

**Kanabidiol moduluje expresiu génov súvisiacich s
Alzheimerovou chorobou v mezenchymálnych
kmeňových bunkách
(Vol'ný preklad)**

Autori:

Rosaliana Libro, Francesca Diomede, Domenico Scionti, Adriano Piattelli, Gianpaolo Grassi,
Federica Pollastro, Placido Bramanti, Emanuela Mazzon, Oriana Trubiani

Publikované:

Online 23.12.2016

Originálny článok dostupný na:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5297661/>

Kanabidiol moduluje expresiu génov súvisiacich s Alzheimerovou chorobou v mezenchymálnych kmeňových bunkách

Abstrakt

Mezenchymálne kmeňové bunky (MSC) sa ukázali ako sľubný nástroj na liečbu niekoľkých neurodegeneratívnych porúch, vrátane Alzheimerovej choroby (AD). Hlavnými neuropatologickými znakmi AD sú senilné plaky zložené z amyloidu beta (A β) a neurofibrilárne kľbká, tvorené hyperfosforylovaným tau. Súčasná terapia AD však ukázala obmedzenú účinnosť. V tejto štúdii sme hodnotili, či predbežná liečba kanabidiolom (CBD), v koncentrácii 5 μ M, moduluje transkripčný profil MSC odvodených z gingívy (GMSC), aby sa zlepšil ich terapeutický potenciál vykonaním transkriptomického analýzy nasledujúcim platforma sekvenovania generácie (NGS). Porovnaním profilov expresie medzi GMSC ošetrovanými CBD (CBD-GMSC) a kontrolnými GMSC (CTR-GMSC), zistili sme, že CBD viedlo k downregulácii génov spojených s AD, vrátane génov kódujúcich kinázy zodpovedné za fosforyláciu tau a sekretázy zapojené do tvorby A β . Súčasne imunocytochemická analýza ukázala, že CBD inhibovalo expresiu GSK3 β , centrálnemu hráča v patogenéze AD, podporou signalizácie PI3K/Akt. Aby sme pochopili, ktorý receptor CBD má tieto účinky, vykonali sme predbežné ošetrenie antagonistami receptorov pre kanabinoidné receptory (SR141716A a AM630) alebo pre vaniloidný receptor 1 (TRPV1). Tu sme dokázali, že TRPV1 bol schopný sprostredkovať modulačný účinok CBD na os PI3K/Akt/GSK3 β . Na záver sme zistili, že predbežné ošetrenie CBD zabránilo expresii proteínov potenciálne zapojených do fosforylácie tau a produkcie A β v GMSC.

Kľúčové slová: mezenchymálne kmeňové bunky, kanabidiol, Alzheimerova choroba, glykogénsyntáza kináza 3 β , amyloid beta, tau

1. Úvod

Nedávno si získali pozornosť mezenchymálne kmeňové bunky (MSC) odvodené z gingívy (GMSC) ako alternatívny zdroj MSC [1 , 2] pre ich vysokú dostupnosť a ľahšiu dostupnosť prostredníctvom minimálne invazívneho stomatologického výkonu [3]. GMSC sú multipotentné bunky, ktoré zdieľajú spoločnú sadu povrchových markerov s inými MSC izolovanými z rôznych tkanív, tj klastre diferenciácie (CD) CD73, CD90, CD105, pričom neexprimujú CD14, CD34, CD45 a ľudský leukocytový antigén. -DR (HLA-DR) [4]. V porovnaní s inými MSC vykazovali GMSC vyšší potenciál diferencovať sa na nervové bunky [5 , 6], pravdepodobne kvôli ich embryonálnemu pôvodu neurálnej lišty [7], čo z nich robí atraktívny nástroj na liečbu neurodegeneratívnych ochorení vrátane Alzheimerovej choroby (AD).

AD je neurodegeneratívne ochorenie charakterizované dvoma dobre známymi patologickými znakmi: senilné plaky v dôsledku extracelulárnej akumulácie proteínu amyloid beta (A β) [8] a neurofibrilárne kľbká (NFT), spôsobené agregáciou hyperfosforylovaného tau [9]. Tieto dva nerozpustné proteínové agregáty vedú k chronickej zápalovej reakcii a rozsiahlemu oxidačnému poškodeniu, čo vedie k progresívnej neuronálnej degenerácii. A β je generovaný postupným štiepením amyloidného prekursorového proteínu (APP), sprostredkovaného komplexom β -sekretázy (BACE-1) a γ -sekretázy [10]. Komplex γ -sekretázy pozostáva z najmenej štyroch členov: presenilínov (PSEN1/2), nikastrínu

(NCSTN), defektného predného hltana 1 (APH-1) a zosilňovača presenilínov 2 (PSENEN). Genetické mutácie v génoch PSEN1, PSEN2 a APP boli úzko spojené s familiárnou formou AD a korelovali so zvýšeným rizikom rozvoja sporadickej formy AD [11]. Tau je proteín stabilizujúci mikrotubuly, ktorý udržiava štruktúru neurónových buniek a axonálny transport. Počas AD je tau aberantne fosforylovaný viacerými kinázami, medzi ktoré patrí glykogénsyntáza kináza-3 β (GSK3 β), cyklín-dependentná proteínkináza-5 (CDK5), kináza s duálnou špecifickosťou tyrozín-fosforyláciou regulovaná kináza 1A (DYRK1A), Najznámejšie sú kalmodulín-dependentná proteínkináza II (CAMKII) a mitogénom aktivované proteínkinázy (MAPK) [12, 13, 14]. K dnešnému dňu neexistujú žiadne účinné terapie na potlačenie tvorby Ap alebo p-tau, preto sú potrebné nové terapeutické nástroje.

Kanabidiol (CBD) je nepsychotropný kanabinoid, ktorý preukázal priaznivé účinky pri AD na modeloch in vitro a in vivo. Konkrétne, podávanie CBD in vitro inhibovalo hyperfosforyláciu tau proteínu GSK3 β sprostredkovanú v A β -stimulovaných PC12 neurónových bunkách [15] a znížilo produkciu A β v neuroblastómových bunkách nadmerne exprimujúcich APP (SHSY5YAPP+) podporou jeho ubikvitinácie [16]. Namiesto toho sa ukázalo, že in vivo liečba CBD zvrátila kognitívne deficity v modeli dvojitej transgénnej myši AD (APP/PS1) [17].

