

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 615.21/26:582.630.1:616-089.5:636.028(043.2)

**OCENA SEDATIVNEGA DELOVANJA KANABIDIOLA MED
UVAJANJEM V SPLOŠNO ANESTEZIJO TER NJEGOVEGA
ANKSIOLITIČNEGA UČINKA PRI PODGANAH**

**EVALUATION OF THE SEDATIVE EFFECT OF CANNABIDIOL
DURING INDUCTION TO GENERAL ANESTHESIA AND ITS
ANXIOLYTIC EFFECT IN RATS**

Alenka Babič

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom, pod mentorstvom doc. dr. Matjaža Uršiča in somentorstvom izr. prof. dr. Tomaža Snoja na Inštitutu za predklinične vede Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani

Ljubljana, 2021

IZVLEČEK

Ključne besede: farmakološko delovanje; kanabidiol – farmakokinetika – učinki zdravil; splošna anestezija; psihični stres – psihologija; podgane

Namen dela je vrednotiti sedativni učinek kanabidiola (CBD) pri uvajanju v splošno anestezijo z izofluranom, natančneje čas uvoda v anestezijo in čas prebujanja iz splošne anestezije (čas pojava umaknitvenega refleksa okončine in čas do začetka gibanja), ter vrednotiti vpliv CBD na inducirani akutni stres pri laboratorijskih podganah.

V prvem delu raziskave smo pri laboratorijskih podganah, ki so predhodno po orogastrični sondi prejele CBD v odmerku 100, 20, 10, 2 ali 0 mg/kg, izvedli splošno anestezijo z izofluranom in določili čas uvoda v anestezijo. Živali so po nastopu splošne anestezije bile še 15 sekund izpostavljene izofluranu, za tem smo anestezijo prekinili in določili čas do pojava umaknitvenega refleksa in začetka gibanja. Čas uvoda v anestezijo je bil pri živalih, ki so prejele CBD v odmerku 20 mg/kg, značilno krajši v primerjavi s kontrolno skupino, ki ni prejela CBD. Med prebujanjem je bil čas do začetka gibanja pri živalih, ki so CBD prejele v odmerku 100 mg/kg značilno daljši kot pri tistih, ki so prejele 20 mg/kg. Rezultati kažejo, da je vpliv CBD na anestezijo z izofluranom odvisen od odmerka in da CBD lahko skrajša uvod ali podaljša čas prebujanja. Čeprav je bila študija izvedena na laboratorijskih podganah, bi bilo izsledke raziskav priporočljivo upoštevati tudi v klinični praksi, predvsem ko se pri pacientih, ki prejemajo CBD, izvaja splošna anestezija.

V drugem delu raziskave smo ocenjevali vpliv CBD na inducirani akutni stres. Eno uro pred induciranim stresom, ki smo ga sprožili z enourno omejitvijo gibanja, smo živalim z orogastrično sondo dali različne odmerke CBD (100, 20, 10, 2 in 0 mg/kg). Po enurni omejitvi gibanja smo izvedli test na odprtem polju, s katerim smo ovrednotili odziv na akutni stres. V okviru testa smo ocenili sledeče parametre: število prehodov v osrednjo cono, čas zadrževanja v notranji coni, skupno prehojeno razdaljo, delež premikanja, število negovanj področij glave in število dvigov na zadnji okončini. Akutni stres smo dodatno ovrednotili z določitvijo koncentracije kortikosterona v krvi. Ugotovili smo značilno večje število prehodov v osrednjo cono odprtega polja pri živalih, ki so CBD prejele v odmerku 10 in 20 mg/kg, kot pri živalih, ki odmerkov niso prejele. Pri ostalih opazovanih parametrih značilnih

razlik med skupinami nismo ugotovili. Na podlagi preučevanih rezultatov anksiolitičnega učinka CBD nismo potrdili. Koncentracija kortikosterona v krvi je bila v primerjavi s kontrolno skupino značilno višja pri živalih, ki so CBD prejele v odmerku 20 in 100 mg/kg. Vpliva CBD na stresni odgovor prav tako nismo zaznali, rezultati vedenjskih testov pa nakazujejo, da sproženi stres zviša kasnejšo aktivnost živali. Za potrditev tega opažanja bi bilo treba opraviti dodatne raziskave.

ABSTRACT

Key Words: pharmacologic action; cannabidiol – pharmacokinetics – drug effects; anesthesia, general; stress psychological – psychology; rats

The aim of the study was to investigate the dose-related effects of premedication of cannabidiol (CBD) on the course of isoflurane anesthesia (induction time, time to onset of withdrawal reflex, recovery time). The purpose of this study was also to evaluate the influence of CBD on the acute stress response.

In the first part of the study Wistar rats were pretreated with different doses of CBD one hour before isoflurane anesthesia. Animals received CBD at doses of 100, 20, 10, 2 or 0 mg/kg using gavage. The induction time was determined. Animals were further 15 seconds exposed to isoflurane and after exposure time to appearance of the withdrawal reflex and the recovery time were determined. In the group pretreated with 20 mg/kg CBD the induction time was significantly lower than in control group. Recovery time was longer in the group pretreated with CBD 100 mg/kg than in the group pretreated with CBD 20 mg/kg. The results indicate that the impact of CBD on the course of isoflurane anesthesia is dose-dependent and can reduce the induction time and prolong recovery time. Although this study was performed in laboratory rats, results should be considered in clinical practice when CBD-treated patients undergo isoflurane anesthesia.

The second part of the study examined the influence of CBD on induced acute stress response. Acute stress was induced by movement restriction. One hour before movement restriction, Wistar rats were pretreated with different doses of CBD. In the pretreatment, animals received 100, 20, 10, 2 or 0 mg/kg CBD by gavage. After movement restriction the animals were placed to open field arena. Acute stress response was evaluated by physiological behavioral test in the open field. The following parameters were evaluated: mobility rate, inside rate, total distance, number of crossing the inner zone, grooming, number of lifts on hind legs. Additionally, stress response was evaluated by determination of plasma corticosterone concentration.

The results show higher number of entrance the inner zone in rats pretreated with CBD in doses 10 and 20 mg/kg in comparison to control group. Significant differences between the experimental and control groups were not found in other parameters. Therefore, the results did not confirm the anxiolytic effects of CBD. Corticosterone concentrations were higher in rats pretreated with 20 and 100 mg/kg CBD. The impact of CBD on the stress response were not confirmed. However, the results of behavioral tests suggest that stress induced by movement restriction results in increased animal activity. Further studies are needed to confirm this observation.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	10
1.1	PREGLED LITERATURE.....	10
1.1.1	Fitokanabinoidi	10
1.1.2	Endokanabinoidni sistem.....	11
1.1.3	Kanabidiol (CBD).....	15
1.1.3.1	Farmakokinetika CBD	15
1.1.3.2	Farmakodinamika in učinki CBD.....	16
1.1.3.3	Vpliv CBD na potek splošne anestezije.....	19
1.1.3.4	Anksiolitični učinek CBD	19
1.1.3.5	Vpliv CBD na intenzivnost odziva organizma na stresne dejavnike	20
1.2	OPREDELITEV PROBLEMA.....	22
2	NAMEN DELA IN HIPOTEZE.....	23
2.1	CILJ RAZISKOVANJA	23
2.2	DELOVNI HIPOTEZI.....	23
3	MATERIAL IN METODE.....	24
3.1	MATERIAL	24
3.1.1	Živali v raziskavi	24
3.1.2	Učinkovine	24
3.1.3	Oprema.....	25
3.2	METODE.....	26
3.2.1	Ugotavljanje vpliva premedikacije s cbd na potek splošne anestezije	26
3.2.2	Ocena intenzivnosti stresnega odziva po premedikaciji z različnimi odmerki CBD.....	28
3.2.2.1	Opis vedenjskih parametrov	29
3.2.2.2	Ugotavljanje koncentracije kortikosterona v krvni plazmi	30
3.2.3	Statistična analiza	30
4	REZULTATI.....	31
4.1	VPLIV PREDHODNEGA DAJANJA CBD NA POTEK SPLOŠNE ANESTEZIJE ...	31
4.2	OCENA INTENZIVNOSTI STRESNEGA ODZIVA PO PREDHODNEM DAJANJU RAZLIČNIH ODMERKOV CBD	33

5	RAZPRAVA.....	40
5.1	VPLIV PREDHODNEGA DAJANJA CBD NA POTEK SPLOŠNE ANESTEZIJE, IZVEDENE Z IZOFLURANOM	40
5.2	ANKSIOLITIČNO DELOVANJE CBD PO INDUCIRANEMU STRESU	42
6	SKLEPI	45
7	POVZETEK	46
8	SUMMARY	48
9	ZAHVALA	50
10	LITERATURA	51

KAZALO TABEL

Tabela 1: Učinki endokanabinoidnega sistema v organizmu glede na interakcijo s posameznimi receptorji	14
Tabela 2: Mehanizem delovanja CBD in učinki na organizem.....	18
Tabela 3: CBD odmerki, ki so jih prejele skupine podgan.....	28
Tabela 4: Prejeti odmerki CBD in omejitve gibanja pri podganah iz posameznih skupin.....	29

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz vezave anandamida na receptor CB1	12
Slika 2: Učinki CBD.....	17
Slika 3: Anatomska skica možganov in ključnih predelov za tvorbo čustev, spomina in strahu, na katere vezava CBD izve anksiolitične učinke CBD.	21
Slika 4: Laboratorijske podgane (<i>Rattus norvegicus</i>) linije Wistar.....	24
Slika 5: Podgana v omejevalniku gibanja.....	25
Slika 6: Prikaz izvajanja testa na odprtem polju.....	26
Slika 7: Časovnica poteka poskusa.....	27
Slika 8: Časovnica poteka poskusa.....	28
Slika 9: Indukcijski čas v splošno anestezijo z izofluranom pri podganah, predhodno tretiranih z različnimi odmerki CBD.....	31
Slika 10: Perioda do pojava prvega refleksa in prebujanja pri podganah, predhodno tretiranih z različnimi odmerki CBD.....	32
Slika 11: Delež gibanja (od 30 minut) v odprtem polju pri podganah, ki so pred omejitvijo gibanja prejele različne odmerke CBD.....	33
Slika 12: Perioda prisotnosti podgan v notranji coni arene, predhodno tretiranih z različnimi odmerki CBD, v notranji coni arene odprtega polja.....	34
Slika 13: Prehojena razdalja (cm) pri podganah, ki so prejele različne odmerke CBD po induciranim stresu v odprtem polju.	35
Slika 14: Število prehodov v osrednjo cono pri podganah, ki so pred induciranim stresom prejele različne odmerke CBD.....	36
Slika 15: Število dvigov na zadnji okončini pri podganah, ki so pred induciranim stresom prejele različne odmerke CBD.	37
Slika 16: Število negovanj področja glave pri podganah, ki so pred induciranim stresom prejele različne odmerke CBD.	38
Slika 17: Koncentracija kortikosterona (ng/ml) v krvni plazmi podgan, ki so pred induciranim stresom prejele različne odmerke CBD	39

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

2-AG 2-arahidonoil glicerol

5HT_{1A} podtip serotonininskega receptorja

ACTH adrenokortikotropni hormon

AEA anandamid ali N-arahidonoil-etanol amin

Ca²⁺ kalcijevi ioni

CB₁ kanabinoidni receptor tipa ena

CB₂ kanabinoidni receptor tipa dva

CBD kanabidiol

CBGA kanabigerolna kislina

CRH kortikoliberin

CYP-450 citokrom 450

FAAH amidna hidrolaza maščobnih kislin

GABA gama-aminomaslena kislina

GliRs glicinski receptor

GPR55 z G-proteinom sklopljeni receptor 55

LSD test najmanjše pomembne razlike; ang. least significant difference

MAGL monoacilglicerolna lipaza

MCT olje srednje verižnih trigliceridov

POMC propiomelanokortikotropin

PPAR γ peroksijski proliferator aktiviran receptor gama

SE standardna napaka

SPSS statistical package for the social sciences

THC tetrahidrokanabinol

TRPV1 vaniloidni receptor; ang. transient receptor potential cation channel subfamily V member 1

1 UVOD

1.1 PREGLED LITERATURE

1.1.1 Fitokanabinoidi

Kanabinoidi so spojine, ki v organizmu reagirajo z endokanabinoidnim sistemom. Po izvoru jih razdelimo na fitokanabinoide, ki se pojavljajo v rastlinskem svetu, endokanabinoide, ki nastajajo v organizmu živali in ljudi, in na sintetične kanabinoide.

Fitokanabinoidi so produkt presnove konoplje *Cannabis sativa* L. Obstaja več podvrst te rastline, ki se razlikujejo po količini psihoaktivnega fitokanabinoida tetrahidrokanabidiola (THC). Poznanih je več kot 100 različnih fitokanabinoidov (Preedy, 2017; Mechoulam, 2005; Bernstein in sod., 2019). Prekurzor biosinteze fitokanabinoidov je kanabigerolna kislina (CBGA), ki s pomočjo encima olivetolat-geraniltransferaze nastane iz olivetolne ali divarinolične kisline in geranil pirofosfata. Ob tem nastanejo sekundarni presnovki terpenofenolne strukture, ki jih po strukturnih značilnostih razvrščamo v 11 skupin (Thomas in sod., 2016; Štrukelj, 2019).

V konoplji (*Cannabis sativa* L.) se fitokanabinoidi nahajajo v obliki karboksilnih kislin. Med postopkom priprave zdravil je potrebno fitokanabinoide s segrevanjem dekarboksilirati, pri čemer postanejo njihovi farmakološki učinki izrazitejši (Tavčar Benkovič, 2019). V nadzemnih delih konoplje se v največji koncentraciji nahajata fitokanabinoide THC in CBD. Obenem je koncentracija posameznih kanabinoidov v konoplji odvisna od genetske predispozicije (podvrste) in starosti rastline ter od pogojev gojenja, kot so izpostavljenost sončni svetlobi, temperatura, vlaga, oskrba z vodo in hranilnimi snovmi (Tavčar-Benkovič in sod., 2019). Tako vsebuje industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L. *subsp. sativa*), ki se sicer uporablja kot surovina za proizvodnjo tkanin, gradbenega materiala, papirja, olja, moke in krme, zelo malo THC (pod 0,2 %), hkrati pa veliko CBD (Bernstein in sod., 2019). Nasprotno indijska konoplja (*Cannabis sativa* L. *subsp. indica*) vsebuje večje količine THC. Znano je, da konoplje vsebujejo več kot 400 različnih kemijskih spojin, od tega več kot 100 fitokanabinoidov (EMCDDA, 2018). V preteklosti se je konopljina smola uporabljala v

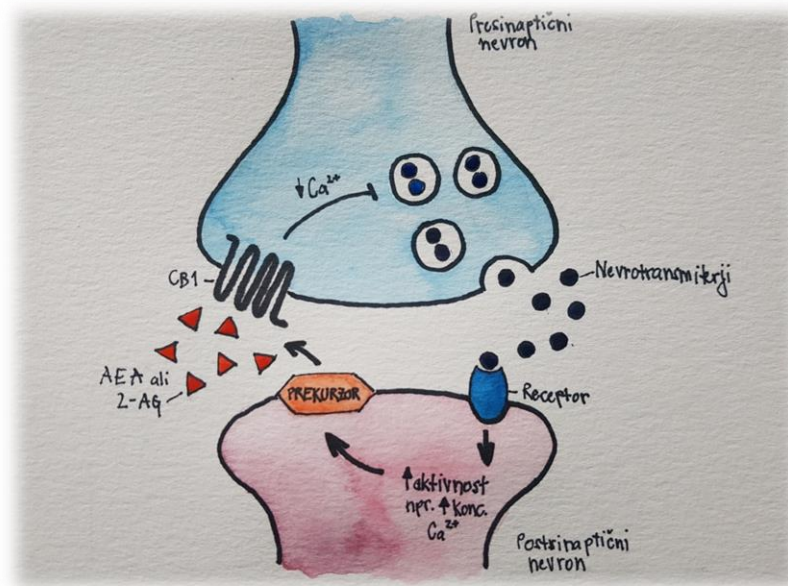
medicinske namene kot zdravilo s spazmolitičnim, sedativnim, analgetičnim in hipnotičnim učinkom. Z razvojem novih zdravil je svoj pomen v medicini izgubila. V zadnjem desetletju so novi podtipi indijske konoplje spet dobili mesto v farmaciji in medicini (EMCDDA, 2018). V konoplji se nahajajo tudi številni terpeni, terpenoidi, flavonoidi, lignani, klorofili, stilbenoidi in alkaloidi, ki so za medicinsko uporabo manj pomembni. Medicinsko pomembnejši spojini sta le psihoaktivni terpen limonen, ki po inhalaciji prispeva k boljšemu razpoloženju, ter mircen, ki deluje pomirjevalno in uspavalno (WHO, 2018).

