



¹Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt, Instytut Hodowli Zwierząt, ul. Chełmońskiego 38C, 51-630 Wrocław, e-mail: maria.soroko@upwr.edu.pl

²Politechnika Wroclawska, Wydział Mechaniczny, Katedra Inżynierii Pojazdów,
ul. Na Grobli 13, 50-421 Wrocław

³Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Katedra i Klinika Chirurgii, pl. Grunwaldzki 51, 50-366 Wrocław

KAROLINA NAWROT¹, MARIA SOROKO-DUBROVINA¹,
WANDA GÓRNIAK², ALEKSANDER GÓRNIAK²,
PAULINA ZIELIŃSKA³

Wpływ kannabidiolu na rytm serca, stężenie kortyzolu w ślinie i czas podejścia do przeszkody w testach lękliwości u koni rekreacyjnych – badanie pilotażowe

Effect of cannabidiol on heart rate, salivary cortisol concentration and approach time in fear tests in school horses – a pilot study

Streszczenie. Celem pracy była ocena wpływu kannabidiolu (CBD) na rytm serca, stężenie kortyzolu w ślinie oraz czas podejścia do przeszkody u koni poddanych testom lękliwości. W badaniu uwzględniono 20 koni rasy polski koń sportowy, podzielonych na grupę badawczą oraz kontrolną. Koniom z grupy badawczej podawano codziennie przez 21 dni CBD w ilości 100 mg. Obie grupy były poddane dwóm testom lękliwości: przed rozpoczęciem suplementacji, w 10. i 11. oraz 20. i 21. dniu suplementacji. Pomiar rytmu serca oraz pobranie śliny w celu wyznaczenia stężenia kortyzolu w ślinie, wykonano przed i po zakończeniu każdego testu dla obu grup. Dodatkowo zmierzono czas podejścia do przeszkody w obu testach lękliwości. W badaniach nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w stężeniu kortyzolu i rytmie serca pomiędzy grupą badawczą a kontrolną. Wykazano istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami w czasie podejścia do przeszkody w trzech badaniach. Uzyskane wyniki nie świadczą

Cytowanie: Nawrot K., Soroko-Dubrovina M., Górniak W., Górniak A., Zielińska P., 2023. Wpływ kannabidiolu na rytm serca, stężenie kortyzolu w ślinie i czas podejścia do przeszkody w testach lękliwości u koni rekreacyjnych – badanie pilotażowe. *J. Anim. Sci. Biol. Bioecon.* 39(2), 25–38. <https://doi.org/10.24326/jasbb.2023.5225>

w sposób jednoznaczny o przeciwłękowym działaniu CBD na organizm konia, ale skrócenie czasu podejścia do przeszkody daje podstawy do dalszych badań nad przeciwłękowym działaniem CBD u koni.

Słowa kluczowe: kannabidiol, konie, test lękalności, suplementacja

WSTĘP

Kannabidiol (CBD) jest organicznym związkiem chemicznym, jednym z kannabinoidów występujących w konopiach – roślinach gatunku *Cannabis sativa*, posiadającym właściwości lecznicze oraz profilaktyczne [Zuardi 2006]. Związek ten wpływa na układ endokannabinoidowy (ECS), który występuje u prawie wszystkich organizmów żywych, od prymitywnych parzydełkowców po ssaki [Pagotto i in. 2006]. Tak wczesne pojawienie się w ewolucji ECS wskazuje na jego duże znaczenie biologiczne [Silver 2019]. Składa się on z receptorów endokannabinoidowych (CBR), które obecne są w ośrodkowym układzie nerwowym, układzie odpornościowym [Jean-Gilles i in. 2015], jak również w tkankach obwodowych, gdzie odpowiadają za zachowanie homeostazy neuroimmunologicznej [Joshi i Onaivi 2019]. Układ endokannabinoidowy pełni ważną rolę w poprawie komunikacji pomiędzy neuronami, gdzie moduluje aktywność neuronów [Pagotto i in. 2006], bierze udział w funkcjach fizjologicznych takich jak powstawanie stanów zapalnych, odczuwanie bólu, lęku, w uczeniu się [Luedke i Wilhelm 2021], w regulacji bilansu energetycznego [Cota 2007], apetytu [Jamshidi i Taylor 2001] oraz poczuciu nagrody lub satysfakcji [Gardner 2005].

W badaniach naukowych podkreśla się szczególną rolę ECS w odpowiedzi na stres przez wpływ na oś podwzgórze-przysadka-nadnercza. W medycynie ludzkiej prowadzone są szerokie badania nad oddziaływaniem CBD na układ neurologiczny poprzez reaktywność na bodźce oraz poziom stresu [Schiavon i in. 2016]. Przeprowadzono badania, podczas których potwierdzono wpływ CBD na modulację pobudliwości neuronów u ludzi, co powoduje, że związek ten może stać się istotnym elementem leczenia padaczki. Pomimo, że szczegółowy mechanizm działania CBD na kontrolę napadów padaczkowych nie jest znany, zauważono istotną redukcję ich częstotliwości u pacjentów podczas regularnej suplementacji [Crippa i in. 2016]. Sugeruje się, że CBD jest częściowym agonistą receptora 5-HT_{1A} (receptor serotoninowy), który m.in. odpowiada za właściwości przeciwłękowe, przeciwdepresyjne i redukujące stres [Russo i in. 2005].