Na predkondicionovanie GMSC in vitro sa nedávno testovalo množstvo zlúčenín, aby sa optimalizoval výsledok regeneračnej liečby in vivo [18]. V tejto štúdii budeme skúmať, či predbežné ošetrenie CBD v GMSC modulovalo transkripciu génov zapojených do tvorby Ap a tau. Cieľom tejto predbežnej štúdie je pochopiť, či CBD môže poskytnúť GMSC molekulárny profil s lepším terapeutickým potenciálom na liečbu in vivo modelov AD v porovnaní s kontrolnými GMSC (CTR-GMSC).

2. Výsledky

2.1. Morfológická a cytofluorimetrická charakterizácia GMSC

GMSC vykazovali tvar podobný fibroblastom, s jadrom s jedným alebo viacerými jadierkami (postava 1A). V súlade s kritériami Medzinárodnej spoločnosti pre bunkovú terapiu na definovanie ľudských MSC [19] sme zistili, že primárne GMSC vykazovali pozitívnu expresiu pre antigény bunkového povrchu CD29, CD44, CD73, CD90 a CD105 (postava 1B), zatiaľ čo povrchové molekuly CD14, CD34 a HLA-DR tieto bunky neexprimovali (údaje nie sú uvedené).

2.2. Liečba CBD v GMSC modulovala transkripciu génov zapojených do patogenézy AD

Aby sme optimalizovali terapeutický potenciál GMSC, skúmali sme, či CBD môže modulovať transkripčný profil GMSC s ohľadom na gény korelujúce s patogenézou AD. Konkrétne analýza génovej expresie ukázala, že niekoľko génov je rozdielne exprimovaných medzi GMSC ošetrenými CBD 5 μ M počas 24 hodín (CBD-GMSC) a neošetrenými GMSC (CTR-GMSC). Konkrétne sme zistili, že liečba CBD znížila expresiu génov kódujúcich kinázy zodpovedné za aberantnú fosforyláciu tau (GSK3 β , CDK5, DYRK1A, CAMK2A, MAPK1, MAPK12 a MAPK14) (Obrázok 2; stôl 1).

Okrem toho sa zistilo, že gény kódujúce sekretázy zapojené do produkcie Ap, ako sú β -(BACE-1) a γ -sekretázy (PSEN1, PSEN2, NCSTN, PSENEN a APH1A), sú v CBD-GMSC znížené. zatiaľ čo gény kódujúce enzým podieľajúci sa na degradácii Ap (ACE1, ECE1 a IDE) boli upregulované (Obrázok 2; Tabuľka 2). Expresia mRNA génov kódujúcich rôzne proteíny tepelného šoku (HSP), ako sú HSP70 (HSPA2, HSPA4, HSPA5 a HSPA8) a HSP90 (HSP90AA1, HSP90AB1 a HSP90B1), ako aj gény kódujúce členov ubikvitínový systém a enzýmy konjugujúce ubikvitín (UBE2D1, UBE2D2, UBE2D3,

UBE2E1 , UBE2E2 , UBE2V2 a UBE3A) sa zvýšili v CBD-GMSC. Okrem toho sme zistili zvýšenú reguláciu génov kódujúcich podjednotky PI3K (PIK3CAa PIK3CB) a pre AKT1 v CBD-GMSC. Naopak, vstôl 1 a Tabuľka 2, okrem AD génov rozdielne regulovaných medzi CTR-GMSC a CBD-GMSC sme tiež uviedli anotácie génovej ontológie (GO), úrovne génovej expresie (Exp_Value), zmenu záhybu (FC) a mieru falošného objavenia (FDR) pre každý uvažovaný gén. Nespracované údaje analýzy génovej expresie sú dostupné v tabuľke S1 .

2.3. CBD inhibovaná aktivita GSK3 β podporovaním signálnej dráhy PI3K/AKT

Imunocytochemické výsledky ukázali negatívne farbenie GSK3 β a p-GSK3 β v CBD-GMSC (Obrázok 3), zatiaľ čo CTR-GMSC vykazovali pozitívnu cytoplazmatickú expresiu pre fosforylovaný (neaktívny) aj nefosforylovaný (aktívny) proteín (Obrázok 3). Expresia GSK3 β a p-GSK3 β je významne inhibovaná v CBD-GMSC v porovnaní s CTR-GMSC (**** p < 0,0001).

Pokiaľ ide o upstream regulátory GSK3p, PI3K a AKT, zistili sme, že CBD-GMSC vykazovali pozitívne jadrové farbenie pre PI3K a pozitívnu cytoplazmatickú expresiu pre p-PI3K, Akt a p-Akt. Naproti tomu CTR-GMSC vykazovali negatívnu expresiu týchto proteínov (Obrázok 4 a Obrázok 5). CBD-GMSC exprimovali p-PI3K, PI3K, p-Akt a Akt významným spôsobom v porovnaní s CTR-GMSC (**** p < 0,0001).

Tu sme zistili, že podávanie antagonistu receptora pre prechodný receptorový potenciál vaniloidu 1 (kapsazepín/TRPV1) dokázalo významným spôsobom antagonizovať účinky sprostredkované CBD na GSK3 β , PI3K a Akt (**** p < 0,0001) v bunkách ošetrovaných kapsazepínom (CAPSZ-GMSC) (Obrázok 3, Obrázok 4 a Obrázok 5). Antagonisty CB1R a CB2R však nedokázali zablockovať zvýšenú aktivitu PI3K/Akt indukovanú CBD v GMSC, ako aj inhibíciu expresie GSK3p sprostredkovanú CBD (údaje nie sú uvedené).

2.4. Predpokladaná proteínová interakčná sieť v CBD-GMSC

Analýza génov odlišne exprimovaných medzi CBD-GMSC a CTR-GMSC sa uskutočnila vložením vybraných génov do online databázy STRING na predikciu dráhy. Týmto spôsobom sme získali domnelú proteínovú asociačnú sieť, ako je uvedené vObrázok 6.