1.1.2 Endokanabinoidni sistem

Endokanabinoidni sistem sodeluje pri različnih fizioloških procesih v organizmu. Nezanemarljiva je njegova vloga pri razvoju osrednjega živčevja in plastičnosti sinaps, omogoča spominske procese, zmanjšuje zaznavo bolečine, uravnava apetit, sodeluje pri regulaciji telesne temperature, vnetju in prepoznavanju antigenov (Lu in Mackie, 2016). V zgodnjih devetdesetih letih 20. stoletja je spoznanje, da se THC veže na specifične membranske receptorje, vodilo v odkritje endokanabinoidnega sistema (Maroon J. in Bost J., 2018; Shultz in sod., 2018).

Endokanabinoidni sistem sestavljajo endokanabinoidni ligandi, kanabinoidna receptorja 1 (CB1) in 2 (CB2) ter encima monoacilglicerolna lipaza (MAGL) in amidna hidrolaza maščobnih kislin (ang. fatty acid amide hydrolase – FAAH), ki sodelujeta pri sintezi, transportu in razgradnji endokanabinoidov (Patel in sod., 2017).

Endokanabinoidni ligandi so endogeni prenašalci signalov med sosednjimi celicami, na primer med nevroni v sinapsah. Domnevno delujejo kot retrogradni transmiterji, kar pomeni, da signali namesto v smeri od presinaptičnih do postsinaptičnih nevronov potujejo v obratni smeri (slika 1) (Freund in sod., 2003).



Slika 1: Prikaz vezave anandamida (AEA) in arahidonoil glicerola (2-AG) na receptor CB1

Od endokanabinoidnih ligandov sta najbolj raziskana N-arahidonoil-etanol amin ali anandamid (AEA) in 2-arahidonoil glicerol (2-AG). Prekursorja obeh se nahajata v lipidnih membranah sinaps nevronov. Njuno sintezo sproži povišana znotrajcelična koncentracija kalcijevih ionov (Ca^{2+}). Razlikujeta se po afiniteti in moči vezave na kanabinoidne receptorje, pri čemer 2-AG prevladuje v osrednjem živčevju in ima enako afiniteto do receptorjev CB1 kot do CB2. AEA deluje kot delni agonist receptorjev CB1 in CB2. V primerjavi z 2-AG ima manjšo afiniteto do CB1, še težje pa se povezuje s CB2 (Lu in Mackie, 2016; Štrukelj, 2019; Patel in sod., 2017). Kot endokanabinoidni ligandi se v organizmu nahajajo tudi 2-arahidonilgliceril eter (noladin), O-arahidoniletanolamin (virodhamin) in N-arahidonildopamin. Sintetizirajo se večinoma v membranah postsinaptičnih nevronov, pri čemer njihova vloga še ni povsem pojasnjena (Maroon in Bost, 2018; Patel in sod., 2017). Kanabinoidna receptorja CB1 in CB2 sta sklopljena s proteinom G. CB1 se nahajajo na presinaptičnih membranah nevronov v osrednjem in perifernem živčevju. Največja gostota CB1 je v jedrih bazalnih ganglijev, skorji velikih možganov, hipokampusovem kompleksu (*gyrus dentatus*), mandljastem telesu (*amygdala*) in v malih možganih. Zaradi specifične lokacije domnevno sodelujejo pri spominskih in čustvenih procesih, vplivajo na zaznavo bolečine, spodbujajo apetit ter sodelujejo pri časovni percepciji in propiocepciji (Maroon in

Bost, 2018; Klumpers in Thacker, 2018). Manjša gostota CB1 je v možganskem deblu, podaljšani hrbtenjači in pomolu srednjih možganov. (Galiègue, 1995).

Receptorjev CB2 je v osrednjem živčevju relativno malo, številnejši so v limfatičnem sistemu, predvsem na površini limfocitov B in celic ubijalk, v tkivu vranice, timusa, tonzil in v gastrointestinalnem traktu. Sodelujejo pri imunskem odzivu in vnetnih procesih (Maroon in Bost, 2018; Lu in Mackie, 2016; Klumpers in Thacker, 2018; Galiègue, 1995; Wright, 2008). V zadnjih letih je bilo ugotovljeno, da se endokanabinoidi povezujejo tudi z nekaterimi nekanabinoidnimi receptorji, kot so vaniloidni receptor 1 (TRPV1) (ang. transient receptor potential cation channel subfamily V member 1), (Costa in sod., 2004; Wang, 2012), z G proteinom sklopljeni receptor 55 (GPR55) (Ryberg, 2007; Moriconi, 2010) in s peroksisomskim proliferatorjem aktiviran receptor gama (PPAR γ) (Lu in Mackie, 2016; Ryberg, 2007; Moriconi, 2010). TRPV1 se nahajajo v senzoričnih vlaknih perifernega živčevja. Sodelujejo pri prenosu in modulaciji bolečinskih dražljajev (nocicepcija) in pri uravnavanju telesne temperature (Cui, 2006; Husang, 2002; Costa, 2004; Wang, 2012).

Endokanabinoidi se sprostijo v sinaptično špranjo iz postsinaptičnega nevrona in se na presinaptični membrani vežejo na CB1 (slika 1). Aktivacija kanabinoidnih receptorjev na presinaptičnem nevronu zaviralno vpliva na sproščanje ostalih nevrotransmitorjev, npr. glutamata, kar privede do zmanjšane vzdražljivosti ustreznih nevronov. Zaviranje sproščanja γ -aminomaslène kisline (GABA) kot inhibitornega prenašalca pa se nasprotno odraža v povečani vzdražljivosti postsinaptičnih nevronov (Freund in sod., 2003; Maroon in Bost 2018). Prisotnost kanabinoidnih receptorjev v različnih tkivih se odraža v raznolikem delovanju endokanabinoidnega sistema. V tabeli 1 so povzeti učinki endokanabinoidnega sistema.

Tabela 1: Učinki endokanabinoidnega sistema v organizmu glede na interakcijo s posameznimi receptorji

Vrsta receptorja	Učinki	Vir
CB1	• zmanjšanje slinjenja in bruhanja • povečanje apetita • povečanje intraokularnega tlaka • zaviranje sproščanja nevrottransmitorjev (GABA) iz presinaptičnega nevrona v osrednjem živčevju	Zou in Kumar, 2018; Maroon in Bost, 2018; Klumpers in Thacker, 2018
CB2	• protivnetno delovanje • apoptoza pri nekaterih vrstah raka • sproščanje citokinov • upočasnevanje napredovanja ateroskleroze	Zou in Kumar, 2018; Ferjan in sod., 2015; Munro in sod, 1993; Maroon in Bost, 2018; Lu in Mackie, 2016; Klumpers in Thacker, 2018; Galiègue, 1995; Wright, 2008
PPAR γ	• protivnetno delovanje • nevroprotektivno delovanje • homeostaza glukoze	Iannotti in Vitale, 2021; Ryberg, 2007; Moriconi, 2010
TRPV1	• modulacija bolečinskih signalov • protivnetno delovanje • uravnavanje telesne temperature	Costa, 2004; Wang, 2012; Cui, 2006; Husang, 2002
GPR55	• vazodilatacija • protivnetno delovanje • vpliv na prenos bolečinskih signalov	Ryberg, 2007; Moriconi, 2010

V humani medicini imajo čedalje večji pomen tudi sintetični kanabinoidi. Ti v primerjavi s fitokanabinoidi delujejo selektivno na kanabinoidne receptorje. V to skupino zdravil so uvrščeni tako agonisti kot antagonisti kanabinoidnih receptorjev. Njihova morebitna vloga pri terapiji različnih bolezni ostaja predmet številnih raziskav, zaenkrat pa so klinično pomembni predvsem s toksikološkega vidika, saj je njihova dostopnost na črnem trgu pogosto vzrok zastrupitev zaradi prevelikih odmerkov (Alipour in sod., 2019).

1.1.3 Kanabidiol (CBD)

CBD je fitokanabinoid, ki so ga v zgodnjih letih prejšnjega stoletja izolirali iz ekstrakta konoplje (*Cannabis sativa* L) (Adams in sod., 1940), dobri dve desetletji kasneje pa so natančno določili njegovo kemično strukturo (2-[(6R)-6-isopropenil-3-metil-2-cikloheksen-1-il]-5-pentil-1,3-benzen-diol) (Mechoulam, 1963).

CBD je poleg THC v konoplji najbolj zastopan fitokanabinoid. Pri sobni temperaturi je belo rumenkast kristal z vreliščem pri 175°C (APA, 2021).

1.1.3.1 Farmakokinetika CBD

Rezultati farmakokinetičnih študij, ki so bile opravljene na ljudeh, kažejo, da je intenzivnost absorpcije CBD odvisna od načina vnosa. Tako biološka uporabnost pri inhaliranju znaša 31 %, ob nanosu pršila na ustno sluznico 13 do 19 %, po peroralnem vnosu pa le 6 % (Bernstein in sod., 2019). Pri psih so bile po peroralni aplikaciji opažene velike individualne razlike, saj je bila absorpcija od 0 do 19 % (Gamble in sod., 2018). Kot ostali kanabinoidi je tudi CBD topen v maščobah, kar poveča hitrost razporeditve v telesu (Bernstein in sod., 2019). Po večkratnem vnosu se kopiči v maščobnem tkivu in se tako počasneje izloča iz organizma (Kržan, 2019). V sistemske krvnem obtoku je 95 % CBD vezanega na proteine krvne plazme, volumen distribucije pa je 32 l/kg (Booth in Bohlmann, 2019).

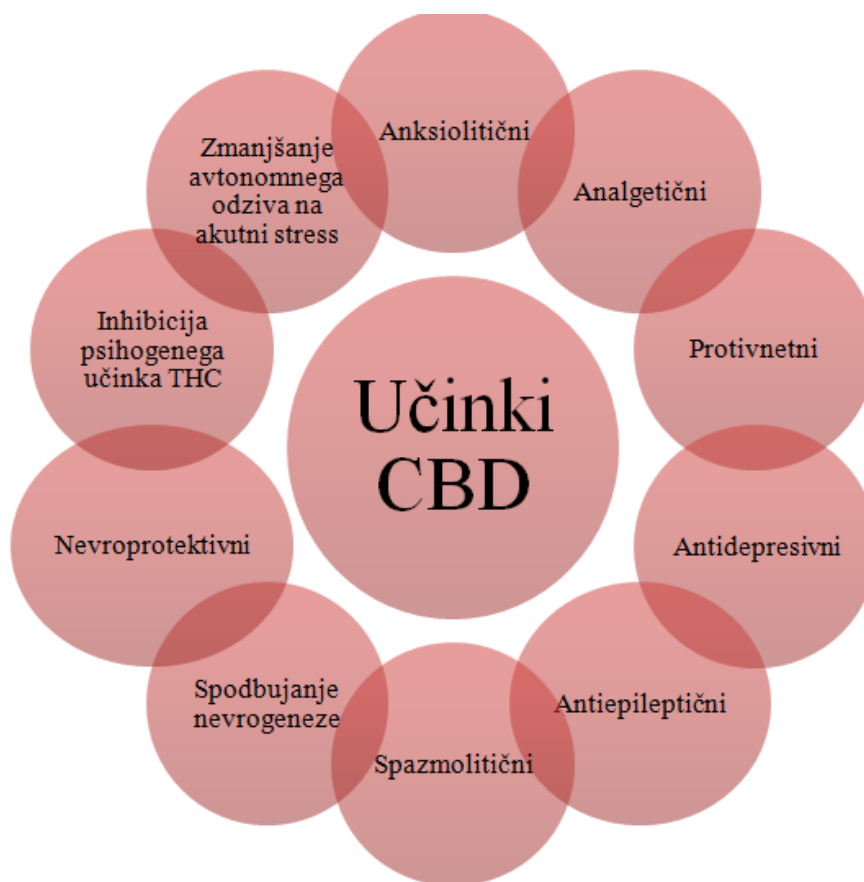
Presnova v jetrih poteka ob delovanju encimskega sistema CYP-450 (Hawksworth in McArdle, 2004). Poznanih je 33 presnovkov CBD, ki se izločajo z urinom in žolčem. Glavni presnovek je farmakološko neaktivni 7-karboksikanabidiol, v večji meri pa je prisoten tudi aktivni 7-hidroksikanabidiol (Kržan, 2019; McPartland in sod., 2015).

1.1.3.2 Farmakodinamika in učinki CBD

Učinki CBD na delovanje endokanabinoidnega sistema so lahko posredni ali neposredni. Slednji nastanejo kot posledica vezave na receptorje CB1 in z manjšo afiniteto na receptorje CB2. Pri miših CBD ne povzroča tipičnih psihotropnih učinkov, značilnih za THC, kot so hipotermija in zmanjšana lokomotorna in kognitivna aktivnost (Pertwee, 2008; Long in sod., 2010). Tudi računalniška tomografija možganov živali in ljudi je pokazala nasprotujoče si učinke CBD in THC (Batalla in sod., 2014). Ugotovljeno je bilo tudi, da CBD zavira anksiogene in psihotične učinke, povzročene s THC (Zuardi in sod., 1981; Zuardi in Karnio, 1983). Nekateri avtorji predvidevajo, da CBD deluje kot negativni alosterični modulator receptorjev CB1 in kot nekompetitivni antagonist endokanabinoidov in THC (McPartland in sod., 2015; Laprairie in sod., 2018). Negativni alosterični modulatorji ne preprečujejo vezave ortosteričnih ligandov na ortosterična vezavna mesta na receptorju, ampak le zmanjšujejo njihovo učinkovitost (Fasinu in sod., 2016; Kržan, 2019).

Poleg tega ima CBD afiniteto tudi do drugih receptorjev, ki so prisotni v osrednjem živčevju: GPR55, TRPV1 in 5HT1A (Ibeas in sod., 2015), PPAR γ (Campos in sod., 2012), obenem pa tudi zavira ponovni privzem inhibirajočega nevrottransmitorja adenoizina (Campos in sod., 2012; Carrier in sod., 2006).

Posredni učinki CBD se odražajo v zaviranju ponovnega privzema anandamida in aktivnosti FAAH, kar upočasni presnovo anandamida. To privede do povečanja koncentracije in učinkov anandamida (Campos in sod., 2012; Bisogno in sod., 2001; Mechoulam in sod., 2011; Zuardi in sod., 2017). Učinki CBD na organizem so prikazani na sliki 2.



Slika 2: Učinki CBD (Campos in sod., 2012; Bisogno in sod., 2001; Qin in sod., 2008; Devinsky in sod., 2017; Devinskiy in sod., 2018; WHO, 2017; Ibeas in sod., 2015; Mechoulam in sod., 2011; Zuardi in sod., 2017)

Mehanizem delovanja CBD je večstranski. Kot je prikazano v tabeli 2, je bila v pogojih *in vitro* ugotovljena afiniteta CBD do različnih receptorjev.