Badania kliniczne nad zastosowaniem CBD u zwierząt w redukcji stresu są ograniczone. Związek ten metabolizuje się inaczej u zwierząt niż u ludzi i to samo stężenie może wywołać różne efekty, ponieważ w zależności od dawki współdziała z różnymi związkami chemicznymi w organizmie [Iffland i Grotenhermen 2017]. Jedno z pierwszych badań dotyczących wpływu CBD na poziom stresu u zwierząt przeprowadzone było na gryzoniach. Wykazano, że suplementacja CBD zmniejszyła reakcje lękowe u myszy z zespołem łamliwego chromosomu X – zaburzenia neurologicznego wpływającego na rozwój intelektualny, społeczny i fizyczny [Zieba i in. 2019]. W innych badaniach myszy, którym podawano CBD, wykazały zmniejszone objawy zaburzeń obsesyjno-kompulsyjnych [Deiana i in. 2012]. Badania nad skutecznością CBD

w redukcji agresywnego zachowania prowadzono na psach. CBD spowodował zmniejszenie agresywnych reakcji psów w stosunku do ludzi, jednak różnice w zmniejszeniu zachowań agresywnych między grupą suplementowaną a kontrolną nie były istotne statystycznie [Corsetti i in. 2021].

Istnieje niewiele publikacji potwierdzających wpływ CBD na zachowanie i parametry fizjologiczne koni. Badania przedstawione przez Draeger i in. [2021] dotyczyły przeciwłękowych właściwości CBD u koni. Mierzono reakcję behawioralną oraz częstotliwość akcji serca koni w reakcji na nowy obiekt. Po suplementacji nie zmienił się rytm serca u koni biorących udział w badaniu, ale zmniejszyła się ich reaktywność na nowy bodziec. Celem niniejszej pracy była ocena wpływu CBD na rytm serca, stężenie kortyzolu w ślinie oraz czas podejścia do przedmiotu u koni podczas testów lękliwości. Hipoteza badawcza założyła, że CBD obniża rytm serca, stężenie kortyzolu i czas podejścia do przeszkody w sytuacjach stresowych dla koni.

MATERIAŁY I METODY

Projekt badania został zatwierdzony przez Zespół Doradczy ds. Dobrostanu Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, zgodnie z polskimi i unijnymi przepisami dotyczącymi doświadczeń na zwierzętach (nr 7/2023). Procedury zastosowane w tym badaniu zostały uznane za niepowodujące bólu, cierpienia, dręczenia ani trwałych uszkodzeń równoważnych lub większych niż te spowodowane wprowadzeniem igły (art. 1.5f dyrektywy UE 2010/63/UE). Zgoda etyczna została udzielona bez formalnego wniosku. Uzyskano pisemną zgodę Ośrodka Jeździeckiego Lipowa na udział w badaniach wszystkich zakwalifikowanych do nich koni rekreacyjnych.

W badaniu wzięło udział 20 koni rasy polski koń sportowy (6 wałachów oraz 14 klaczy) w wieku od 5 do 16 lat, o masie ciała od 400 do 600 kg, użytkowanych rekreacyjnie. Konie biorące udział w badaniu były utrzymywane w Ośrodku Jeździeckim Lipowa w tych samych warunkach środowiskowych przez min. pół roku przed rozpoczęciem badania zgodnie z wytycznymi określonymi przez polskie i europejskie przepisy dotyczące dobrostanu zwierząt gospodarskich. Zwierzęta trzymane były w systemie bokсовym w tym samym budynku stajennym w godzinach od 18.00 do 8.00. Pozostały czas spędzały na pastwisku, przebywając w jednym stadzie.

Konie zostały podzielone losowo na grupę badawczą ($n = 10$), uwzględniając 2 wałachy, 8 klaczy (4 konie w wieku 7 lat, 3 konie w wieku 12 lat i 3 konie w wieku 16 lat) oraz kontrolną ($n = 10$), uwzględniając 4 wałachy, 6 klaczy (3 konie w wieku 7 lat, 4 konie w wieku 13 lat, 3 konie w wieku 16 lat). Koniom z grupy badawczej podawano codziennie przez 21 dni olejek CBD w ilości 100 mg [Draeger i in. 2021] kroplomierzem bezpośrednio na śluzówkę dolnej wargi [Hill i Bryne 2021]. Konie z grupy kontrolnej nie otrzymywały CBD przez cały okres trwania badań.

Obie grupy były poddane dwóm testom lękliwości opracowanych zgodnie z podstawową wiedzą o zachowaniu koni, ich wrażliwości na bodźcie i percepcji [Zeitler-Feicht 2014]. Test lękliwości nr 1 polegał na podejściu przez konia do biało-czerwonej taśmy ostrzegawczej rozwieszanej pomiędzy dwoma słupkami. Przeszkoda miała wymiary 3×3 m i zrobiona była z różnej długości pasków taśmy ostrzegawczej (min. 1 m, max. 3 m) przywiązanych do linki zawieszanej pomiędzy dwoma drewnianymi słupkami. Test przeprowadzony został na zewnętrznej ujeżdżalni. Test lękliwości nr 2 polegał

na podejściu przez konia do motywatora (marchewka) przez rozłożoną na ziemi niebieską folię o wymiarach 1×3 m. Folia miała kolor niebieski, który według badań Carroll i in. [2001] jest jednym z najlepiej zauważalnych przez konie. Doświadczenie przeprowadzono w nieznanym dla konia boksie. W dniu wykonywania testów konie nie były użytkowane rekreacyjnie. Testy łęklivosti przeprowadzono w trzech badaniach trwających dwa dni, w których wykonano oddzielnie oba testy łęklivosti: badanie 1. – przed rozpoczęciem suplementacji, badanie 2. – w połowie suplementacji (10. dzień – test łęklivosti nr 1; 11. dzień – test łęklivosti nr 2), badanie 3. – zakończenie suplementacji (20. dzień – test łęklivosti nr 1; 21. dzień – test łęklivosti nr 2). W testach łęklivosti określany był czas potrzebny koniowi, aby podejść do nieznannej przeszkody. Czas mierzony był stoperem i wyrażany w sekundach.

