

Farmakokinetika, bezpečnost a klinická účinnost kanabidiolu v léčbě osteoartrózy u psů

Lauri-Jo Gamble¹, Jordyn M. Boesch¹, Christopher W. Frye¹, Wayne S. Schwark², Sabine Mann³, Lisa Wolfe⁴, Holly Brown⁵, Erin S. Berthelsen¹ and Joseph J. Wakshlag¹ * ¹ Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, NY, United States, ² Department of Molecular Medicine, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, NY, United States, ³ Department of Population Medicine, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, NY, United States, ⁴ Proteomic and Metabolomic Facility, Colorado State University, Fort Collins, CO, United States, ⁵ Metzger Animal Hospital, State College, PA, United States

Cíl studie:

Cílem této studie bylo určit základní perorální farmakokinetiku a vyhodnotit bezpečnost a analgetickou účinnost kanabidiolu (CBD) v olejovém základu u psů s osteoartrózou.

Metody:

Farmakokinetika s jednou dávkou byla provedena s použitím dvou různých dávek oleje obohaceného o CBD (2 a 8 mg/kg). Poté byla provedena randomizovaná, placebem kontrolovaná, zkřížená, dvojité slepá studie (pro veterináře i majitele zvířat).

Psi dostávali oba typy terapie: CBD (2mg/kg) nebo placebo každých 12 hodin. Každá terapie trvala 4 týdny s dvoutýdenní promývací periodou.

Základní veterinární zhodnocení a vyplnění dotazníků majiteli bylo provedeno před zahájením léčby, a v týdnu 2 a 4.

Při každé návštěvě bylo provedeno biochemické, hematologické a klinické vyšetření.

Pro vyhodnocení všech sledovaných proměnných byl použit smíšený model analýzy, zkoumající změnu výchozích hodnot ve všech dalších časových bodech, přičemž hodnota $p \leq 0,5$ byla definována jako významná.

Výsledky:

Farmakokinetická studie odhalila poločas eliminace 4,2 h u obou dávek a nebyly pozorovány žádné vedlejší účinky.

Klinicky, stupnice bolesti u psů a Hudsonovo skóre aktivity prokázaly snížení bolestivosti a zvýšení aktivity ($p < 0,01$) při léčbě CBD olejem. Veterinární vyšetření ukázalo snížení bolesti během podávání CBD ($p < 0,02$). Žádné nežádoucí účinky nebyly hlášeny ze strany majitelů psů, biochemické vyšetření ovšem odhalilo vzestup aktivity alkalické fosfatázy během podávání CBD

($p < 0,01$).

Klinický význam:

Tato farmakokinetická a klinická studie naznačuje, že 2mg/kg CBD podávané 2x denně může přispět ke zvýšení komfortu a aktivity psů s OA.

ÚVOD

Rutiní terapie nesteroidálními antiflogistiky (NSAID), ačkoli je účinná, nemusí poskytovat dostatečnou úlevu od bolesti způsobenou osteoartrózou (OA) a může mít nežádoucí účinky, které vylučují její použití, zejména u geriatrických pacientů se souběžnými onemocněními, jako je onemocnění ledvin nebo trávicího traktu (1-4). Při systematickém přezkoumání 35 psích modelů OA a 29 klinických studií na psech se ukázalo, že léčba NSAID způsobovala nežádoucí vedlejší účinky v 35 z 64 (55%) studií, nejčastěji se jednalo o gastrointestinální příznaky (3).

Přestože jsou podporovány další farmakologické látky, jako gabapentin nebo amantadin, je jen málo důkazů o jejich účinnosti u psů s chronickou nebo neuropatickou bolestí spojenou s OA.

Nedávný medicínský zájem o alternativní terapie a tlumení bolesti vedl mnoho majitelů k vyhledání konopných produktů s vysokým obsahem kanabidoidů.

Je známo, že systém endokanabinoidních receptorů hraje důležitou roli v modulaci bolesti a zmírňování zánětu (5-7). Kanabinoidní receptory CB1 a CB2 jsou široce distribuovány v centrálním i periferním nervovém systému (8-10) a nacházejí se rovněž v synoviální membráně (11).

Psychotropní účinky některých kanabinoidů však brání širšímu výzkumu jejich použití jako samostatných látek pro úlevu od bolesti (5,12)

Kanabinoidy jsou skupinou 60 různých sloučenin, které se mohou nebo nemusejí vázat na CB receptory. Jedna třída kanabinoidů, kanabidiol (CBD), může být ve skutečnosti alosterickým nekompetitivním antagonistou CB receptorů (13).

U nižších obratlovců je rovněž hlášeno, že CBD má rovněž imunomodulační (14), antihyperalgický (15,16), antinociceptivní (17,18) a protizánětlivý (5,19) účinek, což z něj činí atraktivní terapeutickou možnost pro psy s OA.

V současné době existuje několik společností, které distribuují nutraceutika odvozená z technického konopí, bohatá na kanabinoidy pro domácí mazlíčky, je však jen málo vědeckých důkazů o jejich účinnosti a bezpečnosti.

Účelem této studie bylo určit:

- 1) Farmakokinetiku po orálním podání jedné dávky
- 2) Krátkodobou bezpečnost a
- 3) Účinnost tohoto nového extraktu bohatého na CBD ve srovnání s placebem v úlevě od bolesti u psů s OA.

Naše hypotéza byla taková, že adekvátní dávkování oleje bohatého na CBD by mělo bezpečně tlumit bolestivost a zvyšovat aktivitu u psů trpících OA.

MATERIÁL A METODY

CBD A SCHVÁLENÍ PROTOKOLU

V této studii bylo použito vlastní kmen technického konopí, výtazek byl získán pomocí etanolu a tepelné extrakce s následnou desikací, výsledný produkt byl rekonstituován v základu z olivového

oleje v koncentraci 10 mg/ml CBD jako rovnoměrná směs CBD a karboxylové kyseliny CBD (CBDa), 0,24 mg/ml tetrahydrokanabinolu (THC), 0,27 mg/ml kanabichromenu (CBC) a 0,11 mg/ml kanabigerolu (CBG); všechny ostatní kanabinoidy byly v koncentraci nižší než 0,01 mg/ml.

Analýza 5 různých výrobních cyklů v komerční analytické laboratoři (MCR Laboratories, Framingham, MA) prokázala menší než 9% odchylku mezi jednotlivými šaržemi pro všechny z výše uvedených kanabinoidů.

Studie byla provedena poté, co instituce pro péči o zvířata (IACUC) Cornell University schválila studii podle pokynů pro použití zvířat podle IACUC. Majitelé zvířat byli do studie zařazeni po informovaném souhlasu v souladu s Helsinskou deklarací.