3. Diskusia

Početné štúdie naznačili terapeutický potenciál pre MSC pri AD. Štúdie in vivo skutočne ukázali, že MSC môžu potenciálne regenerovať poškodené neurónové tkanivo produkciou trofických faktorov, ktoré podporujú prežitie a regeneráciu hostiteľských neurónov, alebo alternatívne môžu spomaliť progresiu ochorenia zoslabením apoptózy, zápalu a produkcie voľných radikálov [2]. Konkrétne, Lee a kol. [20] zistili, že infúzia MSC odvodená z kostnej drene v dvojitej transgénnej myši APP/PS1 znížila ukladanie Ap a zhoršenie pamäti zoslabením aktivácie mikroglíí. Podobne MSC odvodené z ľudskej pupočníkovej krvi, transplantované do hipokampu transgénneho myšieho modelu AD, viedli k významnému zlepšeniu kognitívnych funkcií znížením depozície A β a hyperfosforylácie tau v mozgu [21]. Hoci sa ukázalo, že transplantácia MSC v experimentálnych modeloch AD má niekoľko priaznivých účinkov, účinnosť tohto prístupu v klinickej praxi sa stále hodnotí prostredníctvom prebiehajúcich klinických štúdií.

V poslednej dobe si MSC odvodené z gingívy (GMSC) získali veľkú pozornosť ako alternatívny zdroj MSC z dôvodu ich vysokej dostupnosti a ľahkej dostupnosti [5]. Rôzne štúdie sa však zamerali na zlepšenie neuroprotektívneho potenciálu GMSC predkondicionovaním týchto buniek rôznymi zlúčeninami pred ich klinickou aplikáciou, aby sa zlepšil ich regeneračný výsledok in vivo [18]. V tejto štúdii sme hodnotili, či predbežné ošetrenie CBD v GMSC modulovalo transkripciu génov zapojených do generovania Ap a tau, aby sme pochopili, či CBD môže poskytnúť GMSC molekulárny profil s lepším terapeutickým potenciálom na liečbu AD in vivo. modely v porovnaní s CTR-GMSC. Potenciál CBD ovplyvniť transkripčný profil in vitro už opísali Juknat et al. [22]. Avšak základné mechanizmy zapojené do modulačnej aktivity CBD ešte neboli objasnené.

Naše výsledky ukázali, že predbežné ošetrenie CBD v GMSC modulovalo transkripciu panelu génov korelujúcich s etiológiou AD. CBD viedlo najmä k zníženiu regulácie génov kódujúcich hlavné kinázy zapojené do fosforylácie tau proteínu, ako sú GSK3 β [23], CDK5 [24], DYRK1A [25], CAMK2A [26] a MAPK [27] (MAPK1 , MAPK12 a MAPK14), čo naznačuje, že CBD môže zabrániť hyperfosforylácii tau a následnej tvorbe NFT znížením hladín transkripcie týchto kináz.

V súčasnej práci sme tiež zistili, že predbežné ošetrenie CBD v GMSC modulovalo transkripciu génov zapojených do spracovania Ap. α -sekretázy podporujú neamylogénny proces, ktorý riadi normálne štiepenie proteínu APP. Namiesto toho je za tvorbu Ap pri AD zodpovedné štiepenie APP sprostredkované β - a γ -sekretázami [8 , 9]. Tu sme zistili, že CBD zvýšilo reguláciu expresie α -sekretázy (ADAM9) a paralelne znížilo β - (BACE-1) a γ -sekretázy (PSEN1 , PSEN2 , NCSTN , PSENEN a APH1A). Okrem toho zvýšená regulácia génu kódujúceho negatívny regulátor komplexu γ -sekretázy, TEMED10 , v CBD-GMSC korelovala so zníženou aktivitou γ -sekretázy. Zistili sme tiež zvýšenú reguláciu génov kódujúcich enzýmy degradujúce Ap, ako sú ECE-1 , IDE a ACE . Tieto údaje môžu naznačovať, že CBD zabránila produkcii Ap zoslabením expresie enzýmov zapojených do amyloidogénneho procesu a podporou tých, ktoré sa podieľajú na neamyloidogénnom procese.

V reakcii na expozíciu Ap peptidom je upstream aktivátor CDK5 kinázy, CDK5R1/p35, štiepený CAPN2 v izoforme p25 [28] a jeho zvýšená expresia koreluje s nadmernou aktiváciou CDK5 a zvýšenou fosforyláciou tau [29]. Tu sme našli downreguláciu osi CAPN2 / CDK5R1 na transkripčných úrovniach, čo je v súlade so zníženou expresiou CDK5 pozorovanou v CBD-GMSC.

Ďalší mechanizmus, ktorý sa potenciálne podieľa na regulácii hladín tau a A β , by mohli predstavovať HSP, čo sú molekulárne chaperóny zapojené do udržiavania homeostázy proteínov, vrátane skladania, degradácie a subcelulárneho prenosu [30]. HSP nielenže rozpoznávajú chybné poskladané proteíny, ale sú tiež schopné podporovať ich degradáciu prostredníctvom ubikvitínového proteazómového systému [31 , 32]; v dôsledku toho môže upregulácia týchto proteínov zabrániť nesprávnemu poskladaniu a akumulácii tau a Ap [33 , 34]. Naše výsledky uvádzajú zvýšenú expresiu rôznych génov HSP v CBD-GMSC, konkrétne HSP70 (HSPA2 , HSPA4 , HSPA5a HSPA8) a HSP90 (HSP90AA1 , HSP90AB1 a HSP90B1), ako aj zvýšenú expresiu génov kódujúcich členov ubikvitínového systému a enzýmy konjugujúce ubikvitín (UBE2D1 , UBE2D2 , UBE212 , UBE21 , UBE2V2 a UBE3A), čo naznačuje zvýšenú aktivitu ubikvitínových systémov zodpovedných za degradáciu aberantných proteínov. Naše údaje celkovo naznačujú, že liečba CBD v GMSC negatívne reguluje procesné enzýmy

zodpovedné za tvorbu Ap a p-tau a zosilňuje chaperónové a proteazómové stroje, ktoré podporujú ich odstraňovanie.