Rytm serca mierzono przed rozpoczęciem i zaraz po zakończeniu każdego testu łęklivosti przez 60 sekund i wyrażono w liczbie uderzeń serca na minutę. Do pomiaru użyto stetoskopu (Stetoskop 3M™ Littmann® Classic III). Stężenie kortyzolu było oznaczane z pobranej śliny przed każdym testem łęklivosti i 15 minut po jego zakończeniu [Shirtcliff i in. 2015]. Ślina była pobierana na wacik syntetyczny Salivette (SARTEDT, Numbrecht, Niemcy) poprzez pocieranie pomiędzy policzkiem a zębami konia przez 1 minutę [Schmidt i in. 2010]. Następnie waciki umieszczono w próbkach indywidualnych dla każdego z badanych koni. Probówki przechowywano w lodówce w temp. 2°C do końca dnia badań, następnie zamrożono w temperaturze -20°C . Badania analizy śliny wykonano w Laboratorium Biochemicznym na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu w Katedrze Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt. Przed rozpoczęciem analizy śliny próbówki rozmrożono oraz wirowano przez 10 minut. Stężenie kortyzolu w ślinie mierzono przy pomocy testów immunoenzymatycznych ELISA (Demeditec Diagnostics, Niemcy). Stężenie kortyzolu w ślinie wyrażono w ng/ml.

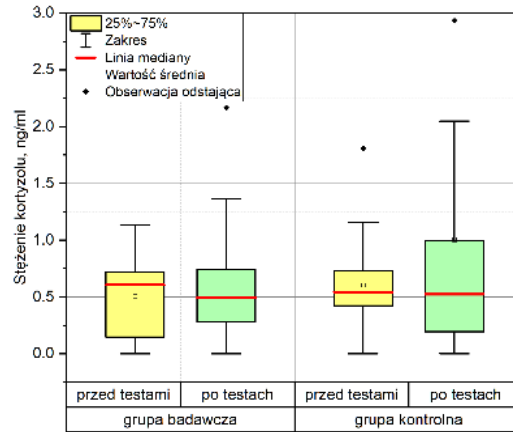
W analizach statystycznych normalność rozkładu sprawdzono za pomocą testów Kołmogorowa-Smirnowa i Shapiro-Wilka na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Część wyników nie pochodziła od rozkładu normalnego na poziomie istotności $\alpha = 0,05$, dlatego dalsze analizy statystyczne oparto o testy nieparametryczne. Różnice istotne statystycznie pomiędzy grupą suplementowaną CBD a grupą kontrolną sprawdzono, używając testu U Manna-Whitneya. Ze względu na fakt, że nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą badawczą i kontrolną, obie grupy razem porównywano dla wszystkich trzech badań, używając testu kolejności par Wilcoxon. Istotność różnic opracowano dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$. Różnice pomiędzy trzema badaniami sprawdzono za pomocą testu ANOVA Friedmana.

WYNIKI

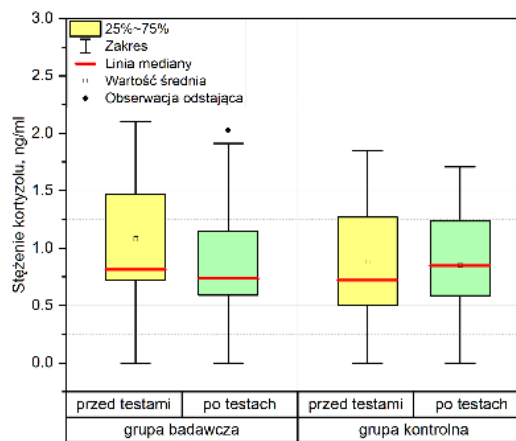
Zestawienie wyników dla grupy badawczej i kontrolnej dla trzech badań przedstawiono w formie graficznej na rysunku 1. Ze względu na fakt, że nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą badawczą i kontrolną oraz pomiędzy poszczególnymi testami i mierzonymi parametrami, obie grupy razem porównywano dla wszystkich trzech badań używając testu kolejności par Wilcoxon. W każdym z rozpatrywanych trzech badań rytm serca i stężenia kortyzolu nie różniły się istotnie statystycznie pomiędzy grupą badawczą i kontrolną na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Wykazano jednak istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami w przypadku czasu podejścia do przeszkód ($p = 0,048$).

a)

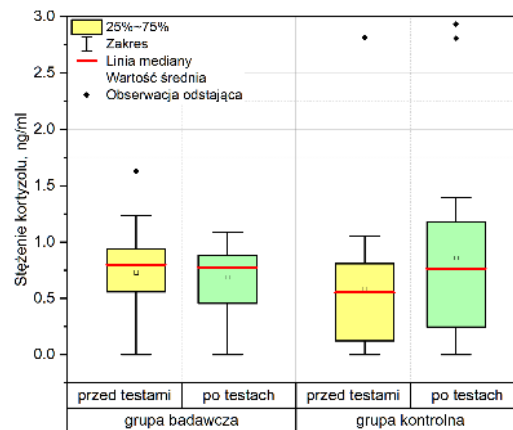
Badanie 1



Badanie 2

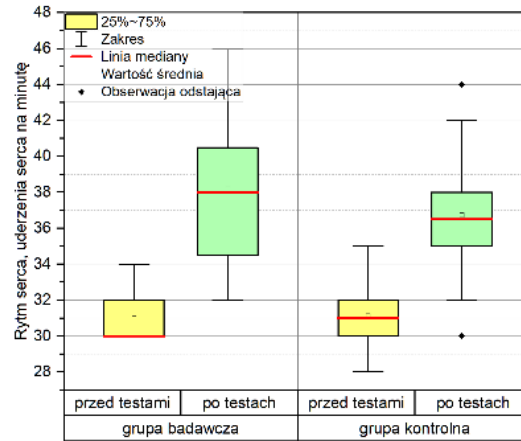


Badanie 3

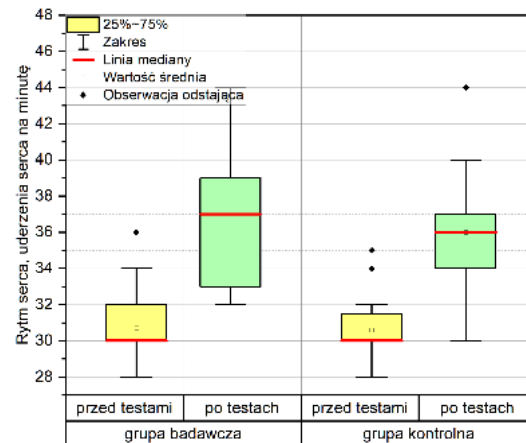


b)

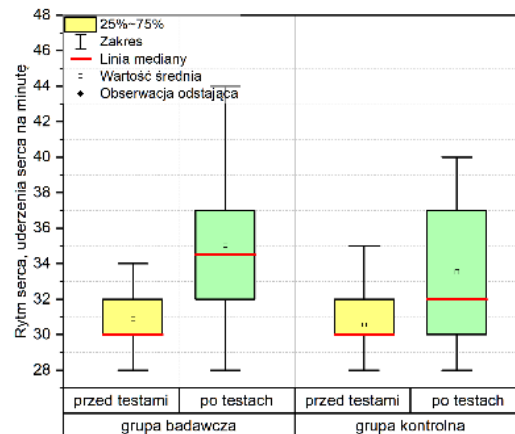
Badanie 1



Badanie 2

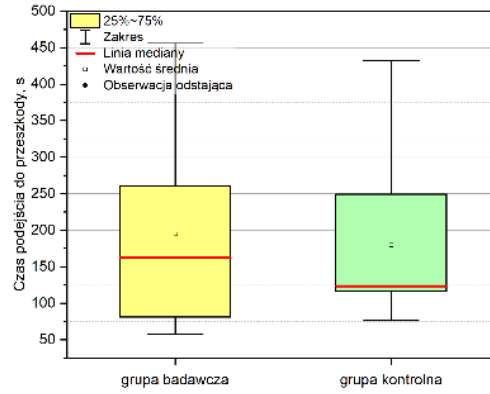


Badanie 3

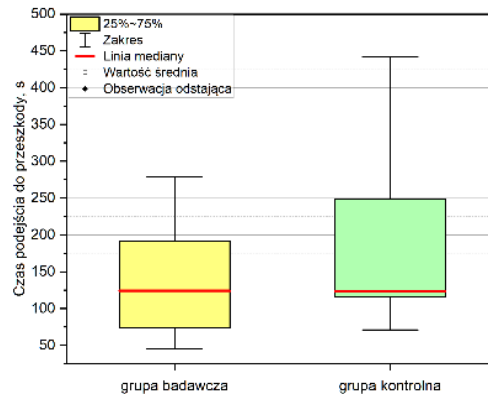


c)

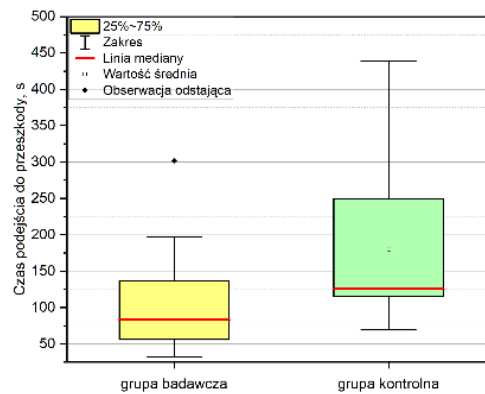
Badanie 1



Badanie 2



Badanie 3



Rys. 1. Porównanie wyników obserwacji grupy badawczej i kontrolnej w trzech badaniach: a) stężenie kortyzolu przed testami lękliwości i po nich; b) rytm serca przed testami lękliwości i po nich; c) czas podejścia do przeszkód

Fig. 1. Comparison of the results of observations for the study and control groups in three studies: a) cortisol concentration before and after fear tests; b) heart rate before and after fear tests; c) approach time to objects

Wartość współczynnika p wskazuje na istotne statystycznie różnice, ale jest zbliżony do granicznej wartości alfa. Wartość współczynnika p dla porównania grupy badawczej z kontrolną przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Istotność różnic pomiędzy grupą badawczą i kontrolną dla wszystkich testów lęklivosti w trzech badaniach. Założony poziom istotności $\alpha = 0,05$

Table 1. Significance of difference between study and control groups for all fear tests in three studies. The assumed significance level $\alpha = 0.05$

Stężenie kortyzolu przed testami lęklivosti Salivary cortisol concentration before fear tests	Stężenie kortyzolu po testach lęklivosti Salivary cortisol concentration after fear tests	Rytm serca koni przed testami lęklivosti Heart rate before fear tests	Rytm serca koni po testach lęklivosti Heart rate after fear tests	Czas podejścia do przeszkód Approach time to objects
$p = 0,1414$	$p = 0,6346$	$p = 0,8000$	$p = 0,1616$	$p = 0,0484$

Nie wykazano różnic istotnych statystycznie w stężeniu kortyzolu zmierzonego przed testami lęklivosti i po nich dla obu grup w trzech badaniach (rys. 2).

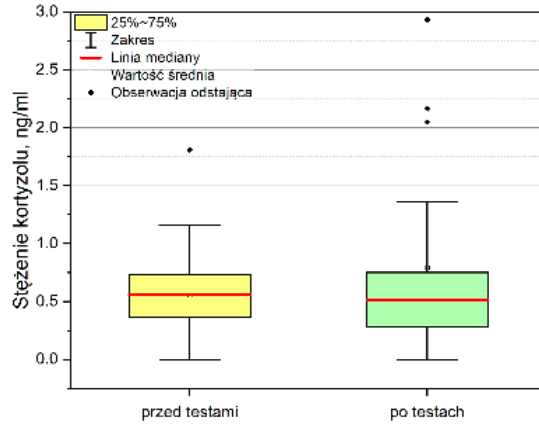
Rytm serca dla obu grup istotnie statystycznie wzrastał podczas testów lęklivosti. Wykazano różnice istotne statystycznie na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ dla trzech badań. Współczynnik p był bliski zeru, co wskazuje na istotne różnice pomiędzy pomiarem wykonanym przed testem i po nim. W badaniu 1. mediana rytmu serca koni wzrosła do 38 uderzeń na minutę, w badaniu 2. do 36, a w badaniu 3. do 34 (rys. 3).

W celu zweryfikowania, czy różnica w czasie podejścia do przeszkód była istotna statystycznie, w trzech badaniach dla obu grup użyto testu ANOVA Friedmana. Wyznaczony współczynnik $p = 0,025$ wskazał na istotne różnice w czasie podejścia do przeszkód pomiędzy trzema przeprowadzonymi badaniami. Porównując czasy podejścia do przeszkód użytych w obu testach lęklivosti dla całej badanej populacji, wykazano brak różnic istotnych statystycznie (rys. 4).

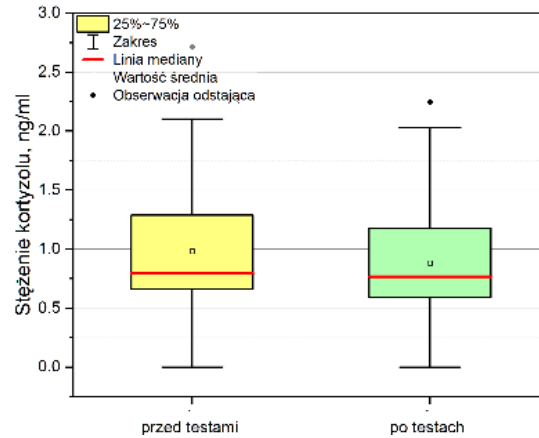
DYSKUSJA

Uzyskane wyniki nie świadczą w sposób jednoznaczny o pozytywnym działaniu suplementacji CBD na spadek poziomu stresu u koni w sytuacjach lękowych, ponieważ nie wykazano różnic istotnych statystycznie w stężeniu kortyzolu i rytmie serca pomiędzy grupą badawczą i kontrolną. Skrócenie czasu podejścia do przedmiotów w obu testach lęklivosti w trzech badaniach u grupy badawczej, wskazuje na potencjał CBD w obniżaniu lęklivosti u koni w sytuacjach stresowych. Hipoteza badawcza została potwierdzona częściowo, ponieważ CBD nie wpłynęło na obniżenie stężenia kortyzolu i rytmu serca w sytuacjach lękowych, ale przyczyniło się do skrócenia czasu podejścia do przedmiotów w obu testach lęklivosti.

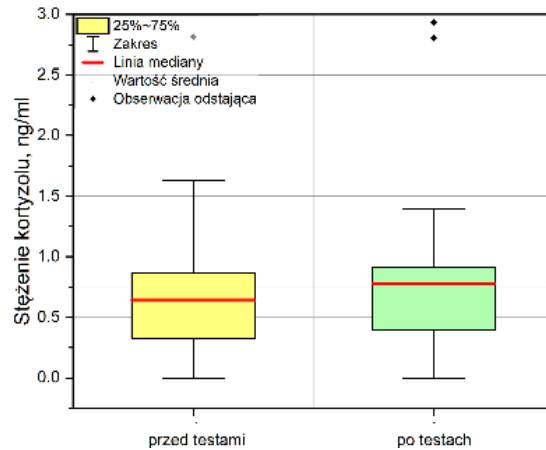
Badanie 1 ($p = 0,389$)
Study 1 ($p = 0.389$)



Badanie 2 ($p = 0,075$)
Study 2 ($p = 0.075$)

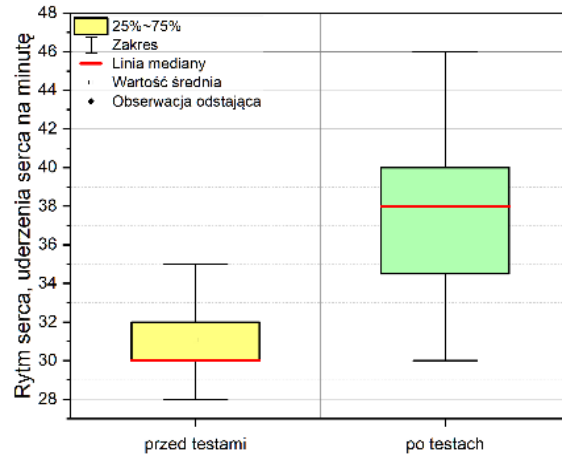


Badanie 3 ($p = 0,357$)
Study 3 ($p = 0.357$)

