

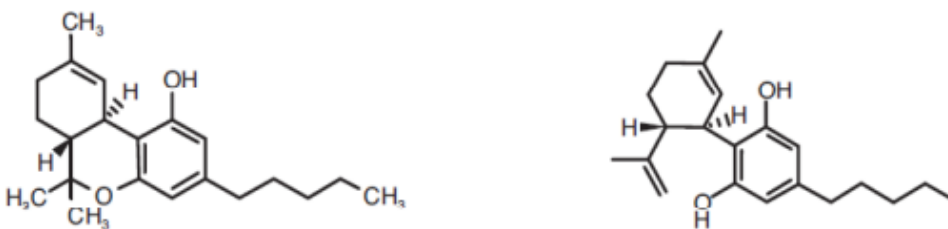
CBD e TERPENI

La Cannabis è conosciuta come pianta medicinale da svariati millenni, ma il mistero circa il reale meccanismo d'azione alla base dei suoi effetti terapeutici e psicotropi rimane celato fino alla scoperta del Tetraidrocannabinolo (THC) intorno agli anni '60, del principale recettore con cui interagisce, e del sistema endocannabinoide.

La pianta di Cannabis ed i suoi composti e derivati sono costituiti da un'importante varietà di sostanze chimiche: dei 483 elementi identificati ad oggi, alcuni come i 66 *cannabinoidi* si ritrovano unicamente nella cannabis, mentre altri come i *terpeni*, i più abbondanti con oltre 140 membri, sono diffusi trasversalmente in tutto il regno vegetale.

Quando ci riferiamo a "cannabinoidi" parliamo di un gruppo di 21 composti terpeno-fenolici unicamente riscontrabili all'interno di *Cannabis sativa*, dove i due più abbondanti e studiati sono rappresentati dal tetraidrocannabinolo (Δ_9 -Thc, THC) conosciuto come il principale per le sue proprietà psicoattive all'interno dei Tetraidrocannabinoli, ed il Cannabidiolo (CBD), noto maggiormente invece per le proprietà anti-infiammatorie ed anti-psychoattive all'interno dei Cannabidioli.

Struttura del Tetraidrocannabinolo e del Cannabidiolo



La loro azione farmacologica è in stretto, ma non univoco, rapporto con il sistema endocannabinoide, in particolare con *Cannabinoid receptor type 1* (CB1) e il *Cannabinoid receptor type 2* (CB2), entrambi accoppiati a proteine Gi.

Il primo si trova costitutivamente espresso in alte concentrazioni a livello del sistema nervoso centrale, specialmente nella corteccia cerebrale, ippocampo, gangli della base, cervelletto, ed in alcuni tessuti nervosi periferici come i nervi sensitivi ed alcune fibre del sistema nervoso autonomo.

Il CB2 principalmente espresso su cellule del sistema immunitario quali linfociti B, linfociti T, cellule natural killer, monociti, macrofagi, è stato di recente individuato a livello del SNC,

espresso dalle microglia.

L'attivazione dei CB2 determina immunosoppressione a livello periferico e, recentemente, alcune evidenze sperimentali hanno dimostrato una stretta correlazione tra la sua over espressione a livello delle cellule gliali e la presenza di neuro-infiammazione suggerendo che la sua espressione possa costituire una risposta endogena di tipo protettivo a condizioni potenzialmente dannose; in esperimenti in vitro la sua attivazione ha provocato una riduzione di molecole pro-infiammatorie, elementi che potrebbero renderlo un possibile bersaglio farmacologico nella cura delle malattie neurodegenerative.

THC

Il THC, il principale cannabinoide, esplica le proprie azioni interagendo da agonista parziale con i recettori CB1Rs e CB2Rs, l'importante capacità psicoattiva, insieme all'attività analgesica, antispastica e muscolo-rilassante ne fanno il fito-cannabinoide che più comunemente troviamo contenuto all'interno delle differenti preparazioni farmaceutiche proposte dalla ricerca medico-scientifica per la terapia in particolare del dolore cronico, soprattutto di tipo neuropatico. Oltre al legame con i CB2 e CB1, estrinseca i propri effetti interagendo con un considerevole numero di altri recettori e sistemi di trasmissione: è un agonista dei recettori PPAR- γ e TRPA1, antagonista verso i recettori 5-HT3A, media l'attivazione dei recettori della glicina, ed interagisce con i recettori vanilloidi TRPA1 e TRPV2.

Gli effetti psicoattivi del THC derivano sia dal parziale agonismo che esercita nei confronti del CB1, sia dalla sua interazione con il sistema GABA-ergico e glutamatergo.