Tabela 2: Mehanizem delovanja CBD in učinki na organizem

Vezavno mesto (receptor)	Mehanizem	Učinki	Vir
CB1	negativni alosterični modulator oz. antagonist receptorja CB1	• nevroprotektivni • protivnetni • antikonvulzivni • antidepresivni • anksiolitični • nevrogeneza hipokampusa	Campos in sod., 2012; Laprairie in sod., 2018; Rajesh in sod., 2007; Hill in sod., 2012; Bisogno in sod., 2001
CB2	alosterični modulator oziroma inverzni agonist CB2	• nevroprotektivni • antioksidantni • protivnetni • antidepresivni • anksiolitični • nevrogeneza hipokampusa	Martínez-Pinilla, in sod., 2017; Campos in sod., 2012; Bisogno in sod., 2001
TPRV2	agonist Ob vezavi liganda (anandamid, kapsaicin, CBD) povzroči sproščanje glutamata	• analgetični • inhibicija sproščanja vnetnih citokinov	Qin in sod., 2008; Devinsky in sod., 2017; Devinsky in sod., 2018; Gamble in sod., 2018; Li in sod., 2018; Napimoga in sod., 2009; Kozela in sod., 2011; Xing in Li, 2007
5HT1A	agonist receptorja 5HT1A	• antidepresivni • anksiolitični • zmanjšan odziv na akutni stres • nevroprotektivni • antiemetični	Martínez-Pinilla in sod., 2017; Mishima in sod., 2005; Magen in sod., 2010; Rock in sod., 2012
GPR55	inverzni agonist GPR55	• preprečuje vezavo ligandov na GPR55	WHO, 2017; Ibeas in sod., 2015)
PPAR γ	agonist receptorja PPAR γ	• zaviranje oksidativnega stresa • nevroprotektivni	Campos in sod., 2012
Glicinski receptorji (GliRs)	poveča aktivnost glicinskih receptorjev oziroma deluje kot agonist glicinskih receptorjev	• analgetični • protivnetni • zmanjšuje zaznavo nevropatske bolečine	Ibeas in sod., 2015; Xiong in sod., 2012
Adenozinski receptorji	inhibira adenozin transporter encim in inhibira privzem adenozina	• zavira ponovni privzem adenozina, • imunosupresivni	Carrier in sod., 2006; Campos in sod., 2012
Anandamid	zaviranje delovanja FAAH in zaviranje ponovnega privzema anandamida	• antidepresivni • anksiolitični • nevrogeneza hipokampusa	Campos in sod., 2012; Bisogno in sod., 2001; Mechoulam in sod., 2011; Zuardi in sod., 2017

1.1.3.3 Vpliv CBD na splošno anestezijo

Številne študije nakazujejo, da prisotnost fitokanabinoidov v organizmu vpliva na potek splošne anestezije. Ugotovljeno je bilo, da predhodna izpostavljenost THC ali CBD vpliva na trajanje splošne anestezije in na odmerke anestetika, potrebnega za uvod v splošno anestezijo (Paton in Pertwee, 1972; Paton in Temple, 1972; Patel in sod., 2003; Chesher in sod., 2006, Frizza in sod., 1977; Echeverria-Villalobos in sod., 2019). Interakcija med kanabinoidi in splošnimi anestetiki nastane, ker obe skupini zdravil vplivata na sinaptično transmisijo in sproščanje nevrottransmitorjev (Echeverria-Villalobosa in sod., 2019). Vpliv kanabinoidov na potek splošne anestezije je bil predmet raziskav že v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja, ko so ugotovili, da premedikacija s THC pri miših povzroči daljšo splošno anestezijo, izvedeno z etrom (Malor in sod., 1975). Na modelu laboratorijskih glodavcev je bilo ugotovljeno tudi od odmerka THC odvisno podaljšanje splošne anestezije, izvedene s fenobarbitalom, ketaminom, tiopentalom in propanididom (Frizza in sod., 1977). Dokazan je bil tudi vpliv CBD na podaljšanje splošne anestezije s fenobarbitalom, na potek anestezije s ketaminom, tiopentalom, propanididom in alfatesinom pa premedikacija s CBD ni imela značilnega učinka (Frizza in sod., 1977). Študije vplivov kanabinoidov na potek splošne anestezije pri ljudeh v večini primerov obravnavajo zaplete pri izvajanju splošne anestezije pri pacientih, ki uporabljajo konopljo ali njene ekstrakte. Za uspešno uvajanje v splošno anestezijo pri ljudeh, ki so bili predhodno izpostavljeni kanabinoidom, je treba uporabiti večje odmerke propofola (Flisberg in sod., 2009), hkrati pa se globina anestezije pri pacientih, ki so pred anestezijo jemali ekstrakte konoplje, izraža z višjim bispektralnim indeksom (Ibera in sod., 2018).

1.1.3.4 Anksiolitični učinek CBD

Predklinično preučevanje in vrednotenje anksiolitičnih učinkov CBD se lahko ocenjuje z različnimi vedenjskimi testi na laboratorijskih glodavcih. Guimaraes in sod. (1994) so s testom dvignjenega labirinta pri podganah ugotovili anksiolitično delovanje CBD v odmerkih od 2,5 do 10 mg/kg. Tudi Moreira in sod. (2006) navajajo, da CBD v odmerku 10 mg/kg ali diazepam v odmerku 3 mg/kg povzročata primerljive anksiolitične učinke. Podgane, ki so

prejele navedeni učinkovini, so v primerjavi s kontrolnimi večkrat pile vodo kljub sledeči izpostavljenosti električnemu toku. Obenem je test vzdržljivosti plavanja pri miših, tretiranih s CBD, potrdil nižjo stopnjo depresije (Sales in sod., 2019). Znano je tudi, da CBD pri ljudeh odpravlja glosfobijo in blaži tremo, hkrati pa ne vpliva na raven kortizola v krvi (Bergamaschi in sod., 2011; Crippa in sod., 2004; Zuardi in sod., 1993).

Domnevno anksiolitični in antidepresivni učinki temeljijo na vezavi CBD na serotoninске receptorje 5HT1A v limbičnem sistemu, vključno z anteriorno obročaso vijugo, mandljastim telesom (amigdalno) (Fusar-Poli, 2010) in medialno prefrontalno skorjo (slika 3) (Campos in sod., 2012). Ti predeli osrednjega živčevja so ključni za pojav čustev, spomina in strahu (Crippa in sod., 2018).

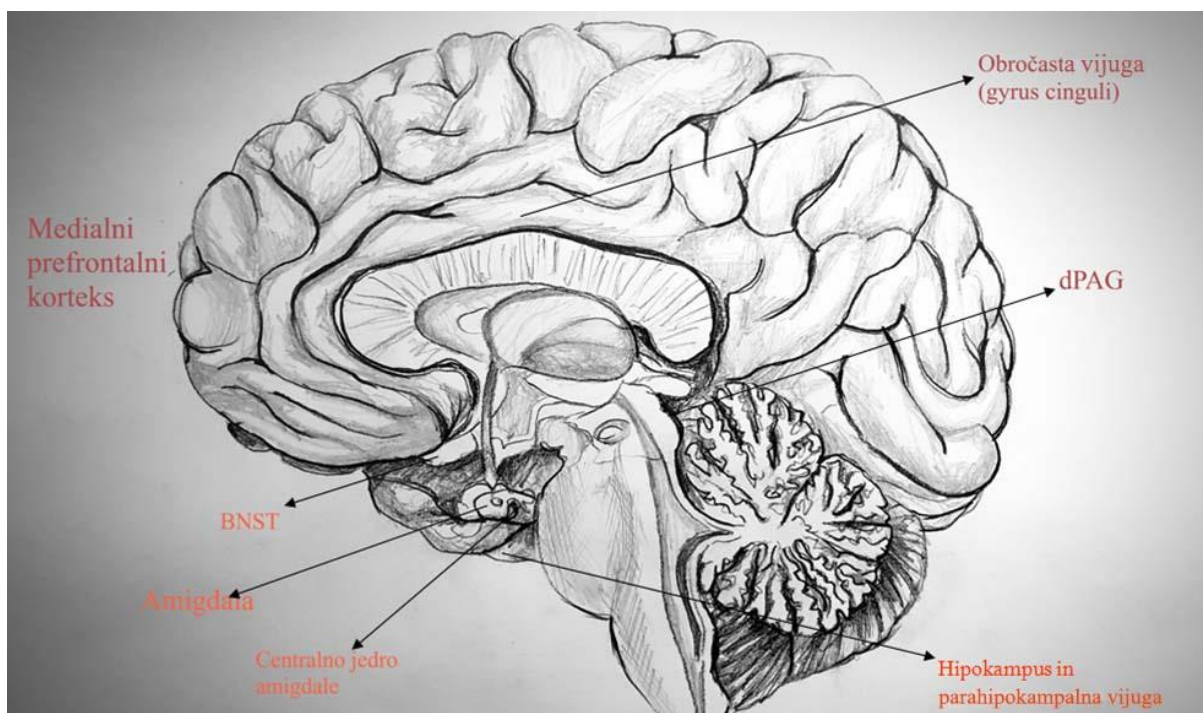
1.1.3.5 Vpliv CBD na intenzivnost odziva organizma na stresne dejavnike

Stresni odziv organizma je fiziološki proces, ki ob prisotnosti neugodnih dražljajev iz okolja (stresorjev) ohranja homeostazo. Amigdala, hipokampus in ventromedialni predel prefrontalnega korteksa vključujejo nevronske povezave v možganih, ki sodelujejo pri uravnavanju stresnih odzivov. Signali potujejo po stresni osi (hipotalamus – hipofiza – nadledvična žleza) in aktivirajo avtonomni živčni sistem, ki uravnava fiziološke odzive na stresne situacije. Regulacija deluje po principu negativne povratne zanke. Povišana koncentracija kortizola v krvi zavira nastajanje kortikoliberina (CRH) v hipotalamusu, zaradi česar se v hipofizi tvori manj proopiomelanokortikotropina (POMC), kot predhodnika adrenokortikotropnega hormona (ACTH). Znižana raven ACTH povratno vpliva na zmanjšanje tvorbe kortizola v skorji nadledvičnih žlez. Morebitni vpliv CBD na delovanje osi hipotalamus – hipofiza – nadledvična žleza ni poznan. Ranganathan in sod. (2008) niso ugotovili vpliva CBD na znižanje koncentracije kortizola v krvi pri ljudeh. Raziskave na glodavcih pa so pokazale, da CBD oslabi akutni avtonomni odziv na stres (zniža krvni tlak in frekvenco srca), medtem ko povzroča tretiranje z antagonistom receptorja 5HT1A nasprotnе učinke. Domnevno naj bi bil zmanjšan odziv organizma na stres po tretiranju s CBD prav posledica njegovega agonističnega delovanja na receptorje 5HT1A (Restel in sod., 2009). Tudi nadaljnje študije nakazujejo, da CBD deluje protistresno zaradi vezave na receptorje 5HT1A v limbičnem sistemu (slika 3). S tem vpliva na ključne procese, ki usklajujejo

delovanje avtonomnih, nevroendokrinih in motoričnih sistemov, kar pogojuje fiziološke funkcije in vedenje (Gomes in sod., 2013).

Prikaz odnosa med odmerkom CBD in posledičnim učinkom predstavlja obrnjeno U krivuljo. To nakazuje, da povzroča tako pri nizkih kot pri visokih odmerkih podobne ali nične učinke. Ugotovljeno je bilo namreč, da pri miših v odmerku 2,5 do 10 mg/kg deluje anksiolitično, pri odmerku 20 mg/kg pa anksiogeno (Guimaraes in sod., 1990; Zuardi in sod., 2017).

Predvidoma visok odmerek CBD aktivira receptorje TRPV1, kar pospeši izločanje glutamata. Slednji nevtralizira anksiolitične učinke, sprožene prek receptorja 5HT1A (Guimaraes in sod., 1990; Campos in Guimaraes, 2008). Domnevo sta potrdila tudi Campos in Guimaraes (2009); po intracerebralni aplikaciji antagonista TRPV1 kapsazepina sta tudi po visokih omerkih CBD opazila anksiolitični učinek.



Slika 3: Anatomska skica možganov in ključnih predelov za tvorbo čustev, spomina in strahu, na katere vezava CBD izove anksiolitične učinke

BNST (bed nucleus of the stria terminalis) – posteljno jedro terminalne strije
dPAG (dorsal periaqueductal gray) - dorzalna periakveduktalna sivina

1.2 OPREDELITEV PROBLEMA

Kanabidiol (CBD) je fitokanabinoid rastlin iz rodu *Cannabis*. V humani medicini se uporablja za zdravljenje bolečine in epilepsije ter za spodbujanje apetita. Tudi v veterinarski medicini se uporaba CBD povečuje predvsem pri pacientih s kronično bolečino, epileptikih in onkoloških pacientih. V literaturi so zabeleženi analgetični, anksiolitični, antiepileptični, spazmolitični, antidepressivni, nevroprotektivni, protivnetni in ostali učinki CBD, kot prikazuje slika 2.

Mehanizem delovanja CBD je večplasten. Domnevno se farmakološki učinki izražajo ob interakciji CBD z različnimi celičnimi receptorji, kar vpliva na številne procese, med drugim tudi na odziv osrednjega živčevja na zunanje dražljaje.

Kanabinoidom se pripisujejo številni zdravilni učinki, ki temeljijo predvsem na opažanjih posameznikov. Do relevantnih podatkov o vplivu CBD in drugih kanabinoidov na organizem pa lahko privedejo le načrtovane in ciljno usmerjene raziskave. Z našo raziskavo želimo s poskusi na živalih in natančnejšimi meritvami ovrednotiti vpliv predhodnega dajanja CBD na potek splošne anestezije ter oceniti njegovo anksiolitično delovanje.

2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

2.1 CILJ RAZISKOVANJA

Namen naše raziskovalne naloge je na modelu laboratorijskih podgan oceniti vpliv CBD na potek splošne anestezije ter ugotoviti anksiolitični učinek CBD ob izpostavljenosti stresu. Ovrednotiti želimo korelacijo med odmerkom in stopnjo sedativnega, ter anksiolitičnega delovanja CBD. Poleg tega želimo oceniti možnost uporabe CBD kot zdravila s sedativnim in anksiolitičnim delovanjem.

2.2 DELOVNI HIPOTEZI

Postavili smo naslednji hipotezi:

- CBD v ustreznem odmerku skrajša čas uvoda v splošno anestezijo in vpliva na čas prebujanja iz splošne anestezije.
- Premedikacija s CBD zniža intenzivnost stresnega odziva.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Živali v raziskavi

V poskus je bilo vključenih 36 SPF laboratorijskih podgan (*Rattus norvegicus*), samic linije Wistar, starih od 7 do 8 tednov (slika 4). Kupili smo jih pri pooblaščenem dobavitelju laboratorijskih živali Envigo Italy. Ob nastanitvi smo podgane naključno razdelili v šest skupin po šest živali. Namestili smo jih v polipropilenske kletke z dimenzijami 66 x 20 x 40 cm (slika 4), ki so se nahajale v prostoru s standardnimi laboratorijskimi pogoji z nadzorovano temperaturo (22 do 25 °C), relativno vlago (30 do 70 %) ter z 12 -urnim dnevno nočnim ritmom. Hrano in vodo so imele na razpolago *ad libitum*. S poskusi smo pričeli sedem dni po prispetju živali v naš laboratorij.



Slika 4: Laboratorijske podgane (*Rattus norvegicus*) linije Wistar

3.1.2 Učinkovine

- CBD v obliki oljne raztopine, s koncentracijo 100 mg/ml (Lekarna Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, Ljubljana, Slovenija). Originalno raztopino CBD smo

redčili z oljem srednjeveržnih trigliceridov in pripravili raztopine s koncentracijami (0,4, 2,0, 4,0, in 20,0 mg/ml).

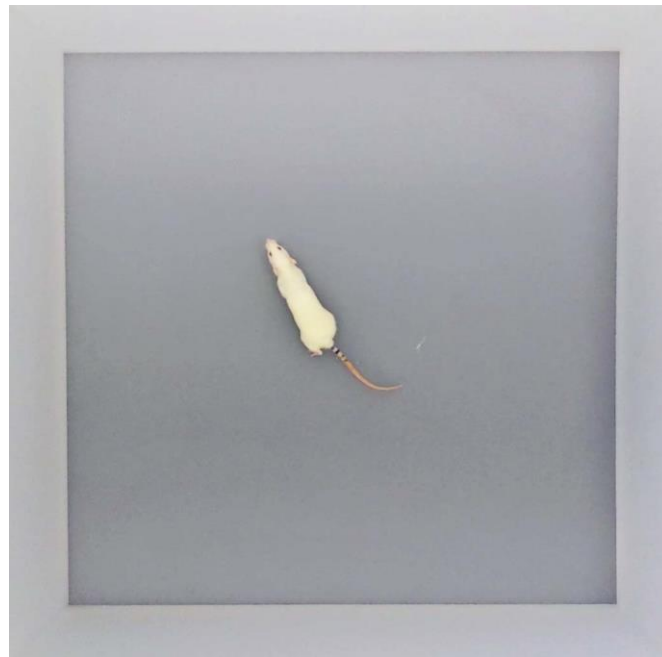
- Olje srednjeveržnih trigliceridov (olje MCT) (Lekarna Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, Ljubljana, Slovenija).
- Izofluran (Isoflurin, Vetpharma Animal Health, Barcelona, Španija).

