundarna med förhöjda uCysC-värden i grupp A2 hade sCr-värden inom referensintervallet. Inga av hundarna i denna grupp visade tecken på njursjukdom vid återbesök efter sin sjukhusvistelse men uppföljningsgraden var låg och i många av fallen togs aldrig uppföljande njurvärden och uppföljande urinprov var inte möjligt att genomföra i denna studie. Tidigare studier (Vaden *et al.* 1997; Heiene *et al.* 2001; Harjen *et al.* 2021) tillsammans med uCysC-resultatet i den här studien indikerar att någon grad av AKI mest troligt förekommit hos hundarna i grupp A2.

Flera studier visar på att uCysC är en lovande markör för diagnos av AKI hos människa (Grubb 2001). Resultaten från studier där urinmarkörer undersökts efter medicinsk inducering av AKI hos hund (Sasaki *et al.* 2014; Gu *et al.* 2018; Paes-Leme *et al.* 2021), samt resultaten från den här studien indikerar att det kan vara av intresse att följa uCysC hos patienter på IVA för att snabbare kunna upptäcka och adressera tidiga tecken på AKI. Patienter på IVA är av särskilt intresse jämfört med

övriga patienter då de i högre grad lider av tillstånd där ischemi i njurarna kan uppstå med skador som följd (Lunn 2011). Uttorkning och undercirkulation är även vanligt hos hundar på IVA och om det inte korrigeras kan det ge sekundär njurpåverkan (Lunn 2011).

Urinbiomarkörer kvotas ofta med urin-kreatinin för att korrigera för urinens koncentration (Waikar *et al.* 2010). I många av studierna nämnda i litteraturoversikten normaliserades uCysC med uCr. Inom humanvården har det kunnat påvisas att normalisering med uCr kan leda till både falsk positiva och falsk negativa resultat när patienter med njurtransplantation undersöktes (Conti *et al.* 2009; Waikar *et al.* 2010). I studien av Conti *et al.* (2009) var förhöjt uCysC tillräckligt för att korrekt kunna uppskatta tubulär skada som sedan bekräftades med biopsier. Metoden som användes för att mäta uCysC i den här studien hade ett begränsat mätområde nedåt. Beräkning av kreatinin-kvot på värden $<0,1\text{mg/L}$ fungerar dåligt, därför användes koncentrationen av uCysC i den här studien.

Planen var att samla urin från majoriteten av hundarna innan vätsketerapi startades för att minimera utspädningseffekter. Då många djurägare rastade hundarna innan ankomst till akutmottagningen och det sedan dröjde till efter inskrivning och uppstart av vätsketerapi innan urin kunde samlas var det inte möjligt att samla urinprov innan vätsketerapi i majoriteten av fallen. Det var ur kliniskt perspektiv inte etiskt att vänta med start av vätsketerapi för att få ett urinprov till studien och det var i många fall inte av klinisk relevans att ta urinprov innan start av vätsketerapi. Vätsketerapi kan ha en utspädande effekt på urinen (Lunn 2011) vilket skulle kunna leda till falskt låga resultat vid analys av markörer i urinen. För de hundar där uCysC var förhöjt var markören tydligt ökad och vätsketerapi innan samling av urinprovtagning har sannolikt haft en mindre betydelse för resultatet. Även om majoriteten av blodproverna analyserades på klinisk kemiska laboratoriet var det ett antal blodprover som analyserades med andra metoder. För att bättre kunna jämföra resultat mellan hundarna hade det varit en fördel om samtliga blodprover analyserades med samma metod men det var inte genomförbart i denna studie.

Studiepopulationen var liten i denna studie vilket gör det svårt att dra konkreta slutsatser från resultaten. Det finns indikation att analys av uCysC kan vara relevant ur kliniskt perspektiv särskilt för hundar som vistas på IVA och där vikten av att minimera skadeverkan på njurarna är stor. Flera studier visar att uCysC ökar tidigt i sjukdomsförloppet när tubuliskada framkallas farmakologiskt (Sasaki *et al.* 2014; Gu *et al.* 2018) så potentialen att tidigare upptäcka AKI med uCysC är hög. Mätmetoden i denna studie kan endast mäta uCysC-koncentrationer över $0,1\text{mg/L}$, så det är möjligt att några fall med lindriga stegringar har missats. Det finns även en känsligare metod som mäter lägre koncentrationer, men den ger falskt låga

värden i de fall som cystatin C är kraftigt förhöjt på grund av att antikropparna i reagenset inte räcker till (antigen overload) (Dodig 2008). Metoderna som finns för uCysC behöver även ha ett mycket brett mätområde och fånga upp både höga och låga värden eftersom små ändringar av uCysC flaggar för tidiga men ofta irreversibla stadier av proximal tubulidysfunktion (Grubb 2001).