L'interazione con quest'ultimo sistema di neurotrasmissione spiega l'importante influenza del THC sulla risposta allo stimolo nocicettivo, dato il ruolo significativo che NMDA ricopre nella risposta secondaria e terziaria nell'iperalgia da sindromi da dolore cronico, come fibromialgia ed emicrania.

Il THC riduce del 30-40% la risposta del recettore NMDA con un effetto antiossidante e neuro-protettivo, blocca l'iperalgia capsaicino-indotta ed incrementa i livelli di serotonina inibendo il suo re-uptake a livello centrale, ma anche a livello periferico modulandone negativamente il rilascio da parte dei trombociti. Tutti questi meccanismi possono certamente influenzare il circuito dell'emicrania trigemino-vascolare.

CBD

Tra tutti i cannabinoidi il CBD rappresenta il più promettente da un punto di vista farmacologico, grazie alla mancanza di psico-attività, insieme alla dimostrata efficacia antinfiammatoria, antiossidante, ansiolitica e neuro-protettiva.¹

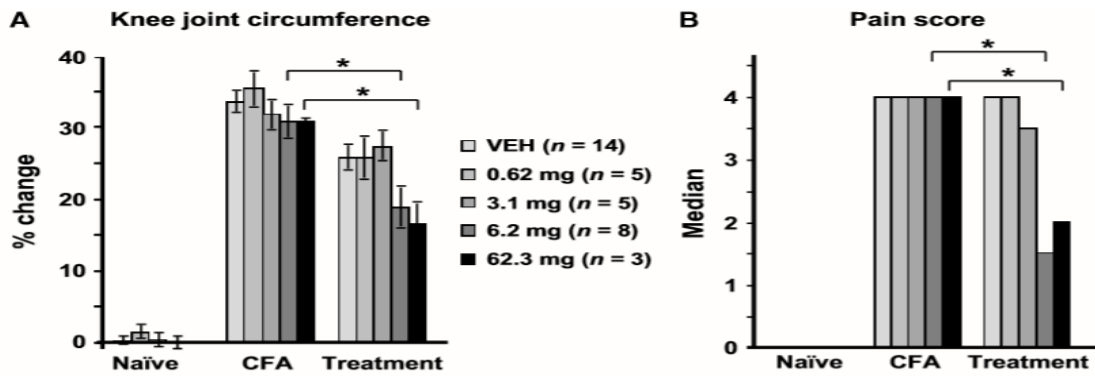
Nel novembre 2017 la WHO (The World Health Organization) classifica il CBD come sostanza non in grado di determinare abuso o dipendenza nell'uomo, non emergendo evidenze circa problemi di sanità pubblica correlati al suo consumo. Nel gennaio 2018 anche la World Anti-Doping Agency elimina il CBD dalle sostanze proibite all'uso degli atleti².

Il cannabidiolo (CBD) dimostra una estrema versatilità farmacologica: riesce, anche a concentrazioni nanomolari, a spiazzare il THC dai siti di legame del recettore CB1, pur avendo per questi una bassa affinità. Sperimentalmente e clinicamente sembra che questo possa mitigare o bloccare gli effetti provocati dal THC: importanti review mostrano come la co-somministrazione di THC-CBD riduca significativamente la tachicardia THC-indotta, i suoi effetti ansiogeni, e alterazioni della percezione e della memoria^{3,4,5}. Allo stesso modo un recente studio dimostra come anche nell'uso ludico-ricreazionale, se somministrato in precise proporzioni con THC, il CBD sia capace di eliminare sintomi cognitivi e deficit di memoria indotti dal fumo di cannabis⁶.

Non interagisce però con il solo sistema endocannabinoide. Sembra infatti che altri sistemi recettoriali ed enzimatici siano intaccati dalla sua attività: agisce da agonista nei confronti del TRPV1, e da modulatore allosterico dei recettori per la glicina $\alpha 1$ e $\alpha 1\beta$. Questo suggerisce un suo ruolo nel dolore cronico infiammatorio^{7,8,9} considerando l'azione di neurotrasmettitore inibitorio che la glicina esercita a livello delle corna dorsali del midollo spinale.