FARMAKONIKETIKA

Počáteční vyšetření jednorázové orální farmakokinetiky bylo provedeno se 4 bigly (3,5-7 let, samec kastrováný, 10,7-11,9 kg). Každý pes obdržel perorální dávku 2 mg / kg a 8 mg / kg CBD oleje s 2-týdenním promývacím obdobím mezi každým pokusem. Psi byli krmeni 2 hodiny po podání dávky. Fyzikální vyšetření bylo provedeno v čase 0 a po 4, 8 a 24 hodinách po podání dávky. Postoj, chování, propriocepce a chůze byly subjektivně hodnoceny v každém časovém bodě během volného pohybu (chůze / běh) a během navigace kolem standardních dopravních kuželů. V čase 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 a 24 hodin po podání oleje bylo odebráno pět mililitrů krve. Vzorky krve byly získány venepunkcí v Juguaris a přeneseny do koagulační zkumavky na dobu 20 minut. Vzorky byly odstředěny klinickou centrifugou při 3600 x g po dobu 10 min; sérum bylo separováno a uchováno při -80 ° C až do analýzy pomocí kapalinové chromatografie-hmotnostní spektrometrie (LC-MS) v laboratoři pro hmotnostní spektrofotometrii na Colorado State University.

EXTRAKCE CBD ZE SÉRA PSŮ A ANALÝZA HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ

CBD bylo extrahováno ze psího séra za použití kombinace precipitace proteinu a extrakce kapaliny-kapaliny za použití n-hexanu, jak bylo popsáno výše (20), s malými modifikacemi pro ultrafiltrační vysokotlakou kapalinovou chromatografii (UHPLC). Stručně, 0,05 ml psího séra bylo podrobeno srážení bílkoviny za přítomnosti ledově chladného acetonitrilu (80% konečné koncentrace), nasyceného deuterovaným CBD jako vnitřním standardem (0,06 mg / ml, CBD-d3 Cerilliant, Round Rock, TX, USA). Do každého vzorku bylo přidáno 0,2 ml vody před přidáním 1,0 ml hexanu, aby se zvýšila separace fází kapalina-kapalina. Hexanový extrakt byl odebrán a zahuštěn v laboratorním dusíku až do suchého stavu. Před analýzou LC-MS byly vzorky resuspendovány v 0,06 ml 100% acetonitrilu. Standardní křivka s použitím analytického standardu CBD byla připravena pro psí sérum, které nebylo vystaveno CBD a extrahováno viz výše. Koncentrace kanabidiolu v séru byla kvantifikována za použití kombinace chromatografie a hmotnostní spektrometrie (UHPLC-QQQ-MS) s použitím podobných metod, jak bylo popsáno výše (21).

ANALÝZA DAT SÉROVÉ KONCENTRACE CBD

Z dat UHPLC-QQQ-MS byly extrahovány peaky pro CBD zjištěné v biologických vzorcích a normalizovány na plochu peaku interního standardu CBD-d3, v každém vzorku pomocí Skyline (22) a interního R Scriptu (www.r-project.org). Koncentrace CBD byly vypočítány na nanogramy na ml séra, které byly určeny linií regrese standardní křivky ($r^2 = 0,9994$, 0-1000 ng / ml). Pro tento test jsou limity detekce (LOD) a limity kvantifikace (LOQ) představovány spodní limity detekce a kvantifikace pro každou sloučeninu v matici této studie (23, 24). Farmakokinetické proměnné byly odhadnuty pomocí nekompartmentové analýzy s využitím farmakokinetického softwarového balíčku (PK Solution, verze 2.0, Montrose, CO, USA).

KRITERIA ZAŘAZENÍ A VYLOUČENÍ PRO KLINICKÉ ZHODNOCENÍ

Studijní populace sestávala ze psů vlastněných chovateli, kteří byli prezentováni v Cornellské univerzitní nemocnici pro zvířata za účelem vyšetření a léčby kulhání způsobeného OA. Psi byli zvažováni k zařazení do studie, pokud měli radiografické důkazy o OA, známky bolesti podle hodnocení jejich majitelů, viditelné kulhání při vizuálním hodnocení chůze a palpační bolestivost kloubů.

U každého psa byl na počátku proveden kompletní krevní obraz ([CBC] Bayer Advia 120, Siemens Corp., New York, NY, USA) a biochemická analýza séra (Hitachi 911, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), aby byla vyloučena onemocnění, která by mohla bránit zařazení do studie. Zvýšení hladin alkalické fosfatázy (ALP), alaninaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotransferázy (AST) bylo povoleno, jestliže předchozí jaterní ultrazvuk byl považován za normální, s výjimkou potenciálních neprogresivních nodulů (možná nodulární hyperplazie jater). Všichni majitelé vyplnili krátký dotazník s definicí postižené končetiny, doby trvání kulhání a podávání analgetik nebo jiných léků. Všichni psi podstoupili radiografické vyšetření postižených kloubů a radiolog potvrdil přítomnost nebo nepřítomnost OA a vyloučil přítomnost souběžného onemocnění, které by mohlo zabránit jejich zařazení (např. lytické léze).

Během pokusu bylo psům umožněno přijímat pouze NSAID, rybí olej a/nebo glukosamin/chondroitin sulfát bez jakékoli změny těchto léků 4 týdny před nebo během 10-týdenní studie jako standard péče pro onemocnění OA. Jiné použité analgetické léky, jako je gabapentin a tramadol, byly přerušeny nejméně 2 týdny před zařazením. Psi byli vyloučeni, pokud byl objeven důkaz o renálním, nekontrolovaném endokrinním, neurologickém nebo neoplastickém onemocnění nebo pokud podstupovali fyzikální terapii. Každý pes byl krmen běžnou stravou bez jakýchkoliv změn povolených během pokusu.

KLINICKÁ ZKOUŠKA

Studie byla randomizovaná, placebem kontrolovaná, majiteli a veterinárnímu lékaři dvojitě slepá, zkřížená. Psi obdrželi každé ze dvou ošetření v náhodném pořadí (Randomizer iPhone Application): CBD, 2 mg / kg každých 12 hodin nebo placebo (ekvivalentní objem olivového oleje s 10 díly na tisíc anýzového oleje a 5 dílů na tisíc pepermintového oleje k poskytnutí podobného bylinného pachu) každých 12 hodin. Každá léčba byla podávána po dobu 4 týdnů s 2-týdenním promývacím obdobím mezi léčebnými postupy. Byla odebrána krev, aby se opakovaly kompletní krevní obraz a biochemická analýza ve 2. a 4. týdnu pro každou léčbu.

Při každé návštěvě byl každý pes hodnocen veterinářem na základě vyhodnocovacího systému, který byl předtím popsán (25), stejně jako svým majitelem (CBPI, Hudsonův rozsah aktivity) před zahájením léčby a ve 2. a 4. týdnu (26-28).