3.1.3 Oprema

- Inhalacijski anestezijski aparat (Eickemeyer, Sunbury-on-Thames, Velika Britanija)
- Omejevalnik gibanja: polietilenska komora (slika 5).
- Odprto polje z dimenzijami 1 x1 x 0,4 m, omejeno z motnim pleksi steklom (polimetilmetakrilat), smo namestili v poseben prostor, osvetljen z neonsko svetilko in ogret na temperaturo 21 do 23 °C. Z višine enega metra je bilo omogočeno snemanje celotnega odprtega polja. Odprto polje je prikazano na sliki 6.
- Epruvete z antikoagulantom K3EDTA (Microvette, Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija).



Slika 5: Podgana v omejevalniku gibanja



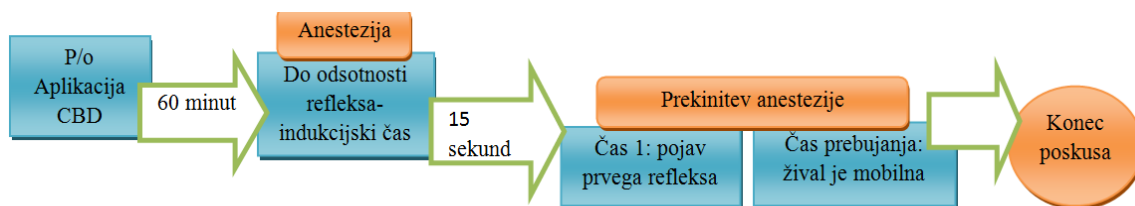
Slika 6. Prikaz izvajanja testa na odprtem polju

3.2 METODE

3.2.1 Ugotavljanje vpliva premedikacije s CBD na potek splošne anestezije

Uporaba živali je bila odobrena z dovoljenjem št. U34401-15/2019/8 z dne 2. 10. 2019, ki ga je izdala Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin. Pri delu s poskusnimi živalmi smo upoštevali etične smernice in zakonske predpise Evropske unije in Republike Slovenije. S poskusi smo pričeli sedem dni po nastanitvi podgan v prostore Inštituta za predklinične vede Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Tri ure pred začetkom poskusa smo živalim odtegnili hrano, na razpolago pa so imele pitno vodo. Poskus je potekal po opisanem protokolu (slika 7).



Slika 7: Časovnica poteka poskusa

- Aplikacija CBD z orogastrično sondo; živali iz posamezne skupine so prejele CBD v odmerkih, ki so prikazani v tabeli 3. Skupina, ki je prejela 0 mg/kg, je prejela le olje MCT, ki se uporablja kot topilo, in je služila kot kontrola. Volumski odmerek apliciranega CBD je bil 0,5 ml na 100 g telesne mase.
- Po aplikaciji CBD je žival 60 minut ostala v domači kletki (slika 4).
- Indukcijsko komoro inhalacijskega anestezijskega aparata (Eickemeyer, Sunbury-on-Thames, Velika Britanija) smo napolnili s 4 % izofluranom v kisiku (nastavitev na hlapilniku).
- Podgano smo nato v indukcijski komori izpostavili 4 % izofluranu, pretok mešanice plinov je bil 4 l/min, in začeli meriti čas.
- Ko se je žival umirila, smo preverili prisotnost umaknitvenega refleksa okončine, tako da smo s pinceto nežno stisnili četrti prst zadnje leve okončine. Stisk s pinceto smo ponavljali vsakih pet sekund do odsotnosti refleksa in zabeležili trajanje uvoda v splošno anestezijo, torej čas od prvega stika živali z izofluranom do odsotnosti refleksa.
- Po odsotnosti umaknitvenega refleksa smo žival še 15 sekund pustili v indukcijski komori, izpostavljeno 4 % izofluranu.
- Po 15 sekundah smo žival vzeli iz indukcijske komore, s tem prekinili izpostavljenost izofluranu, in jo položili na grelno ploščo, ogreto na 37 °C.
- Med prebujanjem smo izmerili čas do pojava umaknitvenega refleksa, tako da smo vsakih pet sekund s pinceto ponovno stiskali četrti prst zadnje leve okončine.
- Nazadnje smo izmerili še čas prebujanja iz splošne anestezije, to je čas, od prekinitve izpostavljenosti izofluranu, do trenutka, ko se je žival začela gibati.

Da bi preprečili neželjena odstopanja pri preverjanju prisotnosti umaknitvenih refleksov, je te postopke ves čas poskusa izvajala ista oseba. Vsaka skupina živali je bila samo enkrat vključena v opisani protokol. Različni odmerki CBD, katerim so bile izpostavljene skupine živali v poskusu, so prikazani v tabeli 3. Živali iz kontrolne skupine so prejele le olje MCT.

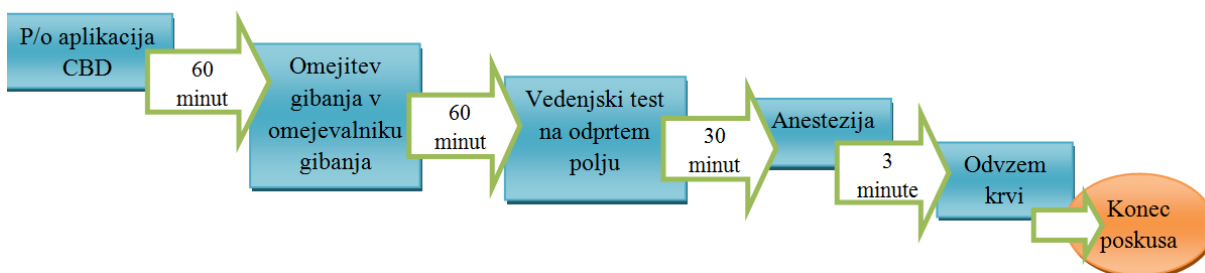
Tabela 3. CBD odmerki, ki so jih prejele skupine podgan

	Skupina 1 (n=6)	Skupina 2 (n=6)	Skupina 3 (n=6)	Skupina 4 (n=6)	Kontrolna skupina (n=6)
CBD (mg/kg)	2	10	20	100	0

3.2.2 Ocena intenzivnosti stresnega odziva po premedikaciji z različnimi odmerki CBD

V postopke so bile vključene iste živali kot pri ugotavljanju vpliva CBD na splošno anestezijo in šest dodatnih živali, ki predhodno niso bile vključene v poskus. Med postopkoma je preteklo od dva do tri tedne, starost živali pri oceni vpliva CBD na stresni odziv je bila 10 do 11 tednov.

Tri ure pred začetkom poskusa živali niso imele dostopa do hrane, imele pa so na razpolago pitno vodo. Poskus je potekal po sledečem protokolu (slika 8).



Slika 8: Časovnica poteka poskusa

- Podgani smo z orogastrično sondo v želodec aplicirali CBD v volumskem odmerku 0,5 ml na 100 g telesne mase. Odmerki CBD so navedeni v tabeli 4.

- Po aplikaciji smo žival 60 minut pustili v domači kletki (slika 4).
- Stres smo sprožili s 60 minutno omejitvijo gibanja (slika 5).
- Nato smo žival iz omejevalnika gibanja neposredno prestavili na odprto polje za 30 minut in posneli njeno obnašanje (slika 6).
- Z namenom zmanjšanja olfaktornih signalov iz predhodnih na naslednje teste na odprtem polju, smo po vsakem testu površino polja očistili in prebrisali s 70 % etanolom.
- Nato smo z inhalacijskim anestezijskim aparatom (Eickemeyer, Sunbury-on-Thames, Velika Britanija) izvedli splošno anestezijo s 4 % izofluranom.
- Po nastopu splošne anestezije smo podgano iz komore položili na grelno ploščo, ogreto na 37 °C, in s punkcijo retroorbitalnega venskega sinusa s hepariniziranimi mikrohematokritskimi cevki (Euroglass, Ljubljana, Slovenija) za določanje koncentracije kortikosterona v epruveto z antikoagulantom K3EDTA odvzeli 500 µl krvi.

Postopki z živalmi iz posameznih skupin so razvidni iz tabele 4.

Tabela 4: Prejeti odmerki CBD in omejitev gibanja pri podganah iz posameznih skupin

	Skupina 1 (n=6)	Skupina 2 (n=6)	Skupina 3 (n=6)	Skupina 4 (n=6)	Skupina 5 (n=6)	Kontrola (n=6)
CBD (mg/kg)	2	10	20	100	0	0
Omejitev gibanja	da	da	da	da	da	ne

3.2.2.1 Opis vedenjskih parametrov

Pri vsaki podgani smo spremljali naslednje vedenjske parametre:

- čas prisotnosti v osrednji coni arene odprtega polja (minute),
- delež gibanja na odprtem polju,

- prehojena razdalja (cm),
- število prehodov v osrednjo cono arene odprtega polja,
- število dvigov na zadnji okončini,
- število negovanj področja glave.

Čas prisotnosti v osrednji coni arene odprtega polja (min), delež gibanja na odprtem polju in prehojeno razdaljo (cm) smo analizirali z računalniškim programom ToxTrack, UMEÅA University, Umeå, Švedska, število prehodov v osrednjo cono, število dvigov na zadnji okončini in število negovanj pa z ogledom posnetkov (slika 6).

3.2.2.2 Ugotavljanje koncentracije kortikosterona v krvni plazmi

Koncentracijo kortikosterona smo določili s komercialnim kompletom za določanje kortikosterona pri laboratorijskih glodalcih (Corticosterone rat/mouse ELISA kit, Demeditec, Kiel, Nemčija), po navodilih proizvajalca.

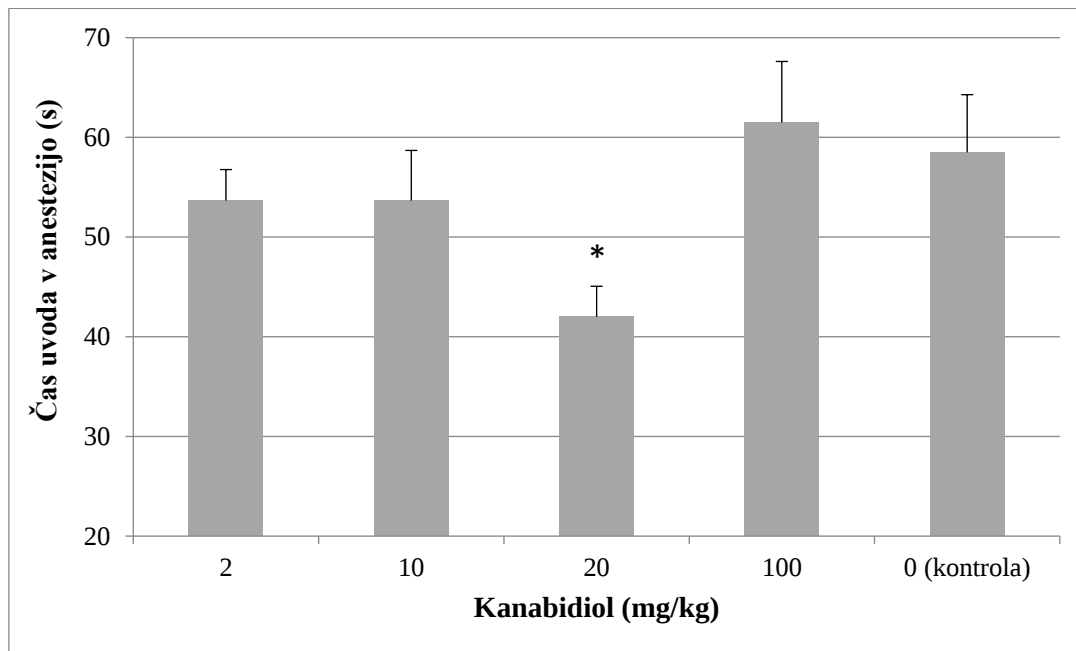
3.2.3 Statistična analiza

Izračun moči študije pri 80 %, ki smo ga izvedli s spletnim orodjem ClinCalc (LLC, Arlington Heights, ZDA), dosegljivo na spletni strani <https://clincalc.com/stats/samplesize.aspx>, je pokazal, da bi za ugotovitev predvidenih 20 % razlik pri ugotavljanju učinka CBD ob vrednosti alfa 0,05 potrebovali pet živali v posamezni skupini. Zaradi možnosti izgube posamezne živali med poskusom smo v posamezno skupino vključili šest živali. Statistično vrednotenje smo opravili z različico 24 programske opreme SPSS (IBM, Chicago, ZDA). Porazdelitev podatkov smo ocenili s testom po Shapiru in Wilku. Zaradi normalnosti porazdelitve podatkov smo statistično značilnost med vrednostmi, ki prikazujejo vpliv različnih odmerkov CBD na potek splošne anestezije in intenzivnost stresnega odziva, ovrednotili z enosmerno analizo variance in uporabo testa najmanjše pomembne razlike (LSD *post-hoc* test). Kot značilno smo privzeli vrednost $P < 0,05$. Rezultati so prikazani kot aritmetična sredina $\pm$ standardna napaka (SE).

4 REZULTATI

4.1 VPLIV PREDHODNEGA DAJANJA CBD NA POTEK SPLOŠNE ANESTEZIJE

Vpliv različnih odmerkov CBD na čas uvoda v splošno anestezijo je prikazan na sliki 9.



Slika 9: Čas uvoda v splošno anestezijo z izofluranom pri podganah, ki so predhodno prejele različne odmerke CBD

Legenda:

* – vrednost se značilno ($P < 0,05$) razlikuje od vrednosti, ki je bila ugotovljena pri kontrolni skupini

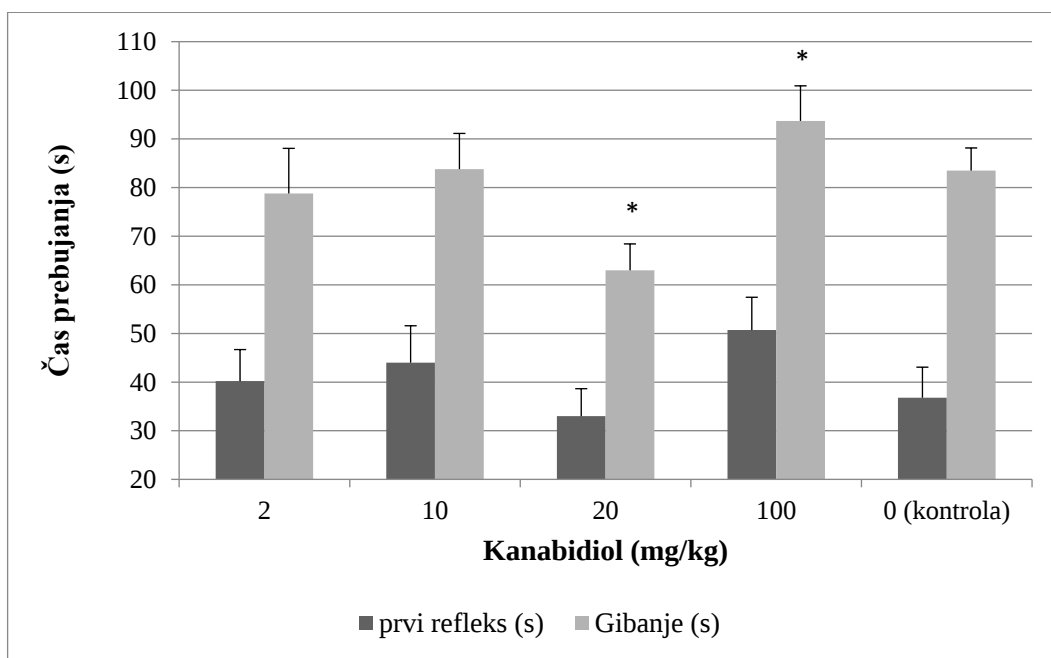
Figure 9. The induction period in isoflurane anesthesia in rats which were pretreated with different doses of CBD

Legend:

* – value differs significantly ($P < 0.05$) from the control measurements

Povprečni čas uvoda v splošno anestezijo je bil pri skupini, ki je prejela CBD v odmerku 20 mg/kg, značilno ($P < 0,05$) krajši kot pri kontrolni skupini (slika 9).

Čas do pojava umaknitvenega refleksa okončine in čas do začetka gibanja po splošni anesteziji podgan, ki so predhodno prejele različne odmerke CBD, sta prikazana na sliki 10.



Slika 10: Čas do pojava umaknitvenega refleksa in začetka gibanja pri podganah, predhodno tretiranih z različnimi odmerki CBD

Legenda:

* – vrednosti se značilno ($P < 0,05$) razlikujeta

Figure 10. The period of onset of the reflex and the recovery period in rats pretreated with different doses of CBD.

Legend:

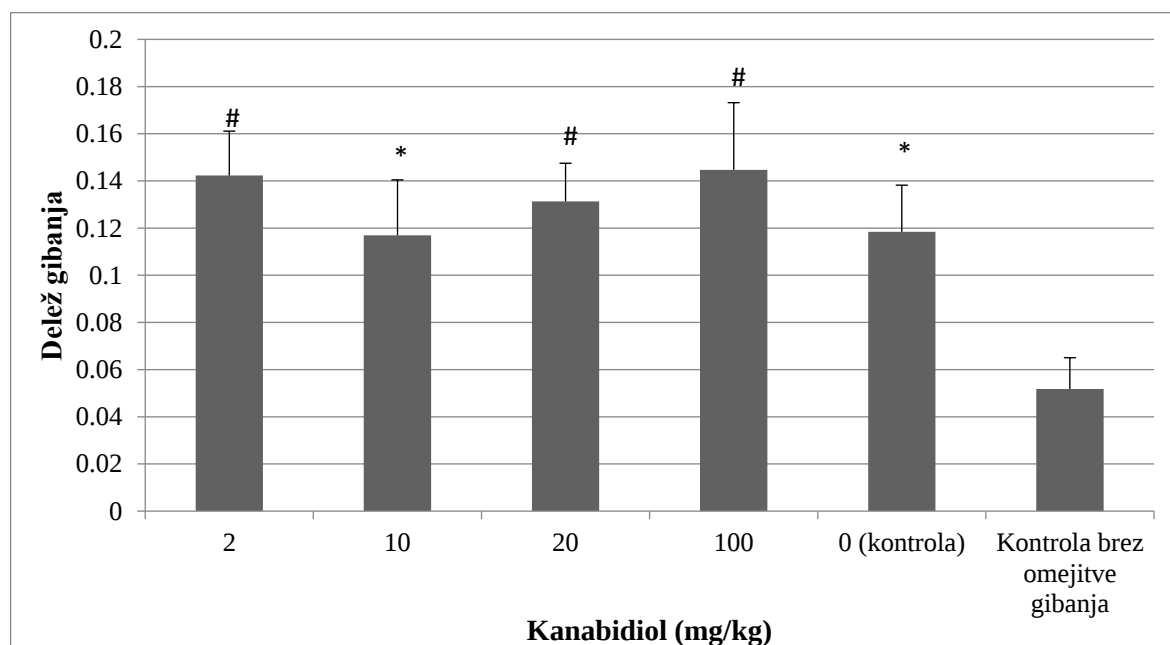
* – values differ significantly ($P < 0.05$)

Čas do pojava umaknitvenega refleksa, kot tudi čas do začetka gibanja se v primerjavi s kontrolno skupino pri skupinah, ki so bile predhodno tretirane z različnimi odmerki CBD, nista značilno razlikovala. Pri skupini, ki je prejela 100 mg/kg CBD, je bil čas do začetka gibanja najdaljši, vendar je bil značilno daljši ($P < 0,05$) le v primerjavi s skupino, ki je predhodno prejela CBD v odmerku 20 mg/kg.

4.2 OCENA INTENZIVNOSTI STRESNEGA ODZIVA PO PREDHODNEM DAJANJU RAZLIČNIH ODMERKOV CBD

Vedenjski parametri (delež gibanja na odprtem polju, čas prisotnosti v osrednji coni arene odprtega polja, prehojena razdalja, število prehodov v osrednjo cono, število dvigov na zadnji okončini in število negovanj področij glave) so prikazani na slikah od 11 do 16, biokemijski parameter kortikosteron pa je prikazan na sliki 17.

Delež gibanja (ang. mobility rate) smo vrednotili kot delež gibanja od celotnih 30 minut s hitrostjo, višjo od 3 cm/s.



Slika 11: Delež gibanja v odprtem polju pri podganah, ki so pred omejitvijo gibanja prejele različne odmerke CBD

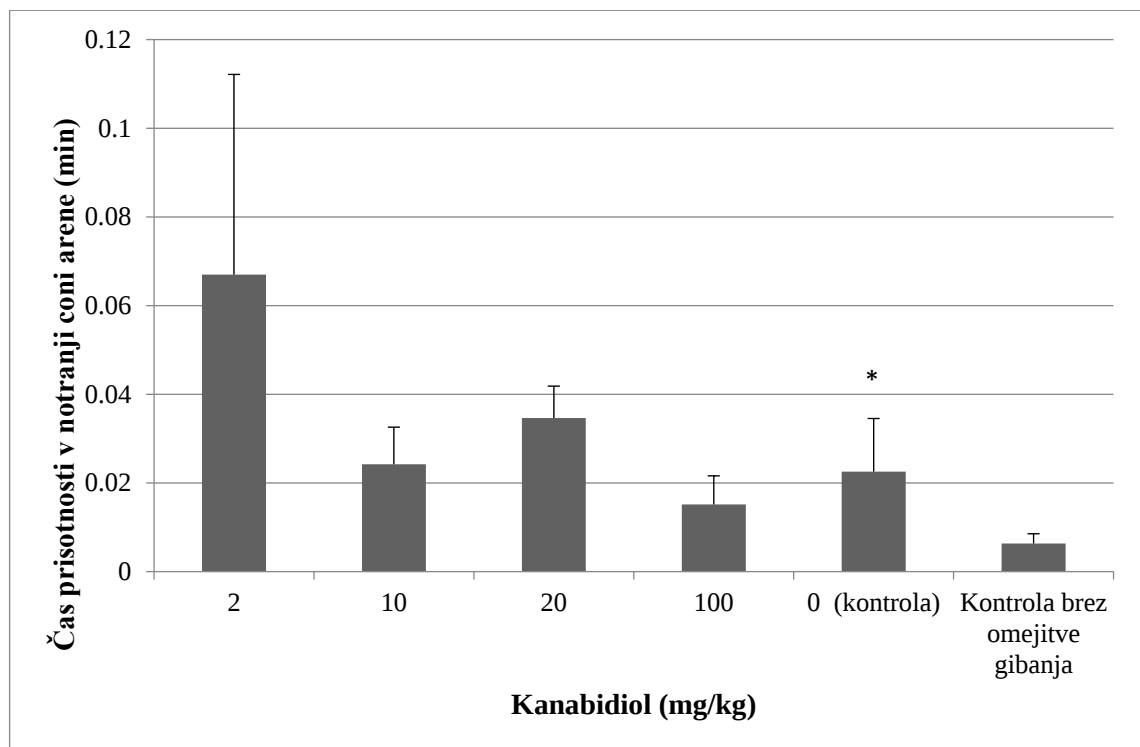
Legenda:

- * – vrednost se značilno ($P < 0,05$) razlikuje od vrednosti, ugotovljenih pri živalih, ki niso prejele CBD in niso bile izpostavljene inducirane stresu (kontrola brez omejitve gibanja)
- # – vrednost se značilno ($P < 0,01$) razlikuje od vrednosti, ugotovljenih pri živalih, ki niso prejele CBD in niso bile izpostavljene inducirane stresu (kontrola brez omejitve gibanja)

Figure 11. The measurement of mobility rate in rats which were pretreated with different doses of the CBD and preexposed to stress with movement restriction

Legend:

- * – mobility rate, which differs significantly ($P < 0.05$) from control measurements
- # – mobility rate, which differs significantly ($P < 0.01$) from control measurements



Slika 12: Čas prisotnosti podgan v notranji coni arene, predhodno tretiranih z različnimi odmerki CBD, v notranji coni arene odprtega polja

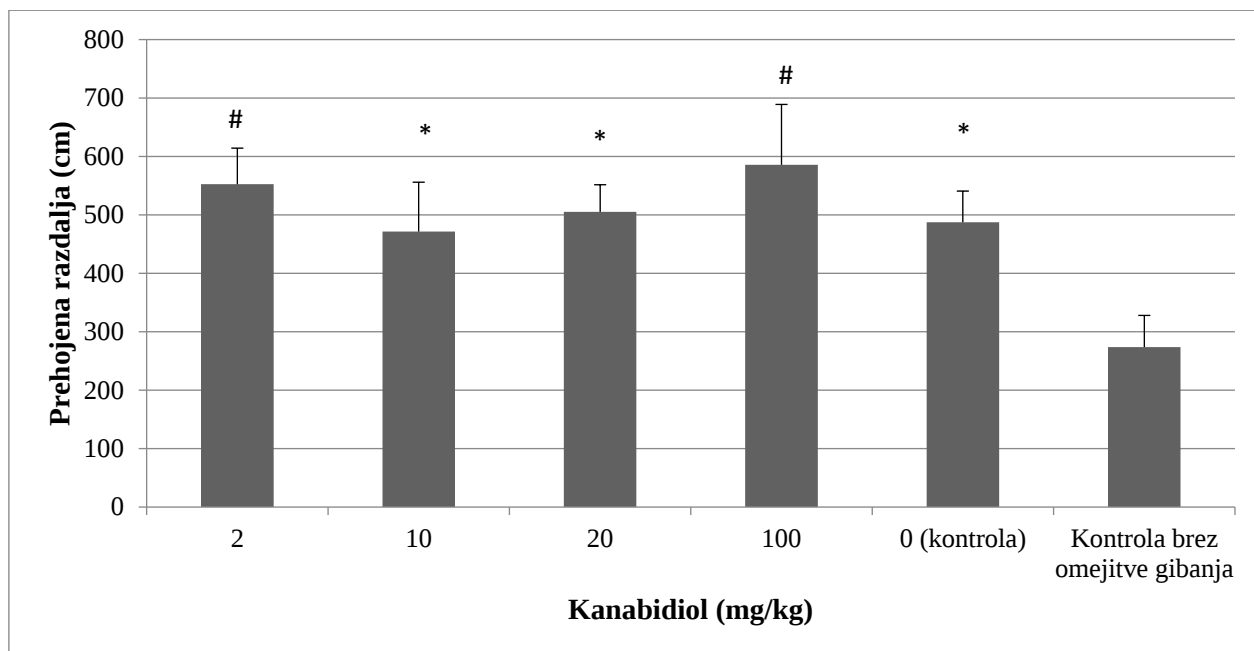
Legenda:

* – vrednost se značilno ($P < 0,05$) razlikuje od vrednosti, ugotovljenih pri živalih, ki niso prejele CBD in niso bile izpostavljene inducirane stresu (kontrola brez omejitve gibanja)

Figure 12. Inside rate in rats which were pretreated with different doses of the CBD and preexposed to stress with movement restriction

Legend:

* – mobility rate, which differs significantly ($P < 0.05$) from control measurements



Slika 13: Prehojena razdalja (cm) pri podganah, ki so prejele različne odmerke CBD po induciranjem stresu v odprtem polju

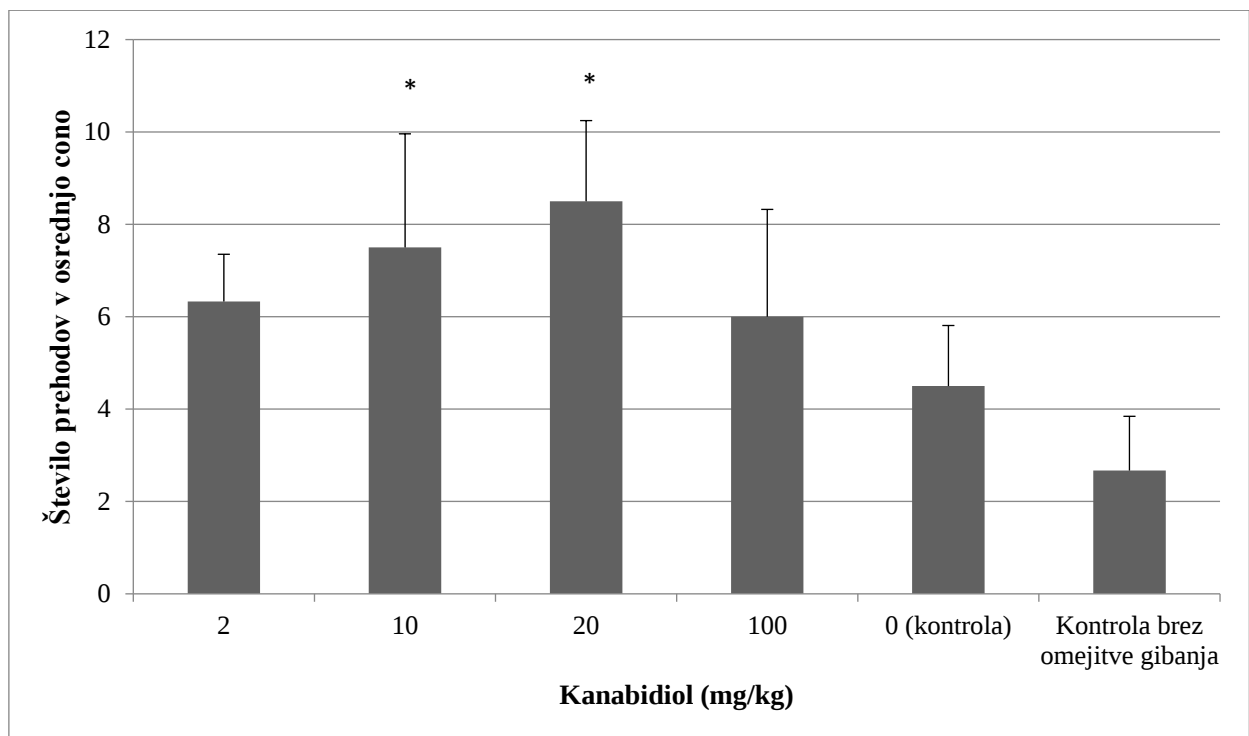
Legenda:

- * – vrednost se značilno ($P < 0,05$) razlikuje od vrednosti, ugotovljenih pri živalih, ki niso prejele CBD in niso bile izpostavljene induciranjem stresu (kontrola brez omejitve gibanja)
- # – vrednost se značilno ($P < 0,01$) razlikuje od vrednosti, ugotovljenih pri živalih, ki niso prejele CBD in niso bile izpostavljene induciranjem stresu (kontrola brez omejitve gibanja)

Figure 13. The measurement of total distance in rats which were pretreated with different doses of the CBD and preexposed to stress with movement restriction

Legend:

- * – mobility rate, which differs significantly ($P < 0.05$) from control measurements
- # – mobility rate, which differs significantly ($P < 0.01$) from control measurements



Slika 14: Število prehodov v osrednjo cono pri podganah, ki so pred induciranim stresom prejele različne odmerke CBD. Celotno trajanje testa je bilo 30 minut

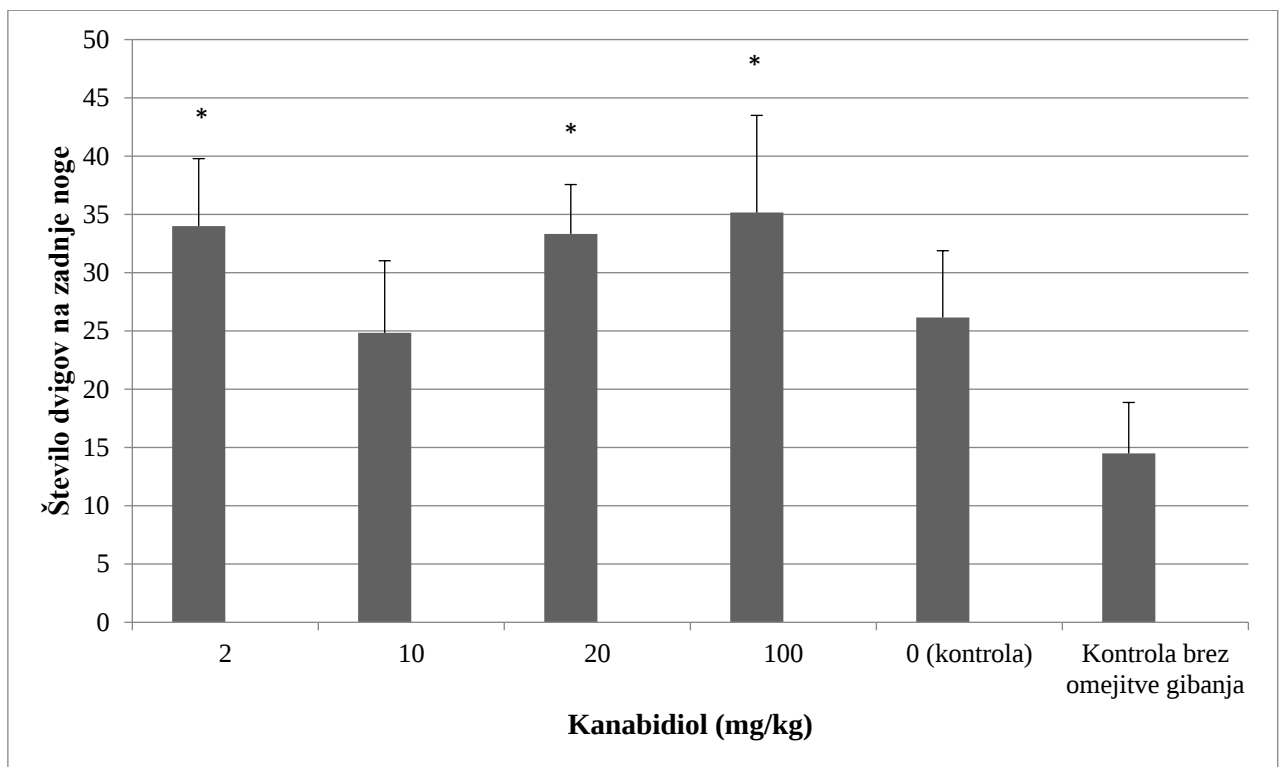
Legenda:

* – vrednost se značilno ($P < 0,05$) razlikuje od vrednosti, ugotovljene pri kontrolni skupini in pri kontrolni skupini, ki ni bila izpostavljena inducirane stresu

Figure 14. measurement of the number of crossing internal zone of open field in rats which were pretreated with different doses of the CBD and preexposed to stress with movement restriction

Legend:

* – the number of crossing internal cone of arena which differs significantly ($P < 0.05$) from control measurements and control group without movement restriction



Slika 15: Število dvigov na zadnji okončini pri podganah, ki so bile pred induciranim stresom prejele različne odmerke CBD

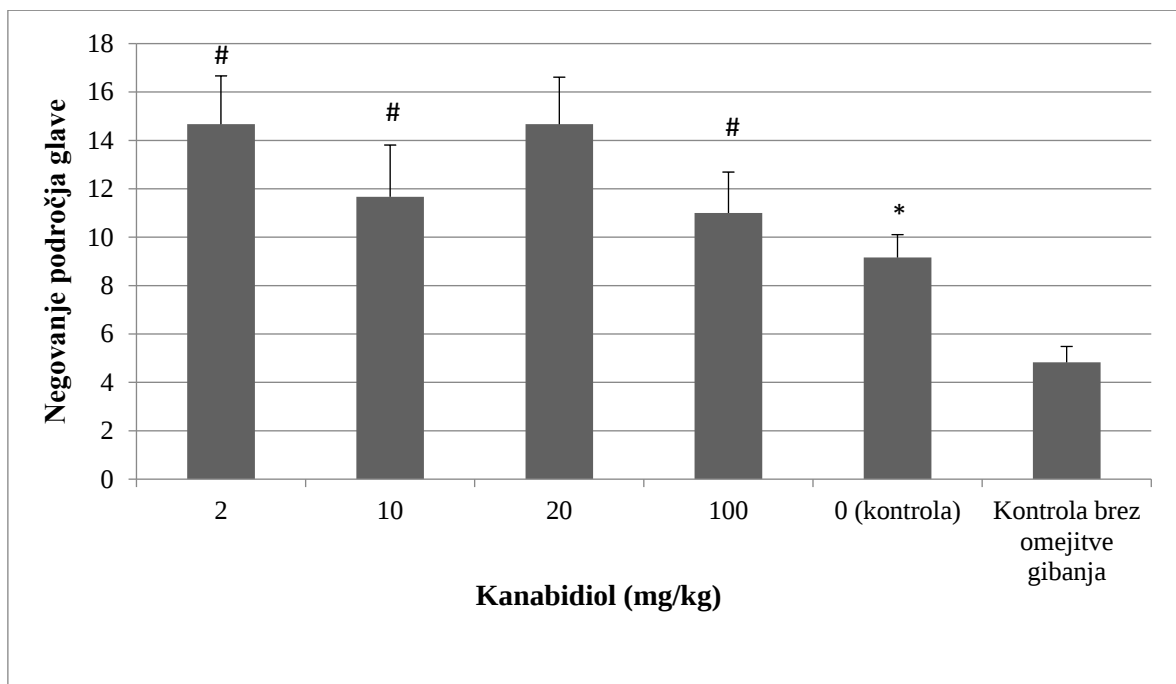
Legenda

* – vrednost se značilno ($P < 0,05$) razlikuje od vrednosti, ugotovljenih pri živalih, ki niso prejele CBD in niso bile izpostavljene inducirani stresu (kontrola brez omejitve gibanja)

Figure 15. The number of lifts on hind legs in rats which were pretreated with different doses of the CBD and exposed to induced stress

Legend:

* – mobility rate which differs significantly ($P < 0.05$) from control measurements



Slika 16: Število negovanj področja glave pri podganah, ki so pred induciranim stresom prejele različne odmerke CBD.

Legenda:

* – vrednost se značilno ($P < 0,05$) razlikuje od vrednosti, ugotovljenih pri živalih, ki niso prejele CBD in niso bile izpostavljene inducirane stresu (kontrola brez omejitve gibanja)

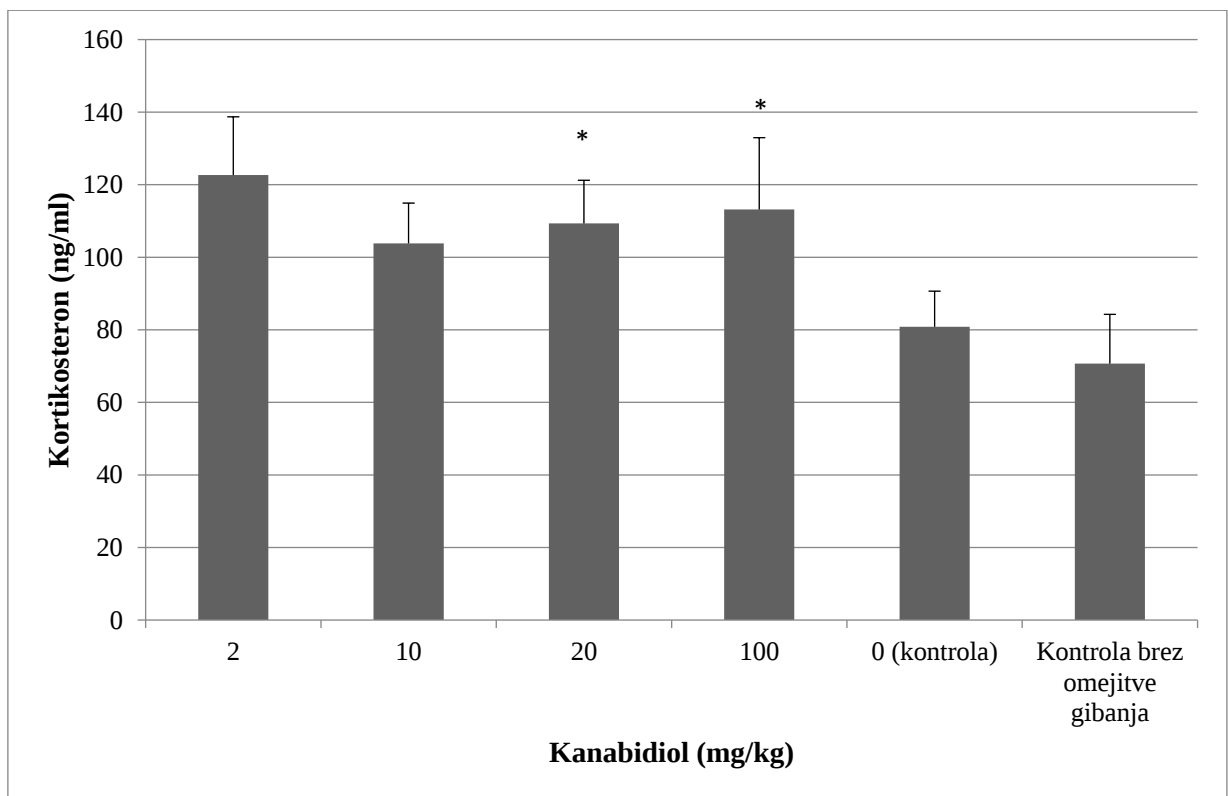
– vrednosti se značilno ($P < 0,01$) razlikujejo od vrednosti, ugotovljene pri živalih, ki niso prejele CBD in niso bile izpostavljene inducirane stresu (kontrola brez omejitve gibanja)

Figure 16: measurement of grooming in rats which were pretreated with different doses of the CBD and exposed to induced stress with movement restriction

Legend:

* – value differs significantly ($P < 0.05$) from control measurements

– values differ significantly ($P < 0.01$) from control measurements



Slika 17: Koncentracija kortikosterona (ng/ml) v krvni plazmi podgan, ki so pred induciranim stresom prejele različne odmerke CBD

Legenda

* – vrednost se značilno ($P < 0,05$) razlikuje od vrednosti, ugotovljenih pri živalih, ki niso prejele CBD in niso bile izpostavljene inducirane stresu (kontrola brez omejitve gibanja)

Figure 17. measurement of corticosterone value in rats which were pretreated with different doses of the CBD and preexposed to stress with movement restriction

Legend:

* – values differ significantly ($P < 0.05$) from control measurements

5 RAZPRAVA

5.1 VPLIVI PREDHODNEGA DAJANJA CBD NA POTEK SPLOŠNE ANESTEZIJE Z IZOFLURANOM

Poznavanje predhodnega dajanja CBD na potek splošne anestezije je pomembno iz več razlogov. Splošno anestezijo je včasih treba izvesti pri živalih, predvsem hišnih ljubljencih, ki prejema pripravke z vsebnostjo CBD ali drugih fitokanabinoidov. Živali lahko prejema pripravke s CBD v okviru predpisanega zdravljenja ter zdravljenja, ki ga lastniki izvajajo po lastni odločitvi, ali pa so živali nenamerno izpostavljene kanabinoidom predvsem v primerih, ko so lastniki uporabniki marihuane, zaradi česar lahko živali naključno pridejo v stik s CBD. Podatki o vplivu CBD na potek splošne anestezije so pomembni tudi zato, ker CBD predstavlja kandidatno učinkovino za doseganje sedativnih učinkov. Iz podobnih razlogov je tematika pomembna tudi za humano medicino.

Rezultati naše raziskave so pokazali, da nizka odmerka CBD (2 in 10 mg/kg) kot tudi visok odmerek (100 mg/kg) niso vplivali na čas uvajanja v splošno anestezijo. Nasprotno pa smo pri živalih, ki so prejele CBD v odmerku 20 mg/kg, izmerili v primerjavi s kontrolno skupino značilno krajši čas uvajanja v splošno anestezijo (slika 9). Nasprotujoči učinki različnih odmerkov CBD so bili že opisani. Zuardi in sod. (2017) in Guimaraes in sod. (1990) navajajo, da CBD izzove obrnjeno U krivuljo prikaza odnosa med odmerkom in učinkom, kar je v skladu tudi z našimi rezultati: nizka (2 in 10 mg/kg) in visoki odmerek (100 mg/kg) namreč niso vplivali na čas uvajanja, pri odmerku 20 mg/kg pa je bil izmerjen krajši čas uvoda v splošno anestezijo (slika 9). Obratni učinek visokih odmerkov CBD v primerjavi z učinki nižjih odmerkov lahko pojasnimo s tem, da le visoki odmerki CBD aktivirajo receptor TRPV1, omogočijo vezavo CBD na alosterično mesto receptorja 5HT1A in sprožijo nevrottransmisijo z glutamatom v osrednjem živčevju. Omenjeni procesi tako prekrijejo sedativne učinke CBD (Zuardi in sod., 2017). Najverjetneje različni odmerki aktivirajo različne farmakološke poti in posledično povzročijo različne učinke. Predvidevamo, da je krajši čas indukcije v splošno anestezijo pri živalih, ki so predhodno prejele CBD v odmerku 20 mg/kg, posledica interakcij CBD z receptorji CB1 in CB2, z modulacijo endogene tvorbe

anandamida, ter s povečanim živčnim prenosom z GABA (Echeverria-Villalobosa in sod., 2019), kar vodi do sedativnega učinka. Farmakološko delovanje CBD še ni dokončno razjasnjeno. Učinek na organizem se izrazi zaradi interakcije s kanabinoidnimi ter drugimi receptorji (5-HT, receptorji GABA, GPR55, TRPV), poleg tega CBD hkrati modulira tudi tvorbo endogenega anandamida (Costa in sod., 2004; Moriconi in sod., 2010; Wang in sod., 2012). Ker se interakcija z različnimi receptorji ali procesi, od katerih nekateri na osrednje živčevje delujejo sedativno, drugi pa ekscitatorno, pojavi pri različnih odmerkih CBD, je za doseganje želenega učinka potrebno uporabiti natančno določeni odmerek, ki pa ima, vsaj pri doseganju vpliva na uvajanje v splošno anestezijo, relativno majhno terapevtsko širino. Z nadaljnjimi raziskavami na ciljnih živalskih vrstah, bi bilo smiselno ugotoviti vpliv različnih odmerkov CBD na potek splošne anestezije in proučiti možnost uporabe CBD kot učinkovine, ki bi se samostojno ali v kombinaciji z drugimi zdravili lahko uporabljala za doseganje sedacije pred splošno anestezijo.

Med prebujanjem iz splošne anestezije se čas do umaknitvenega refleksa okončine kot tudi čas do začetka gibanja med skupinami živali, ki so prejele različne odmerke CBD, ni statistično razlikoval od kontrolne skupine (slika 10). Kljub temu je bilo prebujanje iz splošne anestezije pri skupini, ki je prejela CBD v odmerku 100 mg/kg, značilno daljše kot pri skupini, ki je prejela CBD v odmerku 20 mg/kg. Predvidevamo, da daljši čas prebujanja ni posledica sedativnega delovanja CBD, saj takšnega vpliva pri odmerku 100 mg/kg ob uvedbi v splošno anestezijo nismo ugotovili. Ta razlika je najverjetneje posledica različnega trajanja izpostavljenosti izofluranu (slika 9) in s tem prejetim celotnim odmerkom izoflurana. Predvidevamo, da je bil celotni odmerek izoflurana zaradi daljšega uvoda v anestezijo pri skupini, ki je prejela 100 mg/kg CBD, večji, zato se je povsem verjetno izofluran kot lipofilna snov deloma akumuliral v telesnih maščobah in posledično se je zaradi daljšega izločanja podaljšal tudi čas prebujanja (Echeverria-Villalobosa in sod., 2019).

V naši raziskavi smo prisotnost umaknitvenega refleksa preverjali s stiskom s pinceto četrtega prsta leve zadnje okončine. Test je izvajala vedno ista oseba, s čimer smo poskušali postopek standardizirati in se čim bolj izogniti subjektivnim dejavnikom, ki bi lahko vplivali na izvedbo te razmeroma nenatančne metode.

Rezultati naše raziskave kažejo, da CBD vpliva na potek splošne anestezije. Predvsem zaradi od koncentracije pogojene afinitete CBD do različnih receptorjev njegovi farmakološki učinki še niso povsem pojasnjeni, o učinkovitosti in terapevtski vrednosti pa se pojavljajo številna vprašanja, na katera bi lahko odgovorile prihodnje, ciljno usmerjene raziskave.

5.2 ANKSIOLITIČNO DELOVANJE CBD PO INDUCIRANEMU STRESU

Anksiolitično delovanje CBD je bilo opisano v različnih raziskavah pri ljudeh in laboratorijskih živalih (Campos in sod., 2012; Crippa in sod., 2018; Maroon in Bost, 2018). Predvidevali smo, da CBD kot učinkovina z anksiolitičnim delovanjem ublaži stresni odziv. Z našo raziskavo smo tako želeli ovrednotiti premedikacijo s CBD na intenzivnost stresnega odziva pri poskusnih podganah, pri katerih smo stresni odziv sprožili z omejitvijo gibanja. Enourni popolna omejitev gibanja je v literaturi velikokrat opisana metoda, s katero se pri laboratorijskih glodavcih povzroči stres (Campos in sod., 2013; Koolhaas in sod., 2017; Resstel in sod., 2009). Eno uro pred omejitvijo gibanja smo živalim z orogastrično sondo dali različne odmerke CBD (2, 10, 20, 100 mg/kg). Kontrolna skupina je prejela olje MCT brez CBD, dodatna kontrolna skupina prav tako, le da ni bila izpostavljena stresu. Po enourni omejitvi gibanja smo s testom na odprtem polju ocenili njihovo vedenje. Dodatno smo stresni odziv ovrednotili z ugotavljanjem koncentracije kortikosterona v vzorcu krvi, ki smo ga odvzeli takoj po izvedenem testu na odprtem polju. Podgane, izpostavljene stresu, v primerjavi s tistimi, ki stresu niso izpostavljene, pri testu na odprtem polju prehodijo krajšo razdaljo, manjkrat prehajajo v osrednjo cono arene odprtega polja, manj časa so v gibanju, poleg tega tudi manj časa posvetijo negovanju (Campos in sod., 2013; Koolhaas in sod., 2017; Patchev, 2006). V naši raziskavi smo pri testu na odprtem polju za živali, ki so pred izpostavitvijo stresu prejele različne odmerke CBD, določali sledeče parametre: delež gibanja (slika 11), čas, ko so se nahajale v notranji coni odprtega polja (slika 12), skupno prehojeno razdaljo v času testiranja (30 minut) (slika 13), število prehodov notranje cone arene (slika 14), število dvigov na zadnji okončini (slika 15) in število negovanj glave (slika 16). Med živalmi, ki so pred izpostavitvijo stresu prejele različne odmerke CBD, v primerjavi s kontrolno skupino, nismo ugotovili značilnih razlik v času, ko so se živali nahajale v osrednji coni odprtega polja, skupni prehojeni razdalji in v deležu gibanja. Le pri številu prehodov v

osrednjo cono odprtega polja rezultati kažejo značilno razliko med skupinami, ki so bile po prejetju/vnosu CBD izpostavljene stresu, in kontrolno skupino. Pri živalih, ki so CBD prejele v odmerku 10 in 20 mg/kg, je bilo število prehodov v osrednjo cono statistično značilno višje kot pri živalih, ki CBD niso prejele. Ti podatki so skladni s pričakovanimi rezultati, saj je bilo ugotovljeno, da CBD v odmerku 2 do 10 mg/kg sproži anksiolitični učinek (Guimaraes in sod., 1994; Moreira in sod., 2006). Ker pa statistično značilnih razlik pri drugih opazovanih parametrih nismo ugotovili (čas prisotnosti v osrednji coni arene, delež gibanja, skupna prehojena razdalja, število dvigov na zadnji okončini in število negovanj področij glave), ne moremo potrditi, vpliva premedikacije s CBD na intenzivnost stresnega odziva.

Večina parametrov, ki smo jih ovrednotili v naši raziskavi, kaže, da se je ne glede na to, ali so živali prejele CBD ali ne, po izpostavljenosti stresu povečala njihova fizična aktivnost in intenzivnost raziskovanja novega prostora v primerjavi z živalmi, ki stresu niso bile izpostavljene (slike 11 do 16). V literaturi je navedeno, da se stresni odziv, ocenjen s testom na odprtem polju, pri podganah kaže kot manjša fizična aktivnost in manjše zanimanje za raziskovanje prostora (Campos in sod., 2013; Koolhaas in sod., 2017; Patchev, 2006).

Rezultati naše raziskave so v nasprotju s pričakovanimi, saj smo pri vseh živalih, ki so bile predhodno izpostavljene stresu, ne glede na to, ali so prejele CBD ali ne, ugotovili večjo fizično aktivnost in tudi intenzivnejše za vrsto značilno vedenje (dvigi na zadnji okončini, negovanje področij glave) (slike 11 do 16). Vse skupine, ne glede na prejeti odmerek, so izkazale značilno višji delež gibanja kot tista kontrolna skupina, ki stresu ni bila izpostavljena.

Zaključimo lahko, da nismo zaznali anksiolitičnega učinka CBD, saj pri večini spremljanih parametrov nismo ugotovili značilnih razlik pri živalih, ki so bile izpostavljene stresu in so ali pa niso prejele CBD. Ob tem se pojavlja vprašanje, ki se nanaša na oceno vedenja podgan po inducirane stresu. Živali, ki so bile izpostavljene stresu so v našem poskusu, izkazale večjo aktivnost kot tiste, ki stresu niso bile izpostavljene. Ta ugotovitev se razlikuje od ugotovitev drugih avtorjev (Crippa in sod., 2004; Zuardi in sod., 1993, Campos in sod., 2012), česar z našimi rezultati ni mogoče pojasniti.

Z določitvijo koncentracije kortikosterona v krvni plazmi smo dodatno skušali ovrednostiti intenzivnost stresnega odziva pri podganah, ki so pred izpostavitvijo stresu prejele različne odmerke CBD. Vpliv CBD na delovanje osi hipotalamus-hipofiza-nadledvična žleza ni

poznan. Pri ljudeh je bilo ugotovljeno, da uporaba CBD ob stresu ni povzročila nižje koncentracije kortizola v krvi, je pa zmanjšala tremo pred nastopi (Ranganathan in sod., 2008; Bergamaschi in sod., 2011; Crippa in sod., 2004; Zuardi in sod., 1993). Prav tako pri glodavcih CBD omili akutni avtonomni odziv na stres (povišan krvni tlak, povišana srčna frekvenca in vznemirjenost) (Restel in sod., 2009). Višjo koncentracijo kortikosterona v krvni plazmi smo pričakovali pri živalih, ki bi z vedenjskimi parametri izrazile znake stresa, vendar, z vedenjskimi parametri pri živalih, ki so pred induciranim stresom prejele CBD, znakov stresnega odziva nismo potrdili. Ker po nekaterih podatkih CBD v odmerku 2 do 10 mg/kg na mišjem modelu deluje anksiolitično, pri odmerku, višjem od 20 mg/kg pa anksigeno (Guimaraes, 1990; Zuardi in sod., 2017), smo v primerjavi s kontrolno skupino pri skupinah, ki so CBD prejele v odmerkih 2, 10 in 20 mg/kg pričakovali nižje vrednosti kortikosterona. Rezultati, čeprav niso značilni, pa kažejo ravno nasprotno. Ker nismo ugotovili značilnih razlik, ne moremo izpostaviti, da je predhodno dajanje CBD povzročilo večjo tvorbo kortikosterona, oziroma povečalo stresni odziv, čeprav je s slike 17 moč opaziti prav to. Koncentracija kortikosterona je bila pri živalih, ki so prejele CBD v odmerku 20 in 100 mg/kg, značilno ($P < 0,05$) višja kot pri skupini, ki ni prejela CBD in ni bila izpostavljena stresu. Ta ugotovitev nakazuje, da bi omejitev gibanja lahko sprožila stresni odziv, čeprav tega ne moremo z gotovostjo potrditi, saj bi visoka koncentracija kortikosterona lahko bila tudi posledica anksigenega delovanja visokih odmerkov CBD, kar je bilo že opisano pri miših. (Guimaraes in sod., 1990; Zuardi in sod., 2017).

Za večjo relevantnost naših rezultatov bi bilo potrebno poskus ponoviti in v opazovanje vključiti dodatno pozitivno kontrolno skupino, ki bi namesto CBD prejela zdravilo z anksiolitičnim delovanjem (diazepam ali kako drugo učinkovino iz skupine benzodiazepinov). Anksiolitični učinek CBD bi bilo treba ovrednotiti tudi z drugimi vedenjskimi testi npr. s testom na dvignjenem labirintu in s testom prisilnega plavanja. Obenem pa se pojavlja tudi vprašanje primernosti enourne omejitve gibanja kot ustrezne metode sprožanja stresnega odziva pri podganah.

6 SKLEPI

1. CBD v odmerku 20 mg/kg pri podganah skrajša čas uvajanja v splošno anestezijo z izofluranom.
2. V primerjavi z odmerkom 20 mg/kg, CBD v odmerku 100 mg/kg podaljša čas prebujanja iz anestezije z izofluranom.
3. Predhodno dajanje CBD ne povzroči manjšega odziva na inducirani stres.
4. Koncentracija kortikosterona v krvni plazmi je bila po induciranemu stresu pri živalih, ki so predhodno prejele CBD v odmerkih 20 in 100 mg/kg, v primerjavi z živalmi, ki niso prejele CBD in niso bile izpostavljene stresu, značilno višja; rezultati nakazujejo anksigeno delovanje CBD v višjih odmerkih.
5. Da bi lahko popolnoma ovrednotili anksiolitično delovanje CBD, bi morali opraviti dodatne vedenjske teste (test na dvignjenem labirintu in test prisilnega plavanja).

7 POVZETEK

Kanabidiol (CBD) je fitokanaboid, ki se nahaja v konoplji (*Cannabis sativa* L.). Konoplja se v medicinske namene uporablja že stoletja, v zadnjem času je postal zanimiv predvsem CBD, za katerega se predvideva, da ima velik terapevtski potencial.

Namen našega dela je bil ovrednotiti vpliv CBD na časovni potek splošne anestezije z izofluranom in oceniti vpliv CBD na intenzivnost stresnega odziva.

V raziskavi smo preverjali sledeči hipotezi:

- CBD v ustreznem odmerku skrajša čas uvajanja in vpliva na čas prebujanja iz anestezije z izofluranom
- Premedikacija s CBD zniža intenzivnost stresnega odziva

Raziskava je potekala v dveh delih, skupno je bilo vključenih 36 laboratorijskih podganah, ženskega spola, linije Wistar. V prvem delu smo pri živalih, ki so predhodno prejele različne odmerke CBD, izvedli splošno anestezijo z izofluranom ter merili čas uvajanja in čas prebujanja iz splošne anestezije. V drugem delu smo živali, ki so predhodno prejele različne odmerke CBD, izpostavili stresu z omejitvijo gibanja, nato pa izvedli vedenjski test na odprtem polju. Ocenjevali smo sledeče parametre: čas prisotnosti v osrednji coni arene odprtega polja, delež gibanja na odprtem polju, prehojeno razdaljo, število prehodov v osrednjo cono, število negovanj področij glave in število dvigov na zadnji okončini. Vsaki živali smo vzeli kri in določili koncentracijo kortikosterona v plazmi.

Rezultati so pokazali krajši čas uvajanja v splošno anestezijo pri živalih, ki so predhodno prejele CBD v odmerku 20 mg/kg. Pri živalih, ki so predhodno prejele CBD v odmerku 100 mg/kg, smo opazili daljši čas prebujanja iz splošne anestezije, vendar razlike v primerjavi s skupino, ki ni prejela CBD, niso bile značilne, značilno pa so se razlikovale od vredosti, ki smo jih določili pri živalih, ki so CBD prejele v odmerku 20 mg/kg.

Z vedenjskim testom na odprtem polju smo ocenjevali vpliv CBD na intenzivnost stresnega odgovora. Ugotovili smo značilno večje število prehodov v osrednjo cono arene odprtega

polja pri živalih, ki so CBD prejele v odmerku 10 in 20 mg/kg, v primerjavi z živalmi, ki niso prejele CBD. Pri ostalih vedenjskih parametrih značilnih razlik nismo našli. Koncentracija kortikosterona v plazmi, kot dodatni pokazatelj intenzivnosti stresnega odziva, je bila v primerjavi s kontrolno skupino višja pri živalih, ki so CBD prejele v odmerku 20 in 100 mg/kg.

Z rezultati naše raziskave smo potrdili prvo hipotezo in ugotovili od odmerka odvisni vpliv CBD na potek splošne anestezije z izofluranom. Vpliva CBD na potek akutnega inducirane stres nismo potrdili, rezultati vedenjskih testov pa nakazujejo, da inducirani stres lahko povzroči večjo aktivnost živali. Za potrditev tega opažanja bi bilo potrebno opraviti dodatne raziskave.

8 SUMMARY

Cannabidiol (CBD) is the major non-psyhotropic phytocannabinoid found in cannabis plant (*Cannabis sativa* L). Cannabis has been used as medicinal plant for centuries and there is a growing interest in the therapeutic applications of cannabinoids. Especially CBD is believed to have a large therapeutic potential.

The purpose of this study was to investigate the dose-related effects of CBD premedication on the course of isoflurane anesthesia (induction time, time to onset of withdrawal reflex and recovery time). In addition, the aim of this study was also to assess the influence of CBD on the acute stress response.

In this study we examined the following hypotheses:

- At the adequate dose CBD reduces induction time and influences recovery time of isoflurane anesthesia
- Premedication with CBD reduces the intensity of the physiological acute stress reaction

Alltogether 36 laboratory female Wistar rats were used in the study. In the first part of the study Wistar rats were pretreated with different doses of CBD one hour before isoflurane anesthesia and the induction time, time of appearance of the withdrawal reflex and the recovery time were determined. In the second part, Wistar rats that had been pretreated with different doses of CBD were exposed to stress by movement restriction and further were tested in the open field. Additionally, acute stress response was evaluated by determination of plasma corticosterone concentration. The following parameters were evaluated: mobility rate, inside rate, total distance, number of crossing the inner zone, grooming, number of lifts on hind legs.

The results showed a reduced induction time of general anesthesia in rats pretreated with CBD 20 mg/kg and a prolonged recovery time in rats pretreated with CBD 100 mg/kg. The impact of CBD on the intensity of the stress response was assessed by an open-field behavioral test. We found significant differences between the experimental and control groups only in one parameter (higher number of crossing the inner zone in rats pretreated with CBD in doses 10 and 20 mg/kg). Corticosterone concentration as an indicator of acute stress response was higher in rats pretreated with 20 and 100 mg/kg CBD in comparison to control.

The results of our study confirmed our first hypothesis: the effect of CBD on the course of isoflurane anesthesia is dose-dependent and can reduce the induction time. The anxiolytic effect of CBD on acute stress was not confirmed. The results of behavioral tests indicate that stressed rats show greater activity. Further studies are needed to confirm these observations.

9 ZAHVALA

Največja zahvala gre mentorju doc. dr. Matjažu Uršiču in somentorju izr. prof. dr. Tomažu Snoju za potrpežljivost, usmerjanje in strokovno pomoč pri izvedbi ter pisanju raziskovalne naloge. Izr. prof. dr. Tomažu Snoju, se zahvaljujem tudi za statistično obdelavo podatkov in pomoč pri interpretaciji.

Zahvaljujem se tudi Boštjanu Drolcu za prijaznost, potrpežljivost, tehnično pomoč pri izvedbi poskusa, prijaznost in za oskrbo laboratorijskih podgan.

Hvala mag. Giti Grecs Smole za vso pomoč pri navajanju literature.

Zahvaljujem se tudi moji družini in prijateljem za motivacijo in podporo.