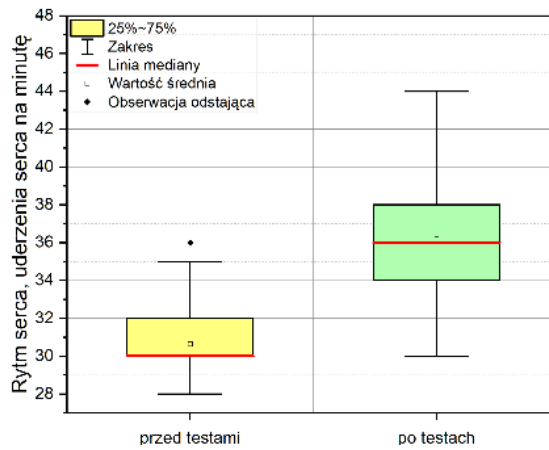


Rys. 2. Porównanie stężenia kortyzolu dla badanej populacji przed testami lęklivosti, przeprowadzonymi w trzech badaniach, i po nich
Fig. 2. Comparison of cortisol levels for the study population groups before and after fear tests conducted in three studies

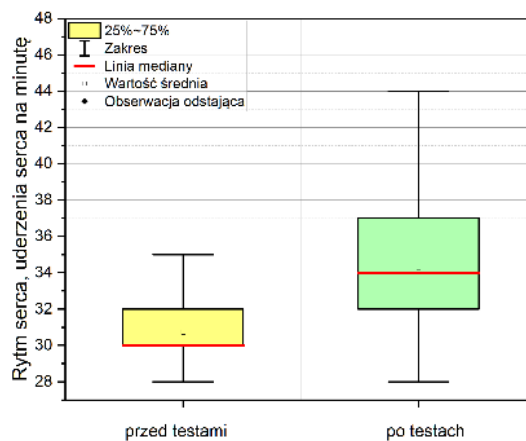
Badanie 1 ($p = 0,0000$)
Study 1 ($p = 0,0000$)



Badanie 2 ($p = 0,0000$)
Study 2 ($p = 0,0000$)

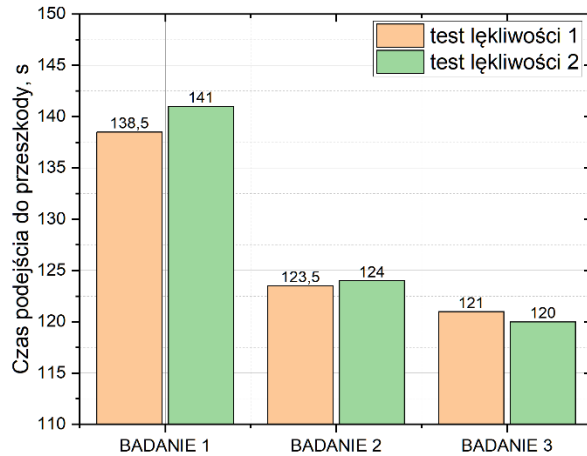


Badanie 3 ($p = 0,0000$)
Study 3 ($p = 0,0000$)



Rys. 3. Porównanie rytmu serca dla badanej populacji przed testami lęklivości, przeprowadzonymi w trzech badaniach, i po nich

Fig. 3. Comparison of heart rate for the study population before and after fear tests conducted in three studies



Rys. 4. Mediana czasu podejścia do przeszkody dla badanej populacji w obu testach lęklivosti przeprowadzonych w trzech badaniach

Fig. 4. Median approach time for the study population in both fear tests conducted in three studies

W literaturze naukowej powszechnie stosowanym parametrem w ocenie stresu zwierzęcia jest rytm serca [Rietmann i in. 2004, Schmidt i in. 2010]. W badaniach zaprezentowanych przez Draeger i in. [2021], gdzie badano wpływ CBD na rytm serca u koni poddanych testowi lęklivosti, wskazano brak statystycznie istotnych różnic w rytmie serca przed i po teście lęklivosti pomiędzy grupą suplementowaną i niesuplementowaną CBD. Podobne wyniki uzyskano w niniejszych badaniach, gdzie rytm serca nie różnił się pomiędzy grupą badawczą i kontrolną przed testem lęklivosti i po nim w trzech przeprowadzonych badaniach. Podczas obu testów lęklivosti rytm serca zmierzony przed wykonaniem doświadczenia w każdym z trzech badań, zarówno w grupie badawczej, jak i kontrolnej, był bardzo wyrównany, co świadczy o zachowaniu stałych warunków dobrostanowych zwierząt niezbędnych do prawidłowego przeprowadzenia badania. Dodatkowo wykazano, że maksymalny rytm serca malał w kolejnych badaniach dla obu grup. Również ta sama tendencja spadkowa została wykazana w czasie podejścia do przedmiotów w trzech badaniach. Może to być przyczyną efektu habituacji – odczulania koni na pokazywane im przedmioty użyte w obu testach lęklivosti. Zjawisko to jest w pełni naturalne u zwierząt płochliwych i gwarantuje przetrwanie gatunku, ponieważ konie przyzwyczajają się do nowych elementów środowiska, jeżeli występują one w sposób stały i nie stanowią dla nich zagrożenia [Goodwin 2007]. Test lęklivosti z wykorzystaniem taśmy ostrzegawczej opierał się na założeniu, że koń jako zwierzę roślinożerne musi być czujne na zmiany zachodzące w środowisku, aby nie zostać ofiarą drapieżnika. Koń z natury jest zwierzęciem roślinożernym i żywi się przede wszystkim trawą, w naturze ma pokarmu pod dostatkiem i jest on łatwo dostępny. Z tego powodu, w odróżnieniu od zwierząt drapieżnych, trudno motywuje się go do pracy podawaniem pokarmu. Dlatego podczas drugiego testu lęklivosti z przedmiotem – folią – wykorzystano motywator w postaci marchwi, która traktowana jest przez konia jako pokarm wyjątkowy i trudno dostępny, przez co bardzo dobrze motywuje go do podjęcia trudności, jaką jest podejście do folii. Dlatego zadanie to wymagało od konia odwagi oraz dobrze nadawało się do sprawdzenia poziomu stresu zmian zachodzących podczas kolejnych prób wraz z postępowaniem suplementacji CBD.