STATISTICKÁ ANALÝZA

Na počátku byla provedena power analýza, aby se stanovil počet psů potřebných pro tuto studii jako zkřížený design s výkonem 0,80 a alfa 0,05 za použití předcházejících údajů naznačujících změnu skóre CBPI nebo Hudsona o ~ 15 bodů (oboustranně) se standardní odchylkou 20. Po výpočtu bylo ustanoveno, že by bylo zapotřebí 14 psů k nalezení rozdílů ve sledovaných hodnotách(29).

Statistická analýza byla provedena komerčně dostupným softwarem (JMP 12.0, Cary, NC, USA). Všechny průběžné údaje byly hodnoceny za použití Shapiro-Wilkova testu normality. Vzhledem k

tomu, že většina hodnot našeho krevního obrazu, biochemie séra a klinického bodování byla normálně distribuována, byl pro analýzu výsledků použit smíšený model, včetně fixních hodnot, tj. účinků léčby, času, pořadí přidělení léčby, pohlaví, věku, použití NSAID, léčba x čas; stejně jako náhodných veličin, které mohly ovlivnit období pozorování, aby se zohlednila hierarchická povaha údajů ve zkříženém designu studie, jakož i opakovaných měření u každého psa. Pro veterinární skórování byly použity podobné lineární smíšené modely, ale odchylky od výchozích hodnot byly nejprve vypočítány tak, aby se přiblížily k normální distribuci, aby byly splněny předpoklady pro smíšený model analýzy. Zbytková diagnostika všech konečných modelů ukázala, že rezidua byla normálně rozdělena a splňovala předpoklad homoscedasticity, a předpoklady byly tedy splněny. Tento přístup založený na statistickém modelování umožnil adekvátní kontrolu hierarchické struktury dat, která byla nutná při návrhu zkříženého designu, jakož i pro provedení snadno interpretovatelného časového zpracování Tukeyho post-hoc srovnání, které byly naším hlavním zájmem ve srovnání s řadovou logistickou regresí (30, 31). Kvůli kontrole odchylek od výchozích hodnot, a tudíž možným rozdílům v relativní změně bolesti, CBPI a hodnocení aktivity a Hudsonova skóre u psů, byla počáteční CPBI nebo Hudsonova skóre zahrnuta pro tyto analýzy jako kovariát. Párové srovnání mezi časovými body obou skupin bylo korigováno pro několikanásobné srovnání s Tukeyovými post-hoc testy, které zkoumaly interakci časových a léčebných proměnných a vyhodnotily rozdíly mezi změnami od výchozího stavu v jakémkoli okamžiku v souvislosti s léčbou. P-hodnota menší než 0,05 byla definována jako hraniční.

VÝSLEDKY

Farmakokinetika

Farmakokinetika prokázala, že poločas eliminace CBD činil 4,2 h (3,8-6,8 hodiny) pro dávku 2 mg / kg a 4,2 hodiny (3,8-4,8 hodiny) pro dávku 8 mg / kg (tabulka 1). Průměrná maximální koncentrace CBD oleje byla 102,3 ng / ml (60,7-132,0 ng / ml, 180 nM) a 590,8 ng / ml (389,5-904,5 ng / ml, 1,2 uM) a byla dosažena po 1,5 a 2 hodinách pro dávku 2 i 8 mg / kg. Žádné zjevné psychoaktivní účinky nebyly pozorovány při dávce 2 a 8 mg / kg v žádném časovém okamžiku během 24 hodin. Tyto výsledky vedly k ustanovení dávky v průběhu klinické studie na 2 mg / kg tělesné hmotnosti každých 12 hodin. Zvaženo bylo i to, že dávkování 8mg/kg je u většinou velkých pacientů nákladné, častější dávkování nepraktické, byl by potřebný velký objem oleje, a existují anekdotické zprávy o dávkování 0,5 až 2 mg / kg doporučené jinými dodavateli.

Tabulka 1 Sérová farmakokinetika při podání jedné dávky (2mg/kg a 8mg/kg) CBD u psů

	Cmax (ng/mL)	Tmax (h)	T1/2 elim (h)	AUC 0-t (ng-hr/mL)	MRT (h)
DOSE (2 mg/kg)					
Dog 1	61	1	4.4	183	6.0
Dog 2	132	1	3.9	351	4.2
Dog 3	102	2	3.8	382	5.1
Dog 4	101	2	6.8	437	9.1
Median (Range)	102 (61–132.0)	1.5 (1.0–2.0)	4.2 (3.8–6.8)	367 (183–437)	5.6 (4.2–9.1)
DOSE (8 mg/kg)					
Dog 1	499	2	3.8	2,928	5.7
Dog 2	389	1	4.8	1,753	7.0
Dog 3	905	2	4.2	3,048	5.1
Dog 4	682	2	4.1	2,389	5.2
Median (Range)	591 (389–905)	2.0 (1.0–2.0)	4.2 (3.8–4.8)	2,658 (1,753–3,048)	5.6 (5.1–7.0)

Cmax, maximum concentration; Tmax, time of maximum concentration; T1/2 el, half-life of elimination; AUC 0-t, area under the curve (time 0–24 h); MRT, median residence time.

Psi zařazení klinické zkoušky

Bylo přijato dvacet dva psů vlastněných chovateli s klinicky a radiologicky potvrzenými důkazy o osteoartritidě. Šestnáct z těchto psů dokončilo studii a bylo zařazeno do analýzy; jejich plemeno, hmotnost, věk, pohlaví, vážněji postižené končetiny, radiografické nálezy, použití nesteroidních protizánětlivých léků a sekvence léčby jsou shrnuty v tabulce 2. Psi byli odstraněni z důvodu osteosarkomu v době zařazení, žaludeční torze (placebo), předchozí problémy s agresivitou (CBD olej), pyelonefritida / ledvinová nedostatečnost (CBD olej), recidivující pododermatitida (placebo olej) a průjem (placebo olej).

Tabulka 2 Charakteristika psů zařazených do placebem kontrolované studie zkoumající efekt CBD při osteoartróze

Breed	Weight (kg)	Age (years)	Sex	Radiographic findings and OA localization	NSAID
Rottweiler	35.3	10	FS	- Moderate, intracapsular swelling with moderate osteophytosis, left stifle	Carprofen (2.1 mg/kg BID)
Mix	30.6	13	MC	- Moderate-to-severe, right-shoulder osteoarthritis; mild, left-shoulder osteoarthritis - Moderate-to-severe, bilateral hip osteoarthritis	None
Mix	27.2	9	FS	- Moderate medial coronoid remodeling (with fragmentation on the right) and bilateral elbow osteoarthritis	None
Mix	30.5	14	MC	- Moderate enthesiopathies on right carpus; mild, left-antebrachicarpal osteoarthritis - Bilateral moderate coxofemoral osteoarthritis	None
Mix	23.5	10	FS	- Moderate bilateral stifle osteoarthritis and moderate intracapsular swelling	Carprofen (2.2 mg/kg)
Mix	28.1	10	FS	- Moderate bilateral elbow osteoarthritis - Moderate left-stifle osteoarthritis with intracapsular swelling	Metacam (0.1 mg/kg)
English Bulldog	25.2	8	MC	- Severe osteoarthritis, left elbow - Moderate intracapsular swelling and mild osteoarthritis, right stifle	Carprofen (2 mg/kg BID)
German Shorthaired Pointer	21.5	14	FS	- Moderate bilateral elbow osteoarthritis	Carprofen (2.4 mg/kg BID)
Labrador Retriever	26.1	13	FS	- Bilateral severe stifle osteoarthritis due to cranial cruciate ligament disease	Meloxicam (0.1 mg/kg SID)
Mix	18.2	13	FS	- Bilateral moderate elbow osteoarthritis and medial epicondylitis	Meloxicam (0.1 mg/kg SID)
Mix	22	9	FS	- Moderate, stifle osteoarthritis with moderate intracapsular swelling	None
Bernese Mountain Dog	50	3	M	- Bilateral severe elbow osteoarthritis, medial coronoid disease, and medial epicondylitis	Carprofen (2 mg/kg SID)
Belgian Malinois	25.1	9	FS	- Severe bilateral elbow osteoarthritis - Bilateral moderate hip osteoarthritis	Carprofen (2 mg/kg BID)
Mix	28.6	13	FS	- Severe bilateral elbow osteoarthritis - Severe bilateral hip osteoarthritis	None
Border Collie	22	14	MC	- Severe thoracolumbosacral osteophytosis - Multifocal carpal enthesiophytes	None
Beagle	17.6	5	MC	- Mild left elbow osteoarthritis, with possible medial coronoid disease - Moderate-to-severe bilateral stifle osteoarthritis	None

FS, female spayed; MC, male castrated; Mix, mixed breed; SID, once daily; BID, twice daily.

Klinická zkouška

Změny CBPI a Hudsonova skóre oproti výchozím hodnotám ukázaly signifikantní snížení bolesti a zvýšení aktivity ($p < 0,01$) ve 2. a 4. týdnu během léčby CBD ve srovnání s výchozím týdnem 0, zatímco při této léčbě nebyly pozorovány žádné další statisticky významné změny. (tabulka 3). Klasifikace kulhání, jak byla hodnocena veterinárními lékaři, ukázala nárůst od výchozích hodnot s věkem ($p < 0,01$), zatímco užívání NSAID ($p = 0,03$) snížilo skóre kulhání. Veterinární zhodnocení bolestivosti prokázalo snížení oproti výchozím hodnotám u psů léčených NSAID ($p < 0,01$). CBD olej vedl ke snížení skóre bolesti ve srovnání s výchozím bodem při hodnocení jak v týdnu 2, tak v týdnu 4 ($p < 0,01$ a $p = 0,02$) a při léčbě olejem CBD v týdnu 2 bylo skóre nižší než při léčbě placebem ($p = 0,02$) a léčbě placebem ve 4. týdnu ($p = 0,02$). Žádná další srovnání bolesti nebyla statisticky významná. Nebyly pozorovány žádné změny zatěžování končetiny, které byly hodnoceny s využitím veterinárního skóre kulhání a hodnocení bolesti (tabulka 3).

Tabulka 3 CBPI dotazník (Canine brief pain inventory – Dotazy na bolest a aktivitu) a Hudsonovo skóre, průměr a standardní odchylka; kulhání; skóre zatěžování a skóre bolesti – medián a rozmezí ve všech časových bodech pro CBD olej a placebo olej.

	CBD oil			Placebo oil		
	Week 0	Week 2	Week 4	Week 0	Week 2	Week 4
CBPI Pain (0–40)	21 ± 8	14 ± 6*	14 ± 8*	17 ± 7	19 ± 9	19 ± 9
CBPI activity interference (0–60)	35 ± 15	25 ± 15*	26 ± 14*	27 ± 15	29 ± 15	31 ± 16
Hudson (0–110)	54 ± 13	67 ± 15*	67 ± 10*	65 ± 14	64 ± 16	60 ± 19
Veterinary lameness§	3 (1–4)	3 (1–4)	3 (1–4)	3 (2–4)	3 (2–4)	3 (1–4)
Veterinary pain f	3 (3–4)	3 (2–4)*	3 (1–4)*	3 (2–4)**	3 (2–4)	3 (2–4)**
Veterinary weight-bearing =	2 (1–3)	2 (1–3)	2 (1–3)	2 (1–3)	2 (1–3)	2 (1–3)

*Represents significant difference ($p < 0.05$) from baseline week 0 of CBD treatment. **Represents significant differences ($p < 0.05$) from week 2 of CBD oil treatment. §Lameness was scored as follows: 1 = no lameness observed/walks normally, 2 = slightly lame when walking, 3 = moderately lame when walking, 4 = severely lame when walking, 5 = reluctant to rise and will not walk more than 5 paces. fPain on palpation was scored as follows: 1 = none, 2 = mild signs, dog turns head in recognition, 3 = moderate signs, dog pulls limb away, 4 = severe signs, dog vocalizes or becomes aggressive, 5 = dog will not allow palpation. =Weight-bearing was scored as follows: 1 = equal on all limbs standing and walking, 2 = normal standing, favors affected limb when walking, 3 = partial weight-bearing standing and walking, 4 = partial weight-bearing standing, non-weight-bearing walking, 5 = non-weight-bearing standing and walking.

Při každé návštěvě byla provedena biochemická analýza a kompletní krevní obraz (CBC). Žádná významná změna v naměřených hodnotách CBC nebyla zaznamenána ani u psů ošetřovaných olejem CBD, ani u psů léčených placebem (údaje nejsou uvedeny). Biochemické hodnoty séra nebyly rozdílné mezi placebem a CBD olejem (tabulka 4), s výjimkou alkalické fosfatázy (ALP), která se v průběhu času významně zvýšila od výchozí hodnoty v týdnu 4 léčby olejem CBD ($p < 0,01$); u devíti z 16 psů (obr. 1). Glukóza byla zvýšena u psů, kteří dostávali placebový olej v každém časovém bodě ($p = 0,04$) a hladiny kreatininu se v průběhu času zvyšovaly u jak u psů, kterým byl podáván olej CBD, tak u psů s placebem ($p < 0,01$); i když všechny hodnoty zůstaly v rámci referenčních rozmezí. Další významné změny v hodnotách sérové biochemie byly spojeny především s věkem a s užíváním NSAID. Zvýšení věku bylo spojeno se signifikantně vyšší hladinou močoviny (BUN, $p < 0,01$), vápníku ($p = 0,01$), fosforu ($p < 0,01$), alaninaminotransferázy (ALT, $p = 0,03$), alkalické fosfatázy ($p = 0,01$), gamaglutamyltransferázy (GGT, $p = 0,02$), globulinu ($p = 0,02$) a cholesterolu ($p < 0,01$). Použití NSAID bylo spojeno se signifikantně vyšší hodnotou BUN ($p = 0,003$) a kreatininu ($p = 0,017$) a významným snížením celkového proteinu ($p < 0,001$) a sérového globulinu ($p < 0,001$).