Okrem toho sme zistili zvýšenú reguláciu génov kódujúcich podjednotky PI3K (PIK3CA a PIK3CB) a AKT1 v CBD-GMSC. Je zaujímavé, že je známe, že signalizácia PI3K/Akt sa podieľa na regulácii aktivity GSK3 β , o ktorej je známe, že fosforyláciou tau a podporou produkcie A β hrá rozhodujúcu úlohu v patogenéze AD [35]. Imunocytochemické hodnotenie PI3K/Akt/GSK3p potvrdilo výsledky získané prostredníctvom analýzy NGS. Tieto dosiahnuté údaje sú potvrdené ďalšími autormi, ktorí zdôraznili schopnosť kanabinoidov modulovať os PI3K/Akt/GSK3 β [36 , 37].

Aby sme pochopili, cez ktorý receptor CBD moduloval signálnu kaskádu PI3K/Akt, ošetrili sme GMSC špecifickými antagonistami pre receptory CB1R, CB2R alebo TRPV1. Predovšetkým sme zistili, že iba antagonist TRPV1 bol schopný zrušiť účinky sprostredkované CBD, čo naznačuje priame zapojenie TRPV1 v tomto kontexte.

TRPV1 je vápnik-permeabilný kanál, ktorého aktivácia vedie k zvýšeniu intracelulárneho vápnika [38]. Intracelulárna koncentrácia vápnika môže ovplyvniť rôzne biologické dráhy, vrátane neuronálnej diferenciácie MSC [39], reguláciou aktivity rôznych kľúčových enzýmov.

Uvádza sa, že CBD pôsobiace ako agonista TRP1 môže aktivovať receptor TRPV1 in vitro, čo vedie k jeho desenzibilizácii a zvýšeniu vnútrobunkových hladín vápnika [40]. Následné molekulárne mechanizmy aktivované CBD však ešte neboli objasnené.

Zaujímavé je, že Hassan a spol. [41] ukázali, že CBD bolo schopné zabrániť ukladaniu A β in vitro prostredníctvom aktivácie TRPV1 kanála a vďaka svojej funkčnej interakcii s PI3K. Avšak Stein a spol. [42] preukázali fyzickú asociáciu medzi N-terminálnou oblasťou TRPV1 a podjednotkou p85 β PI3K.

V súlade s týmto dôkazom sa domnievame, že aktivácia TRPV1 pomocou CBD v GMSC môže spustiť signalizáciu PI3K / Akt, ktorá zase inaktivuje GSK3p prostredníctvom fosforylácie na seríne-9, čím sa tlmí fosforylácia tau a produkcia Ap.

4. Materiály a metódy

4.1. Extrakcia a izolácia CBD

CBD bolo purifikované z talianskej odrody Cannabis sativa L. pestovanej v skleníku Rady pre výskum a experimentovanie v poľnohospodársko-výskumnom centre pre priemyselné plodiny (CREA-CIN) v Rovigo, Taliansko. Čistenie CBD sa uskutočnilo v súlade s talianskou právnou autorizáciou SP/106 z 23.05.2013 ministerstva zdravotníctva a umožnilo nám získať CBD čisté na 99 % [43].

4.2. Izolácia a charakterizácia bunkovej kultúry

Zbierka GMSC bola schválená Etickou komisiou pre lekársku fakultu, „G. Univerzita d'Annunzio, Chieti, Taliansko (č. 266/17.04.14). Gingiválne biopsie boli odobraté od piatich mužských dobrovoľníkov bez orálnych a systémových ochorení. Vzorky tkaniva boli narezané na malé kúsky, premyté pomocou PBS (LiStarFish, Miláno, Taliansko) a potom kultivované v médiu bez séra TheraPEAK™ MSCGM-CD™ (Lonza, Basel, Švajčiarsko). GMSC migrovali z gingiválnych fragmentov po dosiahnutí približne 80 % konfluencie; bunky boli oddelené pomocou Triple Select (LiStarFish) [44]. Cytofluorimetrické vyhodnotenie GMSC sa uskutočnilo tak, ako už bolo opísané v Diomedea et al. [45]. Protilátky používané na farbenie buniek sú uvedené v Tabuľka 3. Na analýzu získaných výsledkov sa použil softvér FlowJo™ (TreeStar, Ashland, OR, USA). Priemerný pomer intenzity fluorescencie (MFI Ratio) sa vypočítal vylúčením MFI pozitívnych udalostí MFI negatívnych udalostí.

4.3. Analýza rastovacím elektrónovým mikroskopom

GMSC kultivované na sklenených plátkoch boli fixované počas 1 hodiny pri 4 °C v 2,5 % glutaraldehyde v 0,1 M kakovodlátovom pufrí (pH 7,4); následne sa bunky dehydratovali použitím rôznych koncentrácií etanolu, kým sa nedosiahol kritický bod sušenia. Vzorky boli potiahnuté zlatom pomocou nanášacieho zariadenia Emitech K550 (Emitech Ltd., Ashford, UK) a pozorované pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie (EVO 50; Zeiss, Jena, Nemecko).

4.4. Bunkové kultúry a liečba liekmi

GMSC boli pestované v médiu DMEM s vysokým obsahom glukózy (CARLO ERBA, Miláno, Taliansko) doplnenom 10 % fetálnym bovinným sérom (FBS) (Sigma-Aldrich Co., Ltd., St. Louis, MO, USA). Bunky sa udržiavali pri 37 °C vo zvlhčenej atmosfére 5 % CO₂ a 95 % vzduchu. Boli kultivované, kým nedosiahli približne 70% až 80% konfluencie, a potom boli rozdelené do dvoch experimentálnych skupín. Jedna experimentálna skupina sa získala predbežným ošetrením GMSC s CBD (5 µM) počas 24 hodín (CBD-GMSC). Ďalšiu experimentálnu skupinu predstavovali neošetrené bunky/kontrolné bunky (CTR-GMSC). Cytotoxicita a účinnosť 5 µM dávky CBD boli testované v našej predchádzajúcej štúdii [46].