10 LITERATURA

1. Adams R, Hunt M, Clark JH. Structure of cannabidiol, a product isolated from the marihuana extract of Minnesota wild hemp. *J Am Chem Soc* 1940; 62: 196–200.
2. Alipour A, Patel PB, Gabrielson S. Review of the many faces of synthetic cannabinoid toxicities. *Ment Health Clin* 2019; 9(2): 93–9.
3. APA National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 16078, Dronabinol. Retrieved May 17, 2021
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dronabinol>.
4. Batalla A, Crippa JA, Busatto GF, et al. Neuroimaging studies of acute effects of THC and CBD in humans and animals: a systematic review. *Curr Pharm Des* 2014; 20(13): 2168–85.
5. Bernstein N, Gorelick J, Koch S. Interplay between chemistry and morphology in medical cannabis (*Cannabis sativa*). *Ind Crops Prod* 2019; 129: 185–94.
6. Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L, et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol* 2001; 134(4): 845–52.
7. Booth JK, Bohlmann J. Terpenes in *Cannabis sativa*: from plant genome to humans. *Plant Sci* 2019; 284: 67–72.
8. Campos AC, Guimaraes FS. Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology* 2008; 199(2): 223–30.
9. Campos AC, Guimaraes FS. Evidence for a potential role for TRPV1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray in the attenuation of the anxiolytic effects of cannabinoids. *Prog Neuro psychopharmacol Biol Psychiatry* 2009; 33(8): 1517–21.
10. Campos AC, Moreira FA, Guimaraes FS, Gomes FV, Del Bel EA. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Philos Trans R Soc London B Biol Sci* 2012; 367(1607): 3364–78.
11. Campos AC, Ortega Z, Palazuelos J, et al. The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. *Int J Neuropsychopharmacol* 2013; 16: 1407–19.

12. Carrier EJ, Auchampach JA, Hillard CJ. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(20): 7895–900.
13. Chesher GB, Jackson DM in Starmer GA. Interaction of cannabis and general anaesthetic agents in mice. *Br J Pharmacol* 2006; 50: 593–9.
14. Costa B, Giagnoni G, Franke C, Trovato AE, Colleoni M. Vanilloid TRPV1 receptor mediates the antihyperalgesic effect of the nonpsychoactive cannabinoid, cannabidiol, in a rat model of acute inflammation. *Br J Pharmacol* 2004; 143(2): 247–50.
15. Crippa JA, Zuardi AW, Garrido GE, et al. Effects of cannabidiol (CBD) on regional cerebral blood flow. *Neuropsychopharmacol* 2004; 29(2): 417–26.
16. Crippa JAS, Guimaraes FS, Zuardi AW, Campos AC. Translational investigation of the therapeutic potential of cannabidiol: toward a new age. *Front Immunol* 2018; 9: e2009. doi: 10.3389/fimmu.2018.02009.
17. Cui M, Honore P, Zhong C, et al. TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. *J Neurosci* 2006; 26 (37): 9385–93.
18. Devinsky O, Cross JH, Wright S. Trial of cannabidiol for drug-resistant seizures in the Dravet syndrome. *N Engl J Med* 2017; 377: 699–700.
19. Devinsky O, Patel AD, Cross JH, et al. Effect of cannabidiol on drop seizures in the Lennox-Gastaut syndrome. *N Engl J Med* 2018; 378(20): 1888–97.
20. Echeverria-Villalobosa M, Todeschini AB, Stoicea N, Fiorda-Diaz J, Weaver T, Bergese SD. Perioperative care of cannabis users: a comprehensive review of pharmacological and anesthetic considerations. *J Clin Anesth* 2019; 57: 41–9.
21. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Medical use of cannabis and cannabinoids: questions and answers for policymaking. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2018.
http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/10171/20185584_TD0618186_ENN_PDF.pdf (7. 12. 2019).
22. Fasinu S, Phillips S, El-Sohly MA, Walker LA. Current status and prospects for cannabidiol preparations as new therapeutic agents. *Pharmacotherapy* 2016; 36: 781–96.
23. Ferjan I, Kržan M, Lipnik-Štangelj M, Žiberna L, Stanovnik L, Černe K. Farmakologija kanabinoidov. *Zdrav Vestn* 2015; 84: 456–71.

24. Flisberg P, Paech MJ, Shah T, Ledowski T, Kurowski I, Parsons R. Induction dose of propofol in patients using cannabis. *Eur J Anaesthesiol* 2009; 26(3):192–5.
25. Freund TF, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 2003; 83: 1017–66.
26. Frizza J, Chesher GB, Jackson DM, Malor R, Starmer GA. The effect of A9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol, and cannabinol on the anaesthesia induced by various anaesthetic agents in mice. *Psychopharmacology* 1977; 55: 103–7.
27. Fusar-Poli P, Allen P, Bhattacharyya S, et al. Modulation of effective connectivity during emotional processing by delta 9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Neuropsychopharmacology* 2010; 13(4): 421–32.
28. Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 1995; 232 (1): 54–61.
29. Gamble LJ, Boesch JM, Frye CW, et al. Pharmacokinetics, safety, and clinical efficacy of cannabidiol treatment in osteoarthritic dogs. *Front Vet Sci* 2018; 5: e165(1–9). doi: 10.3389/fvets.2018.00165.
30. Gomes FV, Alves FHF, Guimarães FS, Correa FMA, Resstel LBM, Crestania CC. Cannabidiol administration into the bed nucleus of the stria terminalis alters cardiovascular responses induced by acute restraint stress through 5-HT1A receptor. *Eur Neuropsychopharmacol* 2013; 23: 1096–104.
31. Guimaraes FS, Chiaretti TM, Graeff FG, Zuardi AW. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 1990; 100: 558–9.
32. Guimarães FS, de Aguiar JC, Mechoulam R, Breuer A. Anxiolytic effect of cannabidiol derivatives in the elevated plus-maze. *Gen Pharmacol* 1994; 25: 161–4.
33. Hawksworth G, McArdle K. Metabolism and pharmacokinetics of cannabinoids. In: Guy GW, Whittle BH, Robson PJ, eds. *The Medicinal Uses of Cannabis and Cannabinoids*. London: Pharmaceutical Press 2004: 205–28.
34. Hill AJ, Williams CM, Whalley BJ, Stephens GJ. Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. *Pharmacol Ther* 2012; 133: 79–97.
35. Iannotti, FA, Vitale RM. The endocannabinoid system and PPARs: focus on their signalling crosstalk, action and transcriptional regulation. *Cells* 2021; 10(3):e 586. doi: 10.3390/cells10030586.

36. Ibeas BC, Chen T, Nunn AV, Bazet M, Dallas M, Whalley BJ. Molecular targets of cannabidiol in neurological disorders. *Neurotherapeutics* 2015; 12(4): 699–730.
37. Ibera C, Shalom B, Saifi F, et al. Effects of cannabis extract premedication on anesthetic depth. *Herefuah* 2018; 157(3): 162–6.
38. Koo CM, Kang HC. Could cannabidiol be a treatment option for intractable childhood and adolescent epilepsy. *J Epilepsy Res* 2017; 7: 16–20.
doi: 10.14581/jer.17003.
39. Kozela E, Lev N, Kaushansky N, et al. Cannabidiol inhibits pathogenic T cells, decreases spinal microglial activation and ameliorates multiple sclerosis-like disease in C57BL/6 mice. *Br J Pharmacol* 2011; 163:1507–19.
40. Kržan M. Farmakokinetika in farmakodinamika kanabinoidov. In: Gosenica matjaž M, Tomešič T, eds. *Uporaba kanabinoidov: strokovno izpopolnjevanje s področja farmacije*. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo 2019; 47–57.
41. Li H, Kong W, Chambers CR, et al. The non-psychoactive phytocannabinoid cannabidiol (CBD) attenuates pro-inflammatory mediators, T cell infiltration, and thermal sensitivity following spinal cord injury in mice. *Cell Immunol* 2018; 329: 1–9.
42. Long LE, Chesworth R, Huang XF, McGregor IS, Arnold JC, Karl T. A behavioural comparison of acute and chronic Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol in C57BL/6JArc mice. *Int J Neuropsychopharmacol* 2010; 13(7): 861–76.
43. Lu HC, Mackie K. An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biol Psychiatry* 2016; 79(7): 516–25.
44. Magen I, Avraham Y, Ackerman Z, Vorobiev L, Mechoulam R, Berry EM. Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in bile-duct ligated mice via 5-HT_{1A} receptor activation. *Br J Pharmacol* 2010; 159: 950–957.
45. Maroon J, Bost J. Review of the neurological benefits of phytocannabinoids. *Surg Neurol Int* 26. april 2018; 9: 91.
doi: 10.4103/smi.smi_45_18.
46. Martínez-Pinilla E, Varani K, Reyes-Resina I, et al. Binding and signaling studies disclose a potential allosteric site for cannabidiol in cannabinoid CB₂ receptors. *Front Pharmacol* 2017; 8(e744): (1–10).
doi: 10.3389/fphar.2017.00744.

47. McPartland JM, Duncan M, Di Marzo V, Pertwee RG. Are cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review. *Br J Pharmacol* 2015; 172(3): 737–53.
48. Mechoulam R, Shvo Y. Hashish–I: structure of cannabidiol. *Tetrahedron* 1963; 19: 2073–8.
49. Mechoulam R. Plant cannabinoids: a neglected pharmacological treasure trove. *Br J Pharmacol* 2005; 146: 913–5.
50. Mishima K, Hayakawa K, Abe K, et al. Cannabidiol prevents cerebral infarction via a serotonergic 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-dependent mechanism. *Stroke* 2005; 36: 1077–82.
51. Mitrovič S. Magistralni pripravki s kanabinoidi z vidika tehnologije. *Farm Vestn* 2016; 67: 87–90.
52. Moreira FA, Aguiar DC, Guimaraes FS. Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006; 30: 1466–71.
53. Moriconi A, Cerbara I, Maccarrone M, Topai A. GPR55: Current knowledge and future perspectives of a purported “Type-3” cannabinoid receptor. *Cur Med Chem* 2010; 17(14): 1411–29.
54. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365: 61–5.
55. Napimoga MH, Benatti BB, Lima FO, et al. Cannabidiol decreases bone resorption by inhibiting RANK/RANKL expression and pro-inflammatory cytokines during experimental periodontitis in rats. *Int Immunopharmacol* 2009; 9: 216–22.
56. Patel S, Wohlfeil ER, Rademacher DJ, Carrier EJ, Perry LJ, Kundu A. The general anesthetic propofol increases brain N-arachidonyl ethanolamine (anandamide) content and inhibits fatty acid amide hydrolase. *Br J Pharmacol* 2003; 139(5): 1005–13.
57. Patel S, Hill N, Cheer JF, Wotjak CT, Holmes A. The endocannabinoid system as a target for novel anxiolytic drugs. *Neurosci Biobehav Rev* 2017; 76(Pt A): 56–66.
58. Paton WDM in Pertwee RG. Effect of cannabis and certain of its constituents on pentobarbitone sleeping time and phenazone metabolism. *Br J Pharmacol* 1972; 44: 250–61.
59. Paton WD, Temple DM. Proceedings: effects of chronic and acute cannabis treatment upon thiopentone anaesthesia in rabbits. *Br J Pharmacol* 1972; 44: 346P–7P.

60. Pertwee R. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and 9-tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol* 2008; 153(2): 199–5.
61. Preedy VR. Handbook of cannabis and related pathologies: biology, pharmacology, diagnosis, and treatment 2017; 1170.
62. Rajesh M, Mukhopadhyay P, Bátkai S, et al. Cannabidiol attenuates high glucose-induced endothelial cell inflammatory response and barrier disruption. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H610–9.
63. Ranganathan M, Braley G, Pittman B, Cooper T, Perry E, D'Souza JD. The effects of cannabinoids on serum cortisol and prolactin in humans. *Psychopharmacology* 2008; 203: 737–40.
64. Resstel LB, Tavares RF, Lisboa SF, Joca SR, Corrêa FM, Guimaraes FS. 5-HT1A receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioral and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Br J Pharmacol* 2009; 156: 181–8.
65. Rock EM, Bolognini D, Limebeer CL, et al. Cannabidiol, a non-psychotropic component of cannabis, attenuates vomiting and nausea-like behaviour via indirect agonism of 5-HT(1A) somatodendritic: autoreceptors in the dorsal raphe nucleus. *Br J Pharmacol* 2012; 165: 2620–34.
66. Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 2007; 152(7): 1092–101.
67. Sales AJ, Fogaça MV, Sartim AG, et al. Cannabidiol induces rapid and sustained antidepressant-like effects through increased BDNF signaling and synaptogenesis in the prefrontal cortex. *Mol Neurobiol* 2019; 56: 1070–81.
68. Shultz ZP, Lawrence GA, Jacobson JM, Cruz EJ, Leahy JW. Enantioselective total synthesis of cannabinoids: a route for analogue development. *Org Lett* 2018; 20(2): 381–4.
69. Štrukelj B. Kanabinoidi: delovanje in klinične študije. In: Gosenica matjaž M, Tomešič T, eds. Uporaba kanabinoidov: strokovno izpopolnjevanje s področja farmacije. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo 2019; 20–32.

70. Tavčar Benkovic E. Konoplja in Kanabinoidi. In: Gosenica matjaž M, Tomešič T, eds. Uporaba kanabinoidov: strokovno izpopolnjevanje s področja farmacije. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo 2019; 7–20.
71. Thomas FB, El Sohly MA. The analytical chemistry of cannabis: quality assessment, assurance, and regulation of medicinal marijuana and cannabinoid preparations. Amsterdam: Elsevier 2016; 27–41.
72. Qin N, Neeper MP, Liu Y, Hutchinson TL, Lubin ML, Flores CM. TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 2008; 28(24): 6231–8.
73. Viudez-Martínez A, García-Gutiérrez MS, Medrano-Relinque J, Navarrón CM, Navarrete F, Manzanares J. Cannabidiol does not display drug abuse potential in mice behavior. *Acta Pharmacol Sin* 2019; 40(3): 358–64.
74. Wang W, Cao X, Liu C, Liu L. Cannabinoid WIN 55,212–2 inhibits TRPV1 in trigeminal ganglion neurons via PKA and PKC pathways. *Neurol Sci* 2012; 33(1): 79–85.
75. WHO Expert Committee on Drug Dependence Thirty-ninth Meeting Geneva, 6-10 November 2017. Cannabidiol (CBD) pre-review report agenda item 5.2. Geneva: World Health Organization, 2017
https://www.who.int/medicines/access/controlled-substances/5.2_CBD.pdf (20. 3. 2020).
76. WHO Expert Committee on Drug Dependence Fortieth Meeting of the Expert Committee on Drug Dependence (ECDD) was held in Geneva, Switzerland, June 2018. Extracts and tinctures of cannabis. The Fortieth meeting. Geneva: World health organisation, 2018.
https://www.who.int/medicines/access/controlled-substances/ecdd_40_meeting/en (12. 3. 2020).
77. Wright KL, Duncan M in Sharkey KA. Cannabinoid CB2 receptors in the gastrointestinal tract: a regulatory system in states of inflammation. *Br J Pharmacol* 2008; 153(2): 263–70.
78. Xing J, Li J. TRPV1 receptor mediates glutamatergic synaptic input to dorsolateral periaqueductal gray (dlPAG) neurons. *J Neurophysiol* 2007; 97: 503–11.

79. Xiong W, Cui T, Cheng K, et al. Cannabinoids suppress inflammatory and neuropathic pain by targeting $\alpha 3$ glycine receptors. *J Exp Med* 2012; 209(6): 1121–34.
80. Zou S, Kumar U. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: signaling and function in the central nervous system. *Int J Mol Sci* 2018; 19: 223–30.
81. Zuardi AW, Finkelfarb E, Bueno OF, Musty RE, Karniol IG. Characteristics of the stimulus produced by the mixture of cannabidiol with delta 9-tetrahydrocannabinol. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1981; 249: 137–46.
82. Zuardi AW, Karniol IG. Changes in the conditioned emotional response of rats induced by 9-THC, CBD and mixture of the two cannabinoids. *Arq Biol TecnoI* 1983; 26:391–7.
83. Zuardi AW, Rodrigues NP, Crippa JAS, et al. Inverted U-shaped dose- response curve of the anxiolytic effect of cannabidiol during public speaking in real life. *Front Pharmacol* 2017; 8: e259.
doi: 10.3389/fphar.2017.00259