Tabulka 4 Hodnoty biochemických parametrů séra u psů léčených CBD olejem a placebem

	Reference	CBD oil			Placebo oil		
		Week 0	Week 2	Week 4	Week 0	Week 2	Week 4
Sodium	145–153 mEq/L	149 ± 3	149 ± 2	149 ± 1	149 ± 1	149 ± 2	149 ± 2
Potassium	4.1–5.6 mEq/L	4.9 ± 0.3	4.9 ± 0.5	4.9 ± 0.3	4.8 ± 0.4	4.9 ± 0.4	4.9 ± 0.3
Chloride	105–116 mEq/L	110 ± 3	109 ± 3	109 ± 2	110 ± 2	110 ± 2	110 ± 2
SUN	10–32 mg/dL	20 ± 9	20 ± 7	20 ± 6	19 ± 6	21 ± 7	19 ± 6
Creatinine	0.6–1.4 mg/dL	1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.3*	1.0 ± 0.3*	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.3*	1.0 ± 0.3*
Calcium	9.3–11.4 mg/dL	10.4 ± 0.5	10.4 ± 0.4	10.3 ± 0.4	10.4 ± 0.6	10.4 ± 0.4	10.4 ± 0.4
Phosphorus	2.9–5.2 mg/dL	3.8 ± 0.8	3.9 ± 0.8	3.9 ± 0.6	4.0 ± 0.7	3.9 ± 0.6	4.0 ± 0.5
Magnesium	1.4–2.2 mg/dL	1.8 ± 0.2	1.8 ± 0.2	1.8 ± 0.2	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1
Glucose	63–118 mg/dL	92 ± 9	89 ± 9	92 ± 9	97 ± 10*	93 ± 8	97 ± 10*
ALT	20–98 U/L	93 ± 86	93 ± 88	114 ± 119	90 ± 89	222 ± 606	166 ± 284
AST	14–51 U/L	31 ± 8	33 ± 13	34 ± 16	30 ± 8	56 ± 99	45 ± 34
ALP	17–111 U/L	160 ± 212	238 ± 268	323 ± 407*	204 ± 287	186 ± 287	175 ± 248
GGT	0–6 U/L	4 ± 3	3 ± 2	3 ± 2	3 ± 2	4 ± 6	5 ± 4
Bilirubin	0.0–0.2 mg/dL	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.1
Total protein	5.3–7.0 g/dL	6.3 ± 0.4	6.4 ± 0.5	6.3 ± 0.4	6.3 ± 0.4	6.3 ± 0.4	6.3 ± 0.4
Albumin	3.1–4.2 g/dL	3.7 ± 0.2	3.7 ± 0.2	3.7 ± 0.2	3.7 ± 0.2	3.7 ± 0.2	3.7 ± 0.2
Globulin	1.9–3.6 g/dL	2.6 ± 0.3	2.6 ± 0.4	2.6 ± 0.4	2.6 ± 0.4	2.6 ± 0.4	2.6 ± 0.4
Cholesterol	138–332 mg/dL	291 ± 64	301 ± 62	302 ± 62	295 ± 71	300 ± 71	308 ± 83
CK	48–260 U/L	148 ± 81	147 ± 59	134 ± 61	139 ± 57	158 ± 80	168 ± 105

Data presented at mean + standard deviations. Asterisk (*) indicates significantly different ($p < 0.05$) serum concentration from baseline week 0 CBD treatment. SUN, serum urea nitrogen; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; GGT, gamma glutamyl transferase; CK, creatine kinase.

DISKUZE

Zatím neexistuje objektivní hodnocení farmakokinetiky komerčně dostupného průmyslového konopného produktu pro perorální podání u psů. Tato studie ukázala, že terminální poločas perorálního CBD, který je v tomto konkrétním přípravku na bázi oleje nejvíce zastoupeným kanabinoidem, činí od 4 do 5 hodin, což naznačuje, že byl biologicky dostupný při dávkovacím režimu nejméně 2 mg / kg dvakrát denně. Tento poločas byl kratší než předchozí hlášení po intravenózním (1,88–2,81 a 3,75–5,63 mg / kg) a orálním podání (7,5–11,25 mg / kg) (32). V intravenózní studii byla distribuce CBD rychlá, a následovala po ní prodloužená eliminace s terminálním poločasem 9 hodin. Při předchozím zkoumání perorální biologické dostupnosti CBD bylo zjištěno, že je nízká a velmi variabilní (0–19% dávky), přičemž tři psi nevykazovali žádnou absorpci. To mohlo být způsobeno účinkem prvního průchodu jater a výrobek nebyl v olejové bázi, ale ve formě prášku v želatinové kapsli, tedy s odlišným nosičem (32). Po počátečním podání dávky 2mg/kg nebyly pozorovány žádné neurologické účinky, proto byla zvolena dávka 8 mg / kg k posouzení potenciálních neurologických účinků. Náhodné předávkování totiž může v klinické praxi nastat a vyšší dávka by mohla být nezbytná, protože předchozí studie ukázala špatnou absorpci. Přestože naši psi byli na lačno, nosičem byl olivový olej, což je potravinu. Absorpce může být v tomto případě větší a konzistentnější, což může být způsobeno lipofilním charakterem CBD, a proto může být výhodné podání spolu s potravou (32, 33). Jak již bylo dříve prokázáno, biotransformace CBD u psů zahrnuje hydroxylaci, karboxylaci a konjugaci, což vede k poměrně rychlé eliminaci, což naznačuje častější dávkovací schéma (34). Dávkovací schéma dvakrát denně bylo zvoleno vzhledem k praktické povaze tohoto dávkovacího režimu, i když eliminace je dobrá i v režimu dávkování tři nebo čtyři dávky denně. Naše naděje spočívala v tom, že lipofilní povaha CBD by umožnila ustálený stav v průběhu času, a v budoucnu jsou naléhavě potřebné studie zkoumající farmakokinetiku 24 hodin s různými dávkovacími režimy s větším počtem psů a stabilní farmakokinetikou v séru, po rozšíření léčby v klinické praxi

Hlavním cílem této studie bylo provést vlastní a veterinární dvojitě slepou, placebem kontrolovanou zkříženou studii, s cílem určit účinnost oleje CBD u psů postižených OA. Navzdory malé velikosti souboru, krátké době trvání studie a heterogenitě znaků OA, skóre CBPI a Hudsonovo skóre ukázalo, že olej CBD zvyšuje pohodlí a aktivitu v domácím prostředí u psů s OA. Navíc bylo také příznivé veterinární hodnocení bolesti. Přestože je třeba uvažovat o placebo-efektu u pacienta v důsledku subjektivního hodnocení chovatelů a veterinářů (35), zkřížený design studie omezuje tyto komplikace, protože každý pes slouží jako vlastní kontrola. Náš statistický model byl kontrolován pro možný účinek sekvence léčby. Nedostatek placebo-efektu v naší studii může být způsoben tím, že devět z 16 vlastníků se důvěrně podílí na veterinární péči, všichni znají placebo efekt, takže jsou objektivnější při poskytování zpětné vazby. Kromě toho došlo ke zdatelnému poklesu v Hudsonově skóre a ke zvýšení skóre CBPI při zahájení léčby placebem, což naznačuje potenciální přenosový účinek léčby CBD, a v budoucích studiích může být indikována delší promývací perioda. Tento přenosový účinek může mít za následek určité zlepšení při zahájení léčby placebem, které vymizelo ve 4. týdnu léčby placebem, čímž se zdůrazňuje důležitost dlouhodobějších ustálených PK studií u psů.

Během studie nebyl zaznamenán žádný významný rozdíl v subjektivním veterinárním hodnocení kulhání a kapacity nosnosti. Kinetická data byla získána od těchto psů (data nejsou zobrazena), avšak 11 ze 16 psů mělo významné bilaterální onemocnění (kolen, kyčlí nebo loktů), které v nejlepším případě umožnily hodnotit peak vertikální síly nebo symetrii. Jednostranné onemocnění v kterémkoli z výše uvedených kloubů by bylo ideální pro studium kinetických účinků tohoto nebo podobných extraktů pro úlevu od bolesti vedoucí k lepšímu objektivnímu výsledku. Populace, kterou jsme použili při našem vyšetřování, byla reprezentativní pro psy předváděné v klinickém prostředí pro léčbu OA a představuje typického pacienta s OA.

V současnosti jsou NSAID primární léčbou OA a jsou spojeny s negativními účinky na gastrointestinální trakt a glomerulární filtraci (2). V současné studii nebyly pozorovány žádné významné rozdíly mezi BUN, kreatininem nebo fosforem u psů léčených CBD olejem oproti placebo, zatímco léčba NSAID vedla k vyšší koncentraci kreatininu. Mírný vzestup kreatininu z výchozí hodnoty byl zaznamenán v obou skupinách ve 2. a 4. týdnu, stav hydratace psů nebyl znám; nicméně změny v koncentraci sodíku, albuminu a chloridu se nezměnily, což naznačuje, že došlo k rehydrataci a všechny hodnoty kreatininu zůstaly v referenčním intervalu. Zvýšená aktivita ALP je poměrně citlivá pro hepatobiliární změny v této věkové skupině, ale není specifická. Zvýšená aktivita ALP, zaznamenaná u devíti psů v skupině léčené CBD, může být účinkem konopného extraktu, který se připisuje indukci oxidativního metabolismu jater (bylo hlášeno dříve v souvislosti s prolongovanou expozicí konopí) (36-38) zprostředkovaného cytochromem p450. Jiné příčiny cholestázy, zvýšené uvolňování endogenních stresových kortikosteroidů nebo progresu regenerační nodulární hyperplazie jater nelze vyloučit. Bez souběžného významného zvýšení ALT při léčbě CBD, které by podpořilo důkaz o hepatocelulárním poškození, nebo biopsie jater pro další objasnění, je jeho význam nejistý. V tomto případě může být obezřetné monitorovat hodnoty jaterních enzymů (zejména ALP), pokud psi dostávají průmyslové konopné produkty, až do zveřejnění kontrolovaných dlouhodobých studií bezpečnosti.

Nedávný průzkum uvádí, že majitelé domácích zvířat schvalují léčivé přípravky a produkty na bázi konopí, díky pocíťovanému zlepšení příznaků onemocnění, jelikož konopné produkty byly středně až velmi léčebně nápomocné (39). Některá z onemocnění, u kterých nastává zlepšení při konzumaci konopí, jsou: bolest, zánět, úzkost a fobie, gastrointestinální problémy a pruritus (39). Jedna imunohistochemická studie naznačila, že kanabinoidy mohou chránit proti účinkům imunologicky zprostředkovaných a zánětlivých alergických poruch u psů (40), zatímco další nekontrolovaná studie naznačuje, že CBD má u psů antikonvulzivní a antiepileptické vlastnosti (41). Zjevný analgetický účinek průmyslových olejů na bázi konopí pozorovaných v této studii může být způsoben

downregulací enzymů cylooxygenázy, potenciace glycin-interneuronu, agonismem V1 receptorového receptoru potenciálního kationtového receptoru (periferní nervy) a / nebo aktivací receptoru g-proteinu 55 (imunitní buňky), ovlivňující nociceptivní signalizaci a / nebo zánět (14, 42, 43).

Průmyslový konopný výrobek použitý v této studii je patentovaným specifickým extraktem kanabinoidů popsaným v metodách s relativně vysokými koncentracemi CBD a menšími množstvími jiných kanabinoidů a malými množstvími terpenů, které mohou mít synergické účinky. To svědčí o tom, že různé kmeny konopí produkují různá množství CBD a dalších souvisejících kanabinoidů, které činí výsledky této studie specifické pro tento průmyslový extrakt konopí, který se nemusí shodovat s jinými dostupnými produkty kvůli rozdílným koncentracím kanabinoidů na tomto velmi neregulovaném trhu.

Závěrem bylo prokázáno, že tento konkrétní produkt je biologicky dostupný u malého počtu psů vyšetřovaných v PK části této studie, a že psi s OA, kteří dostávali tento průmyslový extrakt konopí s vysokým obsahem CBD (2 mg / kg CBD), byli vnímáni jako spokojenější a aktivnější. Zdá se, že nebyly pozorovány žádné vedlejší účinky léčby ani u psů použitých v PK studii při dávkování 2 a 8 mg / kg, ani u psů, kteří podstoupili léčbu OA po dobu jednoho měsíce. U některých psů došlo ke zvýšení aktivity alkalické fosfatázy, což by mohlo souviset s léčbou. K identifikaci dlouhodobých účinků průmyslových konopí bohatých na CBD jsou potřeba další, dlouhodobé studie s větší populací, nicméně krátkodobé účinky se zdají být pozitivní.

AUTORSKÉ PŘÍSPĚVKY

L-JG byla zodpovědná za analýzu a interpretaci dat, vypracování rukopisu a schválení předloženého rukopisu. JB byla zodpovědná za koncepci studie a vypracování rukopisu a jeho revize. CF byl zodpovědný za získání dat a revize rukopisů. WS byl zodpovědný za farmakokinetické hodnocení a revizi rukopisu. SM odpovídala za statistickou analýzu, analýzu dat a revizi rukopisu. LW byla zodpovědná za laboratorní práci včetně kapalinové chromatografie-hmotnostní spektrometrie. HB byla zodpovědná za interpretaci výsledků vyšetření krve a revize rukopisu. EB byla zodpovědná za získávání dat a analýzu dat. JW byl zodpovědný za koncepci studie, sledování sběru dat, statistickou analýzu a úpravu rukopisů.

FINANCOVÁNÍ

Společnost Ellevet LLC podpořila tento výzkum grantem pro Cornell University ke studiu tohoto produktu.

PROHLÁŠENÍ O KONFLIKTU ZÁJMŮ

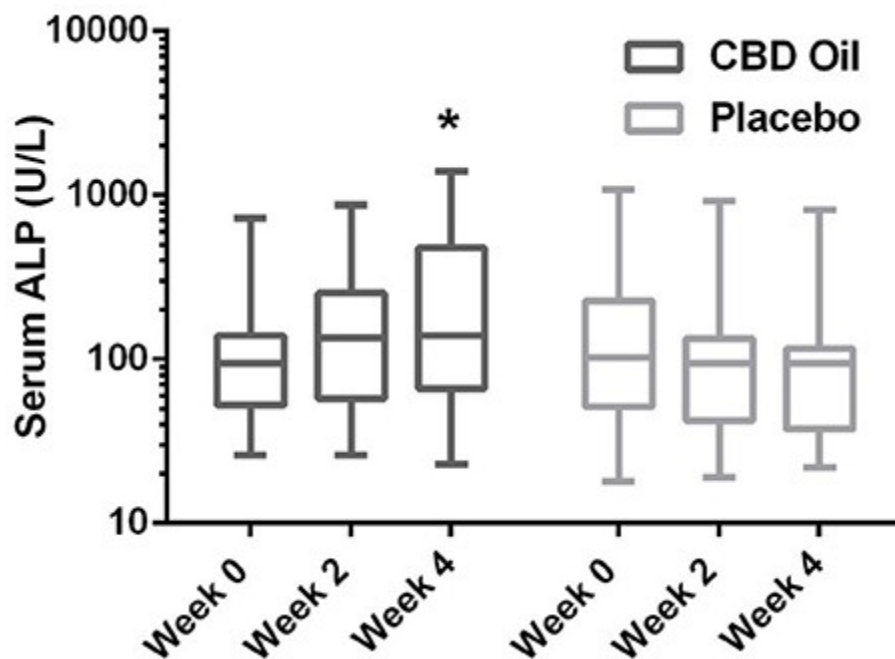
Autoři prohlašují, že výzkum byl proveden bez obchodních či finančních vztahů, které by mohly být považovány za potenciální střet zájmů.

Zkratky

CBD, kanabidiol; CB, kanabinoid; CBDA, karboxylová kyselina CBD; THC, tetrahydrokanabinol; CBC, kanabichromen; CBG, kanabigerol; CBPI, Canine Brief Pain Inventory.

Obrázek 1 Aktivita sérové ALP pro jednotlivé časové body pro léčbu CBD a placebo. Čtverec reprezentuje průměr a 25. a 75. percentil a linie představují 99. a 1. percentil.

*Indikuje signifikantní rozdíl ($p < 0,05$) od týdne 0 léčby CBD



CBD Olej

Placebo

Týden 0 Týden 2 Týden
4

Týden 0 Týden 2 Týden
4

Literatura:

Kukanich B, Bidgood T, Knesl O. Clinical pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in dogs. *Vet Anaesth Analg.* (2012) 39:69–90. doi: 10.1111/j.1467-2995.2011.00675.x

2. Lomas AL, Grauer GF. The renal effects of NSAIDs in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* (2015) 51:197–203. doi: 10.5326/JAAHA-MS-6239
3. Monteiro-Steagall BP, Steagall PV, Lascelles BD. Systematic review of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced adverse effects in dogs. *J Vet Intern Med.* (2013) 27:1011–9. doi: 10.1111/jvim.12127
4. Luna SP, Basilio AC, Steagall PV, Machado LP, Moutinho FQ, Takahira RK, et al. Evaluation of adverse effects of long-term oral administration of carprofen, etodolac, flunixin meglumine, ketoprofen, and meloxicam in dogs. *Am J Vet Res.* (2007) 68:258–64. doi: 10.2460/ajvr.68.3.258
5. Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov.* (2004) 3:771–84. doi: 10.1038/nrd1495
6. Ben-Shabat S, Hanuš LO, Katzavian G, Gallily R. New cannabidiol derivatives: synthesis, binding to cannabinoid receptor, and evaluation of their antiinflammatory activity. *J Med Chem.* (2006) 49:1113–7. doi: 10.1021/jm050709m
7. Maione S, Piscitelli F, Gatta L, Vita D, De Petrocellis L, Palazzo E, et al. Non-psychoactive cannabinoids modulate the descending pathway of antinociception in anaesthetized rats through several mechanisms of action. *Br J Pharmacol.* (2011) 162:584–96. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01063.x
8. Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, et al. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1990) 87:1932–6. doi: 10.1073/pnas.87.5.1932
9. Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussosoy D, Carrière D, Carayon P, et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem.* (1995) 232:54–61. doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20780.x
10. Cabral GA, Raborn ES, Griffin L, Dennis J, Marciano-Cabral F. CB2 receptors in the brain: role in central immune function. *Br J Pharmacol.* (2008) 153:240–51. doi: 10.1038/sj.bjp.0707584
11. Richardson D, Pearson RG, Kurian N, Latif ML, Garle MJ, Barrett DA, et al. Characterisation of the cannabinoid receptor system in synovial tissue and fluid in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* (2008) 10:R43. doi: 10.1186/ar2401
12. Rapaka RS, Makriyannis, A, editors. NIDA Research Monograph 79A RAUS Review Report. Struct-Activ Relationsh Cannabin (1987) 79:1–210.
13. Zhornitsky S, Potvin S. Cannabidiol in humans - the quest for therapeutic targets. *Pharmaceuticals* (2012) 5:529–52. doi: 10.3390/ph5050529
14. Sacerdote P, Martucci C, Vaccani A, Bariselli F, Panerai AE, Colombo A, et al. The nonpsychoactive component of marijuana cannabidiol modulates chemotaxis and IL-10 and IL-12 production of murine macrophages both in vivo and in vitro. *J Neuroimmunol.* (2005) 159:97–105. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.10.003

15. 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)143:247–50. doi: 10.1038/sj.bjp.0705920
16. Comelli F, Giagnoni G, Bettoni I, Colleoni M, Costa B. Antihyperalgesic effect of a Cannabis sativa extract in a rat model of neuropathic pain: mechanisms involved. *Phytother Res.* (2008) 22:1017–24. doi: 10.1002/ptr.2401
17. Shiue SJ, Peng HY, Lin CR, Wang SW, Rau RH, Cheng JK. Continuous intrathecal infusion of cannabinoid receptor agonists attenuates nerve ligation–induced pain in rats. *Reg Anesth Pain Med.* (2017) 42:499–506. doi: 10.1097/AAP.0000000000000601
18. Cui JH, Kim WM, Lee HG, Kim YO, Kim CM, Yoon MH. Antinociceptive effect of intrathecal cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 in a rat bone tumor pain model. *Neurosci Lett.* (2011) 493:67–71. doi: 10.1016/j.neulet.2010.12.052
19. Malfait AM, Gallily R, Sumariwalla PF, Malik AS, Andreaskos E, Mechoulam R, et al. The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral antiarthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2000) 97:9561–6. doi: 10.1073/pnas.160105897
20. Zgair A, Wong JC, Sabri A, Fischer PM, Barrett DA, Constantinescu CS, et al. Development of a simple and sensitive HPLC–UV method for the simultaneous determination of cannabidiol and 1(9)-tetrahydrocannabinol in rat plasma. *J PharmBiomed Anal.* (2015) 114:145–51. doi: 10.1016/j.jpba.2015.05.019
21. Kirkwood JS, Broeckling CD, Donahue S, Prenni JE. A novel microflow LC-MS method for the quantitation of endocannabinoids in serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* (2016) 1033–1034:271–7. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.08.035
22. MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, Chambers M, Finney GL, Frewen B, et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* (2010) 26:966–8. doi: 10.1093/bioinformatics/btq054
23. Broccardo CJ, Schauer KL, Kohrt WM, Schwartz RS, Murphy JP, Prenni JE. Multiplexed analysis of steroid hormones in human serum using novel microflow tile technology and LC–MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* (2013) 934:16–21. doi: 10.1016/j.jchromb.2013.06.031
24. Shrivastava A, Gupta VB. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chron Young Sci.* (2011) 2:21–5. doi: 10.4103/2229-5186.79345
25. McCarthy G, O'Donovan J, Jones B, McAllister H, Seed M, Mooney C. Randomised double-blind, positive-controlled trial to assess the efficacy of glucosamine/chondroitin sulfate for the treatment of dogs with osteoarthritis. *Vet J.* (2007) 174:54–61. doi: 10.1016/j.tvjl.2006.02.015
26. Brown DC, Bell M, Rhodes L. Power of treatment success definitions when the Canine Brief Pain Inventory is used to evaluate carprofen treatment for the control of pain and inflammation in dogs with osteoarthritis. *Am J Vet Res.* (2013) 74:1467–73. doi: 10.2460/ajvr.74.12.1467
27. Brown DC, Boston RC, Coyne JC, Farrar JT. Ability of the canine brief pain inventory to detect response to treatment in dogs with osteoarthritis. *J Am Vet Med Assoc.* (2008) 233:1278–83. doi: 10.2460/javma.233.8.1278
28. Hudson JT, Slater MR, Taylor L, Scott HM, Kerwin SC. Assessing repeatability and validity of a visual analogue scale questionnaire for use in assessing pain and lameness in dogs. *Am J Vet Res.* (2004) 65:1634–43. doi: 10.2460/ajvr.2004.65.1634
29. Fahie MA, Ortolano GA, Guercio V, Schaffer JA, Johnston G, Au J. A randomized controlled trial of the efficacy of autologous platelet therapy for the treatment of osteoarthritis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* (2013) 243:1291–7. doi: 10.2460/javma.243.9.1291
30. Lubke, Gitta H, Muthen, Bengt O. Applying multigroup confirmatory factor models for continuous outcomes to likert scale data complicates meaningful group comparisons. *Struct Equat Model.* (2004) 11:514–34. doi: 10.1207/s15328007sem1104_2
31. Carifio J, Perla R. Ten common misunderstandings, misconceptions, persistent myths and urban legends about likert scales and likert response formats and their antidotes. *J Soc Sci.* (2007) 2:106–16.

32. Samara E, Bialer M, Mechoulam R. Pharmacokinetics of cannabidiol in dogs. *Drug Metab Dispos.* (1988) 16:469–72.
33. Garrett ER, Hunt CA. Physicochemical properties, solubility, and protein binding of delta9-tetrahydrocannabinol. *J Pharm Sci.* (1974) 63:1056–64. doi: 10.1002/jps.2600630705
34. Harvey DJ, Samara E, Mechoulam R. Comparative metabolism of cannabidiol in dog, rat and man. *Pharmacol Biochem Behav.* (1991) 40:523–32.
35. Conzemius mg, Evans RB. Caregiver placebo effect for dogs with lameness from osteoarthritis. *J Am Vet Med Assoc.* (2012) 241:1314–9. doi: 10.2460/javma.241.10.1314
36. Bornheim LM, Correia MA. Effect of cannabidiol on cytochrome P-450 isozymes. *Biochem Pharmacol.* (1989) 38:2789–94. doi: 10.1016/0006-2952(89)90432-2
37. Khanna P, Gupta MB, Gupta GP, Sanwal GG, Ali B. Influence of chronic oral intake of cannabis extract on oxidative and hydrolytic metabolism of xenobiotics in rat. *Biochem Pharmacol.* (1991) 41:109–13. doi: 10.1016/0006-2952(91)90017-Y
38. Yamamoto I, Watanabe K, Narimatsu S, Yoshimura H. Recent advances in the metabolism of cannabinoids. *Int J Biochem Cell Biol.* (1995) 27:741–6. doi: 10.1016/1357-2725(95)00043-O
39. Kogan LR, Hellyer PW, Robinson NG. Consumers' perceptions of hemp products for animals. *J Am Holist Vet Med Assoc.* (2016) 42:40–8.
40. Campora L, Miragliotta V, Ricci E, Cristino L, Di Marzo V, Albanese F, et al. Cannabinoid receptor type 1 and 2 expression in the skin of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis. *Am J Vet Res.* (2012) 73:988–95. doi: 10.2460/ajvr.73.7.988
41. Karler R, Turkkanis SA. The cannabinoids as potential antiepileptics. *J Clin Pharmacol.* (1981) 21:437S–48S. doi: 10.1002/j.1552-4604.1981.tb02624.x
42. Kathmann M, Flau K, Redmer A, Trankle C, Schlicker E. Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* (2006) 372:354–61. doi: 10.1007/s00210-006-0033-x
43. Cabral GA, Griffin-Thomas L. Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert Rev Mol Med.* (2009) 11:e3. doi: 10.1017/S146239940900957

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Gamble, Boesch, Frye, Schwark, Mann, Wolfe, Brown, Berthelsen and Wakshlag. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.