L'azione antinfiammatoria del CBD è mediata sia dall'interazione con i recettori vanilloidi, sia dall'inibizione della lipoossigenasi e ciclossigenasi^{10,11} in studi animali si è visto infatti come raggiunga un'efficacia analgesica centinaia di volte superiore all'aspirina^{12,13}

In uno studio del 2016¹⁴ Hammell e coll. sottolineano l'efficacia antinfiammatoria del CBD se somministrato per via transdermica in un modello murino di dolore origine artrite. Dopo aver evocato lo stimolo doloroso tramite iniezione di CFA (Complete Freund's adjuvant, sol. salina : olio di arachidi 1:1) vengono somministrate preparazioni di gel a base di CBD a diversa concentrazione (0.6, 3.1, 6.2 or 62.3 mg/die) ed analizzata la circonferenza dell'articolazione ed il grado di invasione di cellule infiammatorie nel tessuto. I risultati hanno mostrato come i gel a più alte dosi di CBD (6.2 e 62.3mg) riducevano di quasi il 50% lo spessore dei tessuti, rispetto alle preparazioni a più bassa concentrazione che non alteravano significativamente l'edema tissutale.



I numerosi effetti del CBD sulla trasmissione serotonergica, mediati in particolare dal recettore 5-HT_{1A}, forniscono un importante razionale per l'uso di questo ed altri fito-cannabinoidi nel trattamento dell'ansia. In un recente trial clinico randomizzato (Crippa et al, 2010)¹⁵ emerge come i pazienti con diagnosi di disturbo d'ansia sociale trattati con preparazioni a base CBD avevano netti miglioramenti in termini di riduzione dei sintomi cognitivi e ansiosi rispetto a placebo ^{15,16,17}.

Ulteriore supporto al ruolo che in prospettiva il CBD può avere come antidepressivo proviene da uno studio del 2010 (Zanelati et al.)¹⁸: in modelli murini il CBD (alla dose di 30 mg/kg) ottiene maggiori risultati rispetto all'Imipramina al Forced Swim Test (P<0.01), diminuendo l'immobilità e vincendo il blocco indotto dal pretrattamento con inibitori- 5HT₁¹⁹.

Terpeni





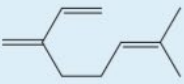

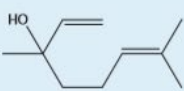

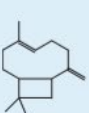

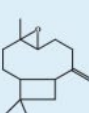

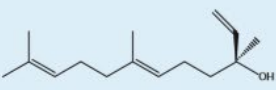

Per anni le attività biologiche della cannabis sono state attribuite al THC, ed in minore parte al CBD. Solo negli ultimi anni è stato approfondito il ruolo di quest'ultimo e più recentemente anche quello potenziale di numerosi composti del fitocomplesso, come la famiglia dei terpeni e dei flavonoidi, dotati loro stessi di intrinseche proprietà biologiche, non esclusa la possibilità di interazioni tra loro ^{19,20}.

In relazione agli altri composti presenti nella pianta, i terpeni rappresentano il gruppo di sostanze volatili più numeroso, parte integrante dell'olio essenziale, meglio estraibile con distillazione in corrente di vapore. A differenza dei cannabinoidi sono questi che determinano il caratteristico aroma della pianta.

I terpeni sono composti farmacologicamente molto versatili: sono lipofili, interagiscono canali ionici di membrana a livello di cellule muscolari e neuronali, sistemi neuro-recettoriali, recettori accoppiati a proteine ^{19,20,21,22}.

Ed, al pari di ogni altra sostanza attiva, hanno ciascuno propria attività biologica, ma sempre più

interessante si rivela il loro possibile ruolo sinergico con i cannabinoidi, nell'amplificare alcune loro proprietà, come l'attività antiinfiammatoria, analgesica, ansiolitica, antidepressiva, antibatterica. La maggior parte dei dati raccolti provengono da studi preclinici in modelli animali e in vitro ^{20,23}

Terpenoid	Structure	Commonly encountered in	Pharmacological activity (Reference)	Synergistic cannabinoid
Limonene		 Lemon	Potent AD/immunostimulant via inhalation (Komori <i>et al.</i> , 1995) Anxiolytic (Carvalho-Freitas and Costa, 2002; Pultrini Ade <i>et al.</i> , 2006) via 5-HT _{1A} (Komiya <i>et al.</i> , 2006) Apoptosis of breast cancer cells (Vigushin <i>et al.</i> , 1998) Active against acne bacteria (Kim <i>et al.</i> , 2008) Dermatophytes (Sanguinetti <i>et al.</i> , 2007; Singh <i>et al.</i> , 2010) Gastro-oesophageal reflux (Harris, 2010)	CBD CBD CBD, CBG CBD CBG THC
α -Pinene		 Pine	Anti-inflammatory via PGