

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu:

Ocena aktywności przeciwzapalnej i przeciwbólowej niskonarkotycznych (o niskiej zawartości THC i wysokiej CBD) odmian *Cannabis sativa* jako środków wspomagających leczenie pacjentów onkologicznych.

1. Czas trwania projektu 01.02-31.03.2018

2. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): kannabidiol (CBD), wyciąg roślinny, ekspresja na poziomie mRNA, aktywność przeciwzapalna i przeciwbólowa

3. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych): kategoria: B – „Badania translacyjne lub stosowane” (Badania stosowane); niewymagane przepisami w zakresie toksykologii i ekotoksykologii

A. Badania podstawowe

B. Badania translacyjne lub stosowane

C. Badania mające na celu zachowanie gatunku

D. Badania z zakresu medycyny sądowej

E. Badania zapewniające poprawę dobrostanu zwierząt lub warunków chowu lub hodowli zwierząt gospodarskich

F. Badania w celu opracowania i produkcji produktów leczniczych, środków spożywczych, pasz lub innych substancji lub produktów, lub badań ich jakości, skuteczności lub bezpieczeństwa stosowania

G. Badania w celu ochrony środowiska naturalnego

H. Badania w celu kształcenia na poziomie szkolnictwa wyższego lub szkolenia w celu nabycia lub doskonalenia kompetencji zawodowych

5. OPIS PLANOWANEGO DOŚWIADCZENIA

Należy określić cel naukowy lub edukacyjny doświadczenia, w tym przewidywane szkody, jakie może ono spowodować u wykorzystywanych zwierząt, i korzyści, jakie przyniesie ono dla rozwoju nauki i dydaktyki. Maksymalnie 250 słów, tekst musi być zrozumiały dla niespecjalisty.

Celem projektu jest sprawdzenie czy niskonarkotyczna (o niskiej zawartości THC - tetrahydrocannabinol i wysokiej CBD - kannabidiol) odmiana *Cannabis sativa* wykazuje działanie

przeciwzapalne oraz miejscowe działanie przeciwbólowe oraz ocena podłoża molekularnego tych aktywności w zwierzęcym modelu stanu zapalnego indukowanego karageniną.

Z uwagi na występowanie licznych działań niepożądanych czy też przeciwwskazań do standardowego leczenia przeciwzapalnego, poszukuje się alternatywnych metod terapii. Wykorzystanie niskonarkotycznych (o niskiej zawartości THC i wysokiej CBD) odmian konopi siewnych (*Cannabis sativa*) może stanowić alternatywę w zwalczaniu stanu zapalnego oraz bólu występującego jako składowa zapalenia

W niniejszym doświadczeniu wykorzystany zostanie ekstrakt z ziela *C. sativa*, który podany zostanie zwierzętom po indukcji stanu zapalnego w łapie za pomocą karageniny. Nie będą to zwierzęta z chorobą nowotworową, jedynie zwierzęta z indukowanym stanem zapalnym. Jest to uzasadnione, ponieważ badania naukowe jednoznacznie wskazują, iż ból jest powszechnym zjawiskiem u pacjentów onkologicznych, natomiast nieodłącznym elementem progresji i rozwoju raka jest stan zapalny. Poszukiwanie nowych metod zwalczania bólu o podłożu zapalnym oraz poznanie mechanizmów molekularnych tych zjawisk jest więc jednym z istotnych trendów badań farmakologicznych w onkologii [1]. Działanie ekstraktu na poziomie molekularnym i fizjologicznym zostanie ocenione poprzez analizę zmian ekspresji mRNA i białka dla wybranych czynników zapalnych oraz receptorów związanych ze zjawiskiem bólu.

Zwierzęta z uwagi na charakter doświadczenia będą poddawane procedurom związanym z odczuwaniem bólu, jednakże stres związany z tym przeżyciem ograniczony zostanie do minimum poprzez możliwie sprawne przeprowadzenie doświadczenia przez przeszkolony personel. Podobnie, liczba zwierząt użytych w doświadczeniu będzie możliwie najmniejsza tak, by uzyskać wiarygodne wyniki przy pomocy standardowych obliczeń statystycznych. Ograniczono liczbę zwierząt w grupie badanej do 10 szczurów mając na uwadze ich dobro, nie narażając niepotrzebnie większej liczby zwierząt na niepotrzebny stres.

Podsumowując, łączna liczba zwierząt w badaniu to **50** osobników. Przewidywane szkody w doświadczeniu wiążą się dystresem odczuwania bólu, jednakże korzyścią płynącą z prowadzonych badań, będzie nowa informacja o potencjalnym działaniu przeciwbólowym i przeciwzapalnym badanych środków.

1. [Laird BJ, Scott AC, Colvin LA, McKeon AL, Murray GD, Fearon KC, Fallon MT. Cancer pain and its relationship to systemic inflammation: an exploratory study. *Pain*. 2011 Feb;152(2):460-3.]

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Badanie przeprowadzone zostanie na 50 szczurach samcach Wistar stado niekrewniacze, o masie ciała 230 - 350 g.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA

Zasada zastąpienia

Do tej pory brak innych, efektywnych i wysoce informatywnych metod badawczych pozwalających prześledzenie odpowiedzi żywego organizmu na stosowanie substancji o spodziewanym działaniu przeciwbólowym/przeciwzapalnym, stąd też zaplanowany model do tego rodzaju badań zdaniem wnioskodawcy wydaje się być w pełni adekwatny. Implementacja hodowli komórkowych i tkankowych do eksperymentu stanowiącego podstawę wniosku nie odzwierciedlałoby efektu farmakologicznego badanych ekstraktów i ich tkankowej dystrybucji w organizmie. Dotychczas nie opracowano efektywnego modelu dla badań przedklinicznych, który zastąpiłby ocenę zaplanowanego działania *in vivo*. Prowadzone badania w tej materii oparte są tylko na wykorzystaniu organizmów modelowych, w szczególności szczurów. Jest to podyktowane znaczącym podobieństwem reakcji organizmów tych zwierząt i ludzi oraz z uwagi na dostępność narzędzi (metod) badawczych.

Zasada ograniczenia

Eksperymentalny model obrzęku i stanu zapalnego u szczurów, otrzymany przez wstrzyknięcie karageniny, jest procedurą szeroko stosowaną do oceny potencjalnej aktywności przeciwzapalnej nowych leków. W badaniu zostanie użyta minimalna ilość zwierząt doświadczalnych (n=50) umożliwiająca przeprowadzenie eksperymentu w sposób wiarygodny oraz poprawne wnioskowanie statystyczne. Dla każdej substancji czynnej lub ekstraktu przeznaczonych zostanie 10 osobników, co stanowi niezbędne minimum badawcze pozwalające na poprawne wnioskowanie oraz wykluczające konieczność ewentualnego powtarzania analiz. Liczba 10 osobników na każdą grupę wynika również z faktu zróżnicowania międzyosobniczego zwierząt, a co się z tym wiąże z odmiennej reakcji na podawane substancje. W związku z tym, zastosowanie odpowiednio liczebnej grupy umożliwi również wstępne oszacowanie zróżnicowania populacyjnego i ustalenie wartości uśrednionych. Podobnie w przypadku ilości grup badanych, zostały one ograniczone do minimum testowanych substancji poprzez wybór tylko jednej substancji referencyjnej, jaką jest kwas acetylosalicylowy (ASA), dwóch różniących się zawartością kannabidiolu ekstraktów *Cannabis sativa* oraz czystego kannabidiolu (CBD) stanowiącego

odniesienie do oceny aktywności ekstraktów.

Podział grup doświadczalnych będzie ograniczony do minimum pod względem wyboru analizowanych substancji oraz ilości osobników i będzie wyglądał następująco:

1z = K = karagenina (2000 µg; *s.c.*) + olej (10 osobników)

2z - karagenina + ASA (200 mg/kg m.c.; *p.o.*) (10 osobników)

3z = karagenina + CBD (40 mg/kg m.c.; *p.o.*) (10 osobników)

4z = karagenina + CA B (20mg/kg m.c.; *p.o.*) (ekstrakt B z *C. sativa*) (10 osobników)

5z = karagenina + CA D (20 mg/kg m.c.; *p.o.*) (ekstrakt D z *C. sativa*) (10 osobników)

Nadto, dawki dla badanych substancji (karagenina (2000 µg; *s.c.*); ASA (200 mg/kg m.c.; *p.o.*); CBD (40 mg/kg m.c.; *p.o.*); CA B i D (20mg/kg m.c.; *p.o.*) przewidziane w eksperymencie zostały zaprojektowane w taki sposób by wykazywały możliwie najbardziej efektywną, spodziewaną aktywność farmakologiczną, przy jednoczesnej eliminacji ryzyka występowania działań niepożądanych, o najmniejszym z możliwych doznań powodujących dyskomfort zwierząt doświadczalnych.

Zasada udoskonalenia

Podczas przeprowadzania badania zakłada się ograniczenie do minimum niekorzystnych skutków i odczuć zwierząt w czasie trwania procedury poprzez utrzymywanie ich w jak najlepszych warunkach bytowych oraz ich obsługę przez wykwalifikowany personel zwierzętarni.

W niniejszym badaniu, w celu wywołania miejscowego zapalenia, zastosowano najmniejszą efektywną dawkę karageniny 0,1 ml 1% roztworu. Opublikowane badania porównujące działanie tego środka w trzech stężeniach (0,3, 1 i 3%) wykazało brak skuteczności najmniejszego z nich, tj. 0,3% karageniny, podczas gdy stężenia 1 i 3% były efektywne (Rajan Radhakrishnan,^{a,b} Steven A. Moore,^{c,d} and Kathleen A. Slukaa. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain*. 2003 Aug; 104(3): 567–577). Zastosowane w niniejszym badaniu stężenie karageniny (1%) umożliwia więc przeprowadzenie eksperymentu i uzyskanie wiarygodnych wyników przy jednoczesnym utrzymaniu najmniejszego bólu i stresu dla zwierząt.

Warunki hodowli, miejsce przeprowadzania doświadczenia, a także przygotowanie i doświadczenie personelu pozwoli do minimum ograniczyć stres zwierząt w badaniu. Zwierzęta będą utrzymywane w zwierzętarni prowadzonej w kategorii konwencjonalnej CV – I, urozmaicenia w klatce – drewniane klocki, rurki.