Aby sa vyhodnotilo, ktorý receptor sa podieľal na účinkoch sprostredkovaných CBD, CTR-GMSC aj CBD-GMSC boli predinkubované počas 2 hodín so selektívnymi antagonistami receptora pre kanabinoidný receptor 1 (CB1R/SR141716A), pre kanabinoidný receptor 2 (CB2R/ AM630), alebo pre prechodný receptorový potenciál vaniloid 1 (TRPV1/kapsazepín). Všetky koncentrácie antagonistu receptora (Tocris Bioscience, Bristol, UK) boli zvolené v súlade s predchádzajúcimi štúdiami: konkrétne SR141716A [47 , 48] a Capsazepin boli použité v koncentrácii 1 µM [49 , 50], zatiaľ čo AM630 bol v 100 nM [51 , 52].

Uvádza sa, že GMSC sú stabilné bunkové kultúry, ktoré si v dlhodobej kultúre zachovávajú normálny karyotyp a telomerázovú aktivitu [6]. V tejto štúdii, aby sa získalo čo najväčšie množstvo buniek, sa GMSC od rôznych darcov kultivovali až do pasáže 10 a potom sa použili na experimenty.

Pretože sme predtým pozorovali, že CTR-GMSC a CBD-GMSC odvodené od rôznych darcov vykazovali prekryvajúce sa výsledky (údaje nie sú uvedené), tu sme vykonali všetky experimenty s GMSC odvodenými od piatich darcov, ktoré sa uchovávali oddelene.

4.5. Príprava RNA knižníc na hlboké sekvenovanie

Vzorky RNA boli extrahované z CTR-GMSC a CBD-GMSC pomocou súpravy RNA Cell Miniprep System (Promega, Miláno, Taliansko). Na získanie RNA knižníc sme použili súpravu knižnice TruSeq RNA Access (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA).

Stručne povedané, podľa protokolu výrobcu sa 50 ng RNA z každej vzorky fragmentovalo pri 94 ° C počas 8 minút. Vo fáze prvého vlákna sa cDNA syntetizovala prostredníctvom náhodných hexamérov a reverznej transkriptázy SuperScript II (Invitrogen, Miláno, Taliansko) (inkubácia pri 25 ° C počas 10 minút, pri 42 ° C počas 15 minút a pri 70 ° C počas 15 minút). V druhom vlákne syntézy cDNA sa odstránili templáty RNA a vytvorilo sa druhé náhradné vlákno internalizáciou dUTP, aby sa vytvorili dvojvláknové cDNA. Čistenie reakčnej zmesi druhého vlákna sa uskutočnilo pomocou guľôčok AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). 3' konce cDNA sa potom adenulovali, aby sa umožnila ligácia adaptéra v nasledujúcom kroku. Guľôčky AMPure XP sa tiež použili na čistenie knižníc po ligácii indexovacích adaptérov.

Po validácii knižnice sa uskutočnil prvý hybridizačný krok s použitím exómových zachytávacích sond. Predchádzajúca hybridizácia 2-plex súboru knižníc sa získala spojením 200 ng z každej DNA knižnice. Hybridizácia sa uskutočnila podľa štandardizovaného protokolu (18 cyklov, počínajúc pri 94 ° C a potom znížením o 2 ° C pre každý cyklus). Aby sme odstránili nešpecifickú väzbu, použili sme magnetické guľôčky potiahnuté streptavidínom na zachytenie sond hybridizovaných v cieľových oblastiach. Uskutočnilo sa ďalšie zachytávacie kolo s guľôčkami potiahnutými streptavidínom, po ktorom nasledovali dve zahrievané premytia, aby sa uvoľnila nešpecifická väzba z guľôčok.

Obohatené knižnice sa potom eluovali z guľôčok a boli pripravené na druhý cyklus hybridizácie. Tento hybridizačný krok bol nevyhnutný na získanie širokej špecifickej oblasti zachytenia. Potom boli knižnice purifikované cez guľôčku AMPure XP a amplifikované podľa protokolu (10 cyklov; inkubácia pri 98 ° C počas 10 s, inkubácia pri 60 ° C počas 30 s a inkubácia pri 72 ° C počas 30 s), nasledovaný krokom čistenia.

Kvantifikácia knižnice sa uskutočnila prostredníctvom PCR v reálnom čase s použitím súpravy KAPA Library Quantification Kit-Illumina/ABI Prism® (Kapa Biosystems, Inc., Wilmington, MA, USA). Validácia knižnice sa uskutočnila pomocou bioanalyzátoru so súpravou Agilent High Sensitivity DNA Kit (Richardson, TX, USA). Knižnice sa potom zriedili na koncentráciu 12 pM. Sekvenovanie s jedným čítaním na prístroji MiSeq (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) bolo nastavené na 150 cyklov. Nové knižnice boli načítané na klastrovanie na MiSeq Flow Cell v3 a potom sekvenované.

4.6. Spracovanie údajov NGS

Údaje z NGS je potrebné spracovať. Po prvé, čítanie sekvencií sa podrobuje procesu „demultiplexovania“, aby sa získalo oddelenie čítania sekvencií v rôznych súboroch pre každý indexový tag/vzorku. Na „demultiplexovanie“ čítaní sekvencií sme použili algoritmus CASAVA (verzia

1.8.2, Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). Potom sme vykonali zarovnanie sekvencií pomocou RNA-Seq Alignment verzie 1.0.0 (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) a referenčnej sekvencie „Homo sapiens UCSC hg19“. Na mapovanie Read sme použili TopHat 2 (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). Hodnoty fragmentov na kilobázu exónu na milión mapovaných fragmentov (FPKM) sa vypočítali pre každú vzorku pomocou normalizovaných počtov čítaní pre každý anotovaný gén ($(1000 \times \text{počet prečítaní}) / (\text{počet génom pokrytých báz} \times \text{počet mapovaných fragmentov v miliónoch})$). Nemapované čítania boli odstránené, pričom sa zachovali iba čítané páry zarovnané s referenčnou sekvenciou. Bodový graf LOG2 FPKM sa použil na porovnanie dvoch rôznych vzoriek.

4.7. Bioinformatická analýza

Génová ontológia (GO) a analýza dráhy génov rozdielne exprimovaných medzi CTR-GMSC a CBD-GMSC sa uskutočnili pomocou bezplatných nástrojov „STRING“ a „KEGG“ (dostupné online na <http://string-db.org> a <http://www.genome.jp/kegg>). V tejto štúdii sme považovali len kategórie GO alebo KEGG dráhy za štatisticky významné ($q < 0,05$).

4.8. Imunocytochémia

CTR-GMSC a CBD-GMSC boli nanosené na krycie sklíčka s priemerom 10 mm (Thermo Scientific, Oberhausen, Nemecko), kým nedosiahli sútok približne 80 % – 90 %. Potom sa bunky fixovali 4% paraformaldehydom počas približne 20 minút, po čom nasledovali dve premytia fyziologickým roztokom pufrovaným fosfátom (PBS, pH 7,5). Aby sa zablokovala aktivita endogénnej peroxidázy, bunky boli vystavené 3% peroxidu vodíka (H_2O_2) pri izbovej teplote počas 15 minút. Po troch premytiach PBS boli nešpecifické väzbové miesta blokované bunkovou inkubáciou s konským sérom + 0,1 % Triton X-100 počas 20 minút. Po blokovaní sa bunky inkubovali cez noc pri 4 °C s primárnymi protilátkami proti: fosfo-fosfatidylinozitol 3-kináze (p-PI3K, 1:100, Cell Signalling, Danvers, MA, USA), fosfatidylinozitol 3-kináze (PI3K, 1: 100, Bunková signalizácia), fosfo-AKT serín/treonínkináza (p-AKT, 1:100, Bunková signalizácia), AKT serín/treonínkináza (AKT, 1:100, Bunková signalizácia, fosforyl-glykogénsyntáza kináza 3 β (p- GSK3 β , 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) a glykogénsyntáza kináza 3 α (GSK3 α , 1:100, Santa Cruz Biotechnology).

Nasledujúci deň boli bunky inkubované so sekundárnou biotinylovanou protilátkou (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) a streptavidínom ABCComplex-HRP (ABC-súprava od Dako, Glostrup, Dánsko). Imunofarbenie sa uskutočnilo pomocou súpravy peroxidázového substrátu DAB (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) (hnedá farba; pozitívne farbenie), zatiaľ čo kontrastné farbenie sa získalo jadrovou rýchlou červenou (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) (ružové pozadie negatívne farbenie). Imunocytochemické testy sa opakovali trikrát a experimentálne skupiny (CTR-GMSC a CBD-GMSC) sa umiestnili v duplikáte (s celkom šiestimi kryciami sklíčkami pre každú testovanú protilátku).

Aby sa vypočítalo percento zafarbených pozitívnych buniek, snímky sa zachytili pomocou svetelnej mikroskopie (LEICA DM 2000 kombinovaná s kamerou LEICA ICC50 HD) s objektívom 40 \times . Densitometrická analýza sa uskutočnila s použitím softvéru LEICA Application Suite V4.2.0 (Leica

Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA) na 3/6 celkových krycích sklíčok, pokrývajúc asi 90 % celkovej plochy každej jamky.

4.9. Štatistická analýza

Aby sme určili podiel génov rozdielne exprimovaných medzi CTR-GMSC a CBD-GMSC, ktoré boli štatisticky relevantné, použili sme zostavu manžetových gombíkov (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) a balík DE 2.0 (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). Štatistické vyhodnotenie imunocytochémie sa uskutočnilo pomocou softvéru GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Štatistická relevantnosť medzi CTR-GMSC a CBD-GMSC, ako aj medzi CBD-GMSC a CAPSZ-GMSC, bola hodnotená použitím jednosmerného štatistického testu ANOVA a post hoc Bonferroniho testu. Len p -hodnoty $< 0,05$ sa považovali za štatisticky významné.

5. Záver

Predbežné ošetrenie CBD v GMSC modulovalo transkripčný profil týchto buniek zoslabením expisie génov zapojených do etiopatogenézy AD. Na záver, táto predbežná štúdia in vitro preukázala, že GMSC predkondicionované pomocou CBD majú lepší terapeutický potenciál v porovnaní s bunkami CTR-GMSC a veríme, že ich transplantácia v ranom štádiu AD môže hrať úlohu pri prevencii alebo zmiernení nástupu ochorenia. Na posúdenie týchto zistení sú však potrebné ďalšie výskumy in vivo.

Referencie

1. Du L., Yang P., Ge S. Isolation and characterization of human gingiva-derived mesenchymal stem cells using limiting dilution method. *J. Dent. Sci.* 2016;11:304–314. doi: 10.1016/j.jds.2016.03.010. [CrossRef] [Google Scholar]
2. Gao Y., Zhao G., Li D., Chen X., Pang J., Ke J. Isolation and multiple differentiation potential assessment of human gingival mesenchymal stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2014;15:20982–20996. doi: 10.3390/ijms151120982. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
3. Mitrano T.I., Grob M.S., Carrion F., Nova-Lamperti E., Luz P.A., Fierro F.S., Quintero A., Chaparro A., Sanz A. Culture and characterization of mesenchymal stem cells from human gingival tissue. *J. Periodontol.* 2010;81:917–925. doi: 10.1902/jop.2010.090566. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
4. Hass R., Kasper C., Bohm S., Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun. Signal.* 2011;9:12. doi: 10.1186/1478-811X-9-12. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
5. Santamaria S., Sanchez N., Sanz M., Garcia-Sanz J.A. Comparison of periodontal ligament and gingiva-derived mesenchymal stem cells for regenerative therapies. *Clin. Oral Investig.* 2016 doi: 10.1007/s00784-016-1867-3. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
6. Tomar G.B., Srivastava R.K., Gupta N., Barhanpurkar A.P., Pote S.T., Jhaveri H.M., Mishra G.C., Wani M.R. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010;393:377–383. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.01.126. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
7. Xu X., Chen C., Akiyama K., Chai Y., Le A.D., Wang Z., Shi S. Gingivae contain neural-crest- and mesoderm-derived mesenchymal stem cells. *J. Dent. Res.* 2013;92:825–832. doi: 10.1177/0022034513497961. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

8. Gouras G.K., Almeida C.G., Takahashi R.H. Intraneuronal A β accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. 2005;26:1235–1244. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.05.022. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
9. Selkoe D.J. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid β -protein. *J. Alzheimers Dis*. 2001;3:75–80. [PubMed] [Google Scholar]
10. Chow V.W., Mattson M.P., Wong P.C., Gleichmann M. An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromol. Med*. 2010;12:1–12. doi: 10.1007/s12017-009-8104-z. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
11. Cruchaga C., Haller G., Chakraverty S., Mayo K., Vallania F.L.M., Mitra R.D., Faber K., Williamson J., Bird T., Diaz-Arrastia R., et al. NIA-LOAD/NCRAD family study consortium rare variants in APP, PSEN1 and PSEN2 increase risk for AD in late-onset Alzheimer's disease families. *PLoS ONE*. 2012;7:e31039. doi: 10.1371/annotation/c92e16da-7733-421d-b063-1db19488daa6. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
12. Dolan P.J., Johnson G.V.W. The role of tau kinases in Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev*. 2010;13:595–603. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
13. Ferrer I., Barrachina M., Puig B., Martinez de Lagran M., Marti E., Avila J., Dierssen M. Constitutive Dyrk1A is abnormally expressed in Alzheimer disease, Down syndrome, Pick disease, and related transgenic models. *Neurobiol. Dis*. 2005;20:392–400. doi: 10.1016/j.nbd.2005.03.020. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
14. Yoshimura Y., Ichinose T., Yamauchi T. Phosphorylation of tau protein to sites found in Alzheimer's disease brain is catalyzed by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II as demonstrated tandem mass spectrometry. *Neurosci. Lett*. 2003;353:185–188. doi: 10.1016/j.neulet.2003.09.037. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
15. Esposito G., de Filippis D., Carnuccio R., Izzo A.A., Iuvone T. The marijuana component cannabidiol inhibits β -amyloid-induced tau protein hyperphosphorylation through Wnt/ β -catenin pathway rescue in PC12 cells. *J. Mol. Med. (Berl)*. 2006;84:253–258. doi: 10.1007/s00109-005-0025-1. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
16. Scuderi C., Steardo L., Esposito G. Cannabidiol promotes amyloid precursor protein ubiquitination and reduction of β amyloid expression in SHSY5YAPP⁺ cells through PPAR γ involvement. *Phytother. Res*. 2014;28:1007–1013. doi: 10.1002/ptr.5095. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
17. Cheng D., Low J.K., Logge W., Garner B., Karl T. Chronic cannabidiol treatment improves social and object recognition in double transgenic APP^{swe}/PS1 Δ E9 mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2014;231:3009–3017. doi: 10.1007/s00213-014-3478-5. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
18. Fawzy El-Sayed K.M., Dorfer C.E. Gingival Mesenchymal Stem/Progenitor Cells: A Unique Tissue Engineering Gem. *Stem Cells Int*. 2016;2016:7154327. doi: 10.1155/2016/7154327. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
19. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315–317. doi: 10.1080/14653240600855905. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

20. Lee J.K., Schuchman E.H., Jin H.K., Bae J. Soluble CCL5 derived from bone marrow-derived mesenchymal stem cells and activated by amyloid β ameliorates Alzheimer's disease in mice by recruiting bone marrow-induced microglia immune responses. *Stem Cells*. 2012;30:1544–1555. doi: 10.1002/stem.1125. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
21. Lee H.J., Lee J.K., Lee H., Carter J.E., Chang J.W., Oh W., Yang Y.S., Suh J.-G., Lee B.-H., Jin H.K., et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells improve neuropathology and cognitive impairment in an Alzheimer's disease mouse model through modulation of neuroinflammation. *Neurobiol. Aging*. 2012;33:588–602. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.03.024. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
22. Juknat A., Rimmerman N., Levy R., Vogel Z., Kozela E. Cannabidiol affects the expression of genes involved in zinc homeostasis in BV-2 microglial cells. *Neurochem. Int.* 2012;61:923–930. doi: 10.1016/j.neuint.2011.12.002. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
23. Hooper C., Killick R., Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 2008;104:1433–1439. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05194.x. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
24. Noble W., Olm V., Takata K., Casey E., Mary O., Meyerson J., Gaynor K., LaFrancois J., Wang L., Kondo T., et al. CDK5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron*. 2003;38:555–565. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00259-9. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
25. Ryoo S.-R., Jeong H.K., Radnaabazar C., Yoo J.-J., Cho H.-J., Lee H.-W., Kim I.-S., Cheon Y.-H., Ahn Y.S., Chung S.-H., et al. DYRK1A-mediated hyperphosphorylation of Tau. A functional link between Down syndrome and Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 2007;282:34850–34857. doi: 10.1074/jbc.M707358200. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
26. Yamamoto H., Hiragami Y., Murayama M., Ishizuka K., Kawahara M., Takashima A. Phosphorylation of tau at serine 416 by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in neuronal soma in brain. *J. Neurochem.* 2005;94:1438–1447. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03307.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
27. Goedert M., Hasegawa M., Jakes R., Lawler S., Cuenda A., Cohen P. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett.* 1997;409:57–62. doi: 10.1016/S0014-5793(97)00483-3. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
28. Tsai L.-H., Patrick G.N., Zukerberg L., Nikolic M., de la Monte S., Dikkes P. Conversion of p35 to p25 deregulates CDK5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature*. 1999;402:615–622. doi: 10.1038/45159. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
29. Chen J., Li H., Feng Y., Wang J. The effect of CDK-5 overexpression and overactivation on tau hyperphosphorylation in cultured N2a cells. *Wuhan Univ. J. Nat. Sci.* 2005;10:472–476. [Google Scholar]
30. Bukau B., Weissman J., Horwich A. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*. 2006;125:443–451. doi: 10.1016/j.cell.2006.04.014. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
31. Hong L., Huang H.-C., Jiang Z.-F. Relationship between amyloid- β and the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *Neurol. Res.* 2014;36:276–282. doi: 10.1179/1743132813Y.0000000288. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