Parametrem fizjologicznym stosowanym w ocenie reakcji zwierzęcia na sytuacje stresowe jest również stężenie kortyzolu w ślinie [Peeters i in. 2010]. Dostarcza ono informacje o wolnym kortyzolu w organizmie, stąd parametr ten wykorzystany jest w wielu badaniach naukowych jako wskaźnik oznaczania w materiale biologicznym pobrany w sposób nieinwazyjny, czyli niegenerujący dodatkowo stresu [Weibel 2003, Soroko i in. 2016]. W badaniach nad wyznaczeniem poziomu stresu u koni podczas izolacji [Harewood i McGowan 2005], odsadzenia [Moons i in. 2005] czy transportu [Schmidt i in. 2010], potwierdzono przydatność określania stężenia kortyzolu w ślinie. W niniejszych badaniach obie grupy, badawcza i kontrolna, nie wykazały istotnych statystycznie zmian w stężeniu kortyzolu w ślinie w obu testach łękliwości. Stężenie kortyzolu było bardzo wyrównane w trzech badaniach.

PODSUMOWANIE

Wpływ CBD na zachowanie się koni w sytuacjach lękowych nie jest jednoznaczny. Do tej pory przeprowadzono niewiele badań sprawdzających wpływ CBD na poziom łękliwości u koni. W badawczej grupie koni czas podejścia do przeszkody był istotnie statystycznie krótszy od grupy kontrolnej. Świadczyć to może o wpływie CBD na stopień łękliwości w sytuacjach stresowych przy jednoczesnym braku wpływu na stężenie kortyzolu i rytm serca. Działanie CBD na organizm zwierzęcia nie zostało do końca poznane, jednak z doniesień naukowych wynika, że nie zaobserwowano istotnych skutków ubocznych wynikających z suplementacji CBD. Daje to podstawy do dalszych badań nad zastosowaniem CBD jako środka o działaniu przeciwlękowym u koni.

PIŚMIENNICTWO

- Carroll J., Murphy C.J., Neitz M., Ver Hoeve J.N., Neitz, J., 2001. Photopigment basis for dichromatic color vision in the horse. *J. Vis.* 1, 80–87. <https://doi.org/10.1167/1.2.2>
- Corsetti S., Borruso S., Malandrucchio L., Spallucci V., Maragliano L., Perino R., D'Agostino P., Natoli E., 2021. *Cannabis sativa* L. may reduce aggressive behaviour towards humans in shelter dogs. *Sci. Rep.* 11, 2773. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82439-2>
- Cota D., 2007. CB1 receptors: emerging evidence for central and peripheral mechanisms that regulate energy balance, metabolism, and cardiovascular health. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 23, 507–517. <https://doi.org/10.1002/dmrr.764>
- Crippa J.A.S., Crippa A.C.S., Hallak J.E.C., Martín-Santos R., Zuardi A.W., 2016. 19-THC intoxication by cannabidiol-enriched cannabis extract in two children with refractory epilepsy: full remission after switching to purified cannabidiol. *Front. Pharmacol.* 7, 359. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00359>
- Deiana S., Watanabe A., Yamasaki Y., Amada N., Arthur M., Fleming S., Woodcock H., Dorward P., Pigliacampo B., Close S., Platt B., Riedel G., 2012. Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarin (CBDV), Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabigerol (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and CBD action on obsessive-compulsive behaviour. *Psychopharmacology* 219, 859–873. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2415-0>

- Draeger A.L., Thomas E.P., Jones K.A., Davis A.J., Porr C.A.S., 2021. The effects of pelleted cannabidiol supplementation on heart rate and reaction scores in horses. *J. Vet. Behav.* 46, 97–100. <https://doi.org/10.3390/ani13020245>
- Gardner E.L., 2005. Endocannabinoid signaling system and brain reward: emphasis on dopamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 263–284. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.01.032>
- Goodwin D., 2007. Horse behaviour: evolution, domestication and feralisation. W: N. Waran (red.), *The welfare of horses. Animal Welfare*, t. 1. Springer, Dordrecht, 1–18. https://doi.org/10.1007/978-0-306-48215-1_1
- Harewood E.J., McGowan C.M., 2005. Behavioral and physiological responses to stabling in naive horses. *J. Equine Vet. Sci.* 25, 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2005.03.008>
- Hill E., Bryne W.L., 2021. 135 safety and behavioural effects of cannabidiol applied as an oral administration in horses. *J. Equine Vet. Sci.* 100, 103598. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103598>
- Iffland K., Grotenhermen F., 2017. An update on safety and side effects of cannabidiol: a review of clinical data and relevant animal studies. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2, 139–154. <https://doi.org/10.1089/can.2016.0034>
- Jamshidi N., Taylor D.A., 2001. Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br. J. Pharmacol.* 134, 1151–1154. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704379>
- Jean-Gilles L., Braitch M., Latif M.L., Edwards L.J., Robins R.A., Tanasescu R., 2015. Effects of pro-inflammatory cytokines on cannabinoid CB1 and CB2 receptors in immune cells. *Acta Physiol.* 214, 63–74. <https://doi.org/10.1111/apha.12474>
- Jones K., Thomas E., Draeger A., Porr S., 2019. Cannabidiol (CBD) supplementation in horses: a pilot study. *Huston School of Agriculture, Murray State University.*
- Joshi N., Onaivi E.S., 2019. Endocannabinoid system components: overview and tissue distribution. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1162, 1–12. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21737-2_1
- Luedke C., Wilhelm T., 2021. Cannabinoids in equine medicine. W: S. Cital., K. Kramer, L. Hughston, J.S. Gaynor (red.), *Cannabis therapy in veterinary medicine.* Springer, Cham, 265–305. https://doi.org/10.1007/978-3-030-68317-7_12
- Moons C.P.H., Laughlin K., Zanella A.J., 2005. Effects of short-term maternal separations on weaning stress in foals. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 91, 321–335. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.10.007>
- Pagotto U., Marsicano G., Cota D., Lutz B., Pasquali R., 2006. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr. Rev.* 27, 73–100. <https://doi.org/10.1210/er.2005-0009>
- Peeters M., Sulon J., Serteyn D., Vandeheede M., 2010. Assessment of stress level in horses during competition using salivary cortisol: preliminary studies. *J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res.* 5, 216. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2009.10.043>
- Rietmann T.R., Stuart A.E.A., Bernasconi P., Stauffacher M., Auer J.A., Weishaupt M.A., 2004. Assessment of mental stress in warmblood horses: heart rate variability in comparison to heart rate and selected behavioural parameters. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 88, 121–136. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.02.016>
- Russo E.B., Burnett A., Hall B., Parker K.K., 2005. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors. *Neurochem. Res.* 30, 1037–43. <https://doi.org/10.1007/s11064-005-6978-1>
- Schiavon A.P., Bonato J.M., Milani H., Guimarães F.S., Weffort de Oliveira R.M., 2016. Influence of single and repeated cannabidiol administration on emotional behavior and markers of cell proliferation and neurogenesis in non-stressed mice. *Prog. Neuro. Biol. Psychiatry* 4, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.06.017>

- Schmidt A., Möstl E., Wehnert C., Aurich J., Müller J., Aurich C., 2010. Cortisol release and heart rate variability in horses during road transport. *Horm. Behav.* 57, 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.11.003>
- Shirtcliff E.A., Buck R.L., Laughlin M.J., Hart T., Cole C.R., Slowey P.D., 2015. Salivary cortisol results obtainable within minutes of sample collection correspond with traditional immunoassays. *Clin. Ther.* 37(3), 505–514. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.02.014>
- Silver R.J., 2019. The endocannabinoid system of animals. *Animals* 9, 686. <https://doi.org/10.3390/ani9090686>
- Soroko M., Howell K., Zwyrzykowska A., Dudek K., Zielińska P., Kupczyński K., 2016. Maximum eye temperature in the assessment of training in racehorses: correlations with salivary cortisol concentration, rectal temperature, and heart rate. *J. Equine Vet. Sci.* 45, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.06.005>
- Weibel L., 2003. Methodological guidelines for the use of salivary cortisol as biological marker of stress. *Presse Med.* 32, 845–851.
- Zeitler-Feicht M.H., 2014. *Zachowania koni, przyczyny, terapia i profilaktyka. Świadome Jeździectwo*, Warszawa.
- Zieba J., Sinclair D., Sebree T., Bonn-Miller M., Gutterman D., Siegel S., Karl T., 2019. Cannabidiol (CBD) reduces anxiety-related behavior in mice via an FMRP-independent mechanism. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 181, 93–100. [10.1016/j.pbb.2019.05.002](https://doi.org/10.1016/j.pbb.2019.05.002)
- Zuardi A.W., 2006. History of cannabis as a medicine: a review. *Braz. J. Psiquiatria* 28, 153–157. <https://doi.org/10.1590/s1516-44462006000200015>

Źródło finansowania: Badania sfinansowane/dofinansowane w ramach indywidualnego projektu badawczego studenta „Młode umysły – Young Minds Project” ze zwiększenia subwencji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w latach 2020–2026 w wysokości 2% subwencji, o której mowa w art. 387 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, przyznanej w 2019 r.”

Abstract: The aim of the study was to assess the effect of cannabidiol (CBD) on the heart rate, salivary cortisol concentration and approach time of horses subjected to fear tests. The study involved 20 Polish sport horses, divided into a research group and a control group. Research group was given 100 mg of CBD daily for 21 days. Both groups were subjected to two fear tests in three studies: before the start of supplementation, on day 10th and 11th and on day 20th and 21st of supplementation. Heart rate and saliva sampling to determine salivary cortisol levels were performed before and after each fear test for both groups. In addition, the approach time to both objects was measured in both fear tests. The study showed no statistically significant difference in cortisol concentration and heart rate between the research group and the control group. There was statistically significant differences between the groups in approach time in three studies. Results of the study didn't prove the anti-anxiety effect of CBD on the horse's body, but shortening the approach time to the object gives grounds for further research on the anti-anxiety effect of CBD in horses.

Key words: cannabidiol, horses, fear test, supplementation

Otrzymano/Received: 19.06.2023
Zaakceptowano/Accepted: 1.08.2023
Online first: 29.09.2023
Opublikowano/Published: 15.12.2023