6. Slutsats

I studien var det ett antal hundar med systemisk inflammation eller ormbett som hade förhöjt uCysC i kombination med förhöjd urinprotein/u-kreatinin-kvot, vilket kan tala för sekundär njurskada hos dessa patienter. Ökning av cystatin C i urin kunde även observeras hos hundar med akutisering av kronisk njursjukdom. Cystatin C i urin har potential som markör för akut njurskada på hund men mer forskning med större studiepopulationer behövs för att kunna dra slutsatser om den kliniska användbarheten för denna urinmarkör och om den möjliggör tidigare upptäckt av akut njurskada hos hundar.

Referenser

- Abrahamson, M., Barrett, A.J., Salvesen, G. & Grubb, A. (1986). Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. *Journal of Biological Chemistry*, 261 (24), 11282–11289. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)67380-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)67380-6)
- Abrahamson, M., Olafsson, I., Palsdottir, A., Ulvsbäck, M., Lundwall, A., Jensson, O. & Grubb, A. (1990). Structure and expression of the human cystatin C gene. *Biochemical Journal*, 268 (2), 287–294
- Almy, F.S., Christopher, M.M., King, D.P. & Brown, S.A. (2002). Evaluation of cystatin C as an endogenous marker of glomerular filtration rate in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16 (1), 45–51. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2002.tb01605.x>
- Bonventre, J.V. & Yang, L. (2011). Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *The Journal of Clinical Investigation*, 121 (11), 4210–4221. <https://doi.org/10.1172/JCI45161>
- Conti, M., Moutereau, S., Esmilaire, L., Desbene, C., Lallali, K., Devanlay, M., Durrbach, A., Manivet, P., Eschwège, P. & Loric, S. (2009). Should kidney tubular markers be adjusted for urine creatinine? The example of urinary cystatin C. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 47 (12). <https://doi.org/10.1515/CCLM.2009.341>
- Damm, E. (2020). *Koncentration av kemiska metaboliter i urin hos friska hundar*. (Examensarbete). Sveriges lantbruksuniversitet. Veterinärprogrammet. <https://stud.epsilon.slu.se/15873/> [2022-12-06]
- De Loor, J., Daminet, S., Smets, P., Maddens, B. & Meyer, E. (2013). Urinary biomarkers for acute kidney injury in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27 (5), 998–1010. <https://doi.org/10.1111/jvim.12155>
- Dodig, S. (2009). Interferences in quantitative immunochemical methods. *Biochimica Medica*, 19 (1), 50–62. <https://doi.org/10.11613/BM.2009.005>
- Dunaevich, A., Chen, H., Musseri, D., Kuzi, S., Mazaki-Tovi, M., Aroch, I. & Segev, G. (2020). Acute on chronic kidney disease in dogs: Etiology, clinical and clinicopathologic findings, prognostic markers, and survival. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 34 (6), 2507–2515. <https://doi.org/10.1111/jvim.15931>
- Ferguson, M.A. & Waikar, S.S. (2012). Established and emerging markers of kidney function. *Clinical Chemistry*, 58 (4), 680–689. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.167494>

- Finco, D.R., Brown, S.A., Crowell, W.A. & Barsanti, J.A. (1991). Exogenous creatinine clearance as a measure of glomerular filtration rate in dogs with reduced renal mass. *American Journal of Veterinary Research*, 52 (7), 1029–1032
- Ghys, L., Paepe, D., Smets, P., Lefebvre, H., Delanghe, J. & Daminet, S. (2014). Cystatin C: A new renal marker and its potential use in small animal medicine. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28 (4), 1152–1164. <https://doi.org/10.1111/jvim.12366>
- Grauer, G.F. (2005). Early detection of renal damage and disease in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 35 (3), 581–596. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2004.12.013>
- Grubb, A.O. (2001). Cystatin C-properties and use as diagnostic marker. *Advances in Clinical Chemistry*, 35, 63–99. [https://doi.org/10.1016/S0065-2423\(01\)35015-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2423(01)35015-1)
- Gu, Y.-Z., Vlasakova, K., Troth, S.P., Peiffer, R.L., Tournade, H., Pasello Dos Santos, F.R., Glaab, W.E. & Sistare, F.D. (2018). Performance assessment of new urinary translational safety biomarkers of drug-induced renal tubular injury in tenofovir-treated cynomolgus monkeys and beagle dogs. *Toxicologic Pathology*, 46 (5), 553–563. <https://doi.org/10.1177/0192623318775023>
- Harjen, H.J., Anfinssen, K.P., Hultman, J., Moldal, E.R., Szlosek, D., Murphy, R., Friis, H., Peterson, S. & Rørtveit, R. (2022). Evaluation of urinary clusterin and cystatin B as biomarkers for renal injury in dogs envenomated by the European adder (*Vipera berus*). *Topics in Companion Animal Medicine*, 46, 100586. <https://doi.org/10.1016/j.tcam.2021.100586>
- Harjen, H.J., Nicolaysen, T.V., Negard, T., Lund, H., Sævik, B.K., Anfinssen, K.P., Moldal, E.R., Zimmer, K.E. & Rørtveit, R. (2021). Serial serum creatinine, SDMA and urinary acute kidney injury biomarker measurements in dogs envenomated by the European adder (*Vipera berus*). *BMC Veterinary Research*, 17 (1), 154. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02851-8>
- Heiene, R., Moe, L. & Mølmen, G. (2001). Calculation of urinary enzyme excretion, with renal structure and function in dogs with pyometra. *Research in Veterinary Science*, 70 (2), 129–137. <https://doi.org/10.1053/rvsc.2000.0451>
- Kaseda, R., Iino, N., Hosojima, M., Takeda, T., Hosaka, K., Kobayashi, A., Yamamoto, K., Suzuki, A., Kasai, A., Suzuki, Y., Gejyo, F. & Saito, A. (2007). Megalin-mediated endocytosis of cystatin C in proximal tubule cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357 (4), 1130–1134. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.072>
- Legatti, S.A.M., Dib, R.E., Legatti, E., Botan, A.G., Camargo, S.E.A., Agarwal, A., Barretti, P. & Paes, A.C. (2018). Acute kidney injury in cats and dogs: A proportional meta-analysis of case series studies. *PLoS ONE*, 13 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190772>
- Lunn, K.F. (2011). The kidney in critically ill small animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 41 (4), 727–744. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.03.020>
- Löfberg, H. & Grubb, A.O. (1979). Quantitation of γ -trace in human biological fluids: Indications for production in the central nervous system. *Scandinavian Journal of*

- Clinical and Laboratory Investigation*, 39 (7), 619–626.
<https://doi.org/10.3109/00365517909108866>
- Miyagawa, Y., Akabane, R., Ogawa, M., Nagakawa, M., Miyakawa, H. & Takemura, N. (2020). Serum cystatin C concentration can be used to evaluate glomerular filtration rate in small dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 82 (12), 1828–1834.
<https://doi.org/10.1292/jvms.20-0201>
- Monti, P., Benckekroun, G., Berlato, D. & Archer, J. (2012). Initial evaluation of canine urinary cystatin C as a marker of renal tubular function. *Journal of Small Animal Practice*, 53 (5), 254–259. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2012.01198.x>
- Paes-Leme, F. de O., Souza, E.M., Paes, P.R.O., Gomes, M.G., Muniz, F.S., Campos, M.T.G., Peixoto, R.B., Vaz de Melo, P.D., Arndt, M.H.L. & Costa Val, A. (2021). Cystatin C and iris: Advances in the evaluation of kidney function in critically ill dog. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 721845. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.721845>
- Palviainen, M., Raekallio, M., Vainionpää, M., Lahtinen, H. & Vainio, O. (2013). Evaluation of renal impairment in dogs after envenomation by the common European adder (*Vipera berus berus*). *The Veterinary Journal*, 198 (3), 723–724.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.09.008>
- Pelander, L., Häggström, J., Larsson, A., Syme, H., Elliott, J., Heiene, R. & Ljungvall, I. (2019). Comparison of the diagnostic value of symmetric dimethylarginine, cystatin C, and creatinine for detection of decreased glomerular filtration rate in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33 (2), 630–639. <https://doi.org/10.1111/jvim.15445>
- Rimer, D., Chen, H., Bar-Nathan, M. & Segev, G. (2022). Acute kidney injury in dogs: Etiology, clinical and clinicopathologic findings, prognostic markers, and outcome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 36 (2), 609–618.
<https://doi.org/10.1111/jvim.16375>
- Sasaki, A., Sasaki, Y., Iwama, R., Shimamura, S., Yabe, K., Takasuna, K., Ichijo, T., Furuhashi, K. & Satoh, H. (2014). Comparison of renal biomarkers with glomerular filtration rate in susceptibility to the detection of gentamicin-induced acute kidney injury in dogs. *Journal of Comparative Pathology*, 151 (2–3), 264–270.
<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.06.001>
- Sjaastad, O.V., Sand, O. & Hove, K. (2010). The endocrine system. I: Sjaastad OV, Sand O & Hove K. *Physiology of Domestic Animals*. 2. ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press, 220-258.
- Stevens, L.A., Shastri, S. & Levey, A.S. (2010). CHAPTER 3 - Assessment of Renal Function. I: Floege, J., Johnson, R.J., & Feehally, J. (red.) *Comprehensive Clinical Nephrology*. 4. ed. Philadelphia: Mosby. 31–38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-05876-6.00003-4>
- Sutton, N.M., Bates, N. & Campbell, A. (2011). Canine adder bites in the UK: a retrospective study of cases reported to the Veterinary Poisons Information Service. *Veterinary Record*, 169 (23), 607–607. <https://doi.org/10.1136/vr.d4695>
- Tenstad, O., Roald, A.B., Grubb, A. & Aukland, K. (2009). Renal handling of radiolabelled human cystatin C in the rat. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. <https://doi.org/10.3109/00365519609088795>

- Thielemans, N., Lauwerys, R. & Bernard, A. (1994). Competition between albumin and low-molecular-weight proteins for renal tubular uptake in experimental nephropathies. *Nephron*, 66 (4), 453–458. <https://doi.org/10.1159/000187863>
- Tidman, M., Sjöström, P. & Jones, I. (2008). A comparison of GFR estimating formulae based upon s-cystatin C and s-creatinine and a combination of the two. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 23 (1). <https://doi.org/10.1093/ndt/gfm661>
- Uchida, K. & Gotoh, A. (2002). Measurement of cystatin-C and creatinine in urine. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 323 (1–2), 121–128. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(02\)00177-8](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(02)00177-8)
- Vaden, S.L., Levine, J. & Breitschwerdt, E.B. (1997). A retrospective case-control of acute renal failure in 99 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 11 (2), 58–64. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1997.tb00074.x>
- Von Hendy-Willson, V.E. & Pressler, B.M. (2011). An overview of glomerular filtration rate testing in dogs and cats. *The Veterinary Journal*, 188 (2), 156–165. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.05.006>
- Waikar, S.S., Sabbiseti, V.S. & Bonventre, J.V. (2010). Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney International*, 78 (5), 486–494. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.165>
- Wehner, A., Hartmann, K. & Hirschberger, J. (2008). Utility of serum cystatin C as a clinical measure of renal function in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 44 (3), 131–138. <https://doi.org/10.5326/0440131>

Populärvetenskaplig sammanfattning

Den här studien handlar om diagnostik för att upptäcka akuta njurskador hos hund. Njurarna är pariga organ i kroppen som bland annat ansvarar för upprätthållande av vätskebalansen, utsöndring av restprodukter och återupptag av viktiga ämnen till blodet. Njurarna har en enorm reservkapacitet, vilket innebär att det är svårt att upptäcka skador på njurarna innan de blir omfattande. Blodet färdas in i njuren och filtreras av glomeruli, små kärlnystan som fungerar som filter i njuren. Blodkropparna och stora proteiner stannar i blodbanan, men vätska, små molekyler och joner filtreras genom glomeruli och bildar primärurin. Primärurinen som bildas passerar vidare genom ett litet rör, ett så kallat tubuli. I tubuli sker återupptag av majoriteten av vätskan samt viktiga ämnen och utsöndring sker av ämnen kroppen vill bli av med. Glomeruli och tubuli tillsammans kallas för nefron och i hundens vardera njure finns ca 400 000 nefron.

Om njurskada misstänks finns ett antal verktyg som kan användas för diagnostik; bland annat blodprovsanalyser, urinalyser och bilddiagnostik i form av ultraljud. Vid blodprovsanalys är det framför allt kreatinin som används i klinisk verksamhet som markör för njurarnas funktion. Kreatinin är en så kallad GFR-markör. GFR eller "glomerular filtration rate" är ett sätt att mäta hur mycket blod som filtreras av njurens små glomeruli varje minut. Om GFR är minskad kan det tyda på en nedsatt funktion i njurarna. Kreatinin som markör är dock okänslig och en stor del av njurfunktionen (ca 75 %) behöver gå förlorad innan märkbara stegringar kan ses i blodet. Urinalyser är ett annat sätt att undersöka hur väl njurarna fungerar. Rutinmässigt analyseras bland annat urinkoncentrationen, protein och kreatinin i urin.

Forskning pågår kontinuerligt för att hitta nya markörer som är känsligare och i tidigare skede kan flagga för njurskada eller bristande njurfunktion. En av dessa markörer som utvärderas i forskningssammanhang är cystatin C, ett litet protein som produceras i kroppens alla celler och som finns fritt i blodet, filtreras i glomeruli och sedan återupptas i njuren innan urinen lämnar njuren till urinblåsan. Detta protein ska normalt inte ses i urinprov vilket gör proteinet användbart i diagnostik för att utvärdera njurtubulifunktion.

Det finns några tidigare studier som har visat att cystatin C ökar i urinen hos hundar med fastställd kronisk njursjukdom och vid toxisk njurskada. Syftet med studien var att undersöka om cystatin C i urin kan vara en presumtiv markör för njurskada hos hundar med olika typer av allvarliga sjukdomstillstånd. Till skillnad från kreatinin är inte cystatin C i urinen ett mått på njurens filtrationskapacitet. Ökade nivåer av markören i urinen talar framför allt för bristande funktion i tubuli där ämnet normalt sett ska återupptas och brytas ner.

I studien samlades urin för analys av cystatin C från 46 allvarligt sjuka hundar som sökte vård på universitetdjursjukhusets akutmottagning. Hundarna delades in i två grupper baserat på om de hade förhöjd cystatin C-koncentrationen i urinen eller inte. Information från hundarnas journaler (blodprovsresultat, bilddiagnostik, diagnos) samlades in och sammanställdes för statistisk analys.

Elva hundar av 46 (24 %) hade förhöjd koncentration av cystatin C i urinen. Hundarna med förhöjda urin cystatin C-värden var mer påverkade cirkulatorisk, dvs påverkad i en eller flera värden avseende blodtryck/cirkulerande blodvolym/puls/pulskvalitet. Dessa 11 hundar var även mer påverkade i sitt allmäntillstånd (allmänna mående) vid jämförelse med hundarna utan mätbart ökade nivåer av markören i urinen. Av hundarna med förhöjda urin cystatin C-värden diagnostiserades fem hundar med kronisk njursjukdom som hade akutiserats, fyra hundar hade omfattande inflammatorisk sjukdom och två var ormbitna. Hundarna utan tecken på primär njursjukdom hade förhöjda urin cystatin C-värden utan samtidig ökning av njurmarkören kreatinin i blodet, vilket kan innebära att hundarna i denna grupp sannolikt hade lokala skador på njurarna som inte påverkade njurens filtrationskapacitet

Studien syftade att undersöka om det finns potential för att cystatin C i framtiden kan användas som diagnostisk markör för tidigare upptäckt av akut njurskada. Mer forskning med större studiepopulationer behövs dock för att kunna dra slutsatser om den kliniska användbarheten för denna urinmarkör och om den möjliggör tidigare upptäckt av akut njurskada hos hundar.

Tack

Stort tack till min handledare Inger Lilliehöök och biträdande handledare Lena Pelander som varit ett enormt stöd genom hela detta arbete och som bidragit med sin omfattande kunskap inom ämnet!

Tack till personalen på UDS som hjälp till i insamlandet av urinproverna, utan er hade inte denna stora mängd hundar kunnat inkluderas i studien på så kort tid.

Tack även till vänner och familj som agerat stöd när motivationen brustit och uppmanande ord behövts.

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. **Som student äger du upphovsrätten** till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Även om du inte publicerar fulltexten kommer den arkiveras digitalt. Om fler än en person har skrivit arbetet gäller krysset för samtliga författare. Läs om SLU:s publiceringsavtal här:

- <https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

☒ JA, jag ger härmed min tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

☐ NEJ, jag ger inte min tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.