32. Gadhve K., Bolshette N., Ahire A., Pardeshi R., Thakur K., Trandafir C., Istrate A., Ahmed S., Lahkar M., Muresanu D.F., et al. The ubiquitin proteasomal system: A potential target for the management of Alzheimer's disease. *J. Cell. Mol. Med.* 2016;20:1392–1407. doi: 10.1111/jcmm.12817. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
33. Patterson K.R., Ward S.M., Combs B., Voss K., Kanaan N.M., Morfini G., Brady S.T., Gamblin T.C., Binder L.I. Heat shock protein 70 prevents both tau aggregation and the inhibitory effects of preexisting tau aggregates on fast axonal transport. *Biochemistry.* 2011;50:10300–10310. doi: 10.1021/bi2009147. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
34. Ou J.-R., Tan M.-S., Xie A.-M., Yu J.-T., Tan L. Heat shock protein 90 in Alzheimer's Disease. *BioMed Res. Int.* 2014;2014:1–7. doi: 10.1155/2014/796869. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
35. Hernandez F., Gomez de Barreda E., Fuster-Matanzo A., Lucas J.J., Avila J. GSK3: A possible link between β amyloid peptide and tau protein. *Exp. Neurol.* 2010;223:322–325. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.09.011. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
36. Trazzi S., Steger M., Mitrugno V.M., Bartesaghi R., Ciani E. CB1 cannabinoid receptors increase neuronal precursor proliferation through AKT/glycogen synthase kinase-3 β / β -catenin signaling. *J. Biol. Chem.* 2010;285:10098–10109. doi: 10.1074/jbc.M109.043711. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
37. Ozaita A., Puighermanal E., Maldonado R. Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *J. Neurochem.* 2007;102:1105–1114. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04642.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
38. Iannotti F.A., Hill C.L., Leo A., Alhusaini A., Soubrane C., Mazzarella E., Russo E., Whalley B.J., di Marzo V., Stephens G.J. Nonpsychotropic plant cannabinoids, cannabidivarin (CBDV) and cannabidiol (CBD), activate and desensitize transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in vitro: Potential for the treatment of neuronal hyperexcitability. *ACS Chem. Neurosci.* 2014;5:1131–1141. doi: 10.1021/cn5000524. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
39. Trubiani O., Guarnieri S., Diomede F., Mariggio M.A., Merciaro I., Morabito C., Cavalcanti M.F.X.B., Cocco L., Ramazzotti G. Nuclear translocation of PKC α isoenzyme is involved in neurogenic commitment of human neural crest-derived periodontal ligament stem cells. *Cell Signal.* 2016;28:1631–1641. doi: 10.1016/j.cellsig.2016.07.012. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
40. Bisogno T., Hanus L., de Petrocellis L., Tchilibon S., Ponde D.E., Brandi I., Moriello A.S., Davis J.B., Mechoulam R., di Marzo V. 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;134:845–852. doi: 10.1038/sj.bjp.0704327. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
41. Hassan S., Eldeeb K., Millns P.J., Bennett A.J., Alexander S.P.H., Kendall D.A. Cannabidiol enhances microglial phagocytosis via transient receptor potential (TRP) channel activation. *Br. J. Pharmacol.* 2014;171:2426–2439. doi: 10.1111/bph.12615. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
42. Stein A.T., Ufret-Vincenty C.A., Hua L., Santana L.F., Gordon S.E. Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *J. Gen. Physiol.*

2006;128:509–522. doi: 10.1085/jgp.200609576. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

43. Tagliatalata-Scafati O., Pagani A., Scala F., De Petrocellis L., Di Marzo V., Grassi G., Appendino G. Cannabimovone, a cannabinoid with a rearranged terpenoid skeleton from hemp. *Eur. J. Org. Chem.* 2010;2010:2067–2072. doi: 10.1002/ejoc.200901464. [CrossRef] [Google Scholar]

44. Diomede F., Caputi S., Merciaro I., Frisone S., D’Arcangelo C., Piattelli A., Trubiani O. Pro-inflammatory cytokine release and cell growth inhibition in primary human oral cells after exposure to endodontic sealer. *Int. Endod. J.* 2014;47:864–872. doi: 10.1111/iej.12230. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

45. Diomede F., Zini N., Gatta V., Fulle S., Merciaro I., D’Aurora M., La Rovere R.M., Traini T., Pizzicannella J., Ballerini P., et al. Human periodontal ligament stem cells cultured onto cortico-cancellous scaffold drive bone regenerative process. *Eur. Cell Mater.* 2016;32:181–201. doi: 10.22203/eCM.v032a12. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

46. Rajan T.S., Giacoppo S., Scionti D., Diomede F., Grassi G., Pollastro F., Piattelli A., Bramanti P., Mazzon E., Trubiani O. Cannabidiol activates neuronal precursor genes in human gingival mesenchymal stromal cells. *J. Cell. Biochem.* 2016 doi: 10.1002/jcb.25815. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

47. Kim S.H., Won S.J., Mao X.O., Jin K., Greenberg D.A. Involvement of protein kinase A in Cannabinoid receptor-mediated protection from oxidative neuronal injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005;313:88–94. doi: 10.1124/jpet.104.079509. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

48. Whalley B.J., Wilkinson J.D., Williamson E.M., Constanti A. A novel component of cannabis extract potentiates excitatory synaptic transmission in rat olfactory cortex in vitro. *Neurosci. Lett.* 2004;365:58–63. doi: 10.1016/j.neulet.2004.04.044. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

49. Ambrosino P., Soldovieri M.V., Russo C., Tagliatalata M. Activation and desensitization of TRPV1 channels in sensory neurons by the PPAR α agonist palmitoylethanolamide. *Br. J. Pharmacol.* 2013;168:1430–1444. doi: 10.1111/bph.12029. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

50. Kwak J. Capsaicin blocks the hyperpolarization-activated inward currents via TRPV1 in the rat dorsal root ganglion neurons. *Exp. Neurobiol.* 2012;21:75–82. doi: 10.5607/en.2012.21.2.75. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

51. Geng D.C., Xu Y.Z., Yang H.L., Zhu X.S., Zhu G.M., Wang X.B. Inhibition of titanium particle-induced inflammatory osteolysis through inactivation of cannabinoid receptor 2 by AM630. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 2010;95A:321–326. doi: 10.1002/jbm.a.32836. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

52. Li Q., Cui N., Du Y., Ma H., Zhang Y. Anandamide reduces intracellular Ca²⁺ concentration through suppression of Na⁺/Ca²⁺ exchanger current in rat cardiac myocytes. *PLoS ONE.* 2013;8:e63386. doi: 10.1371/journal.pone.0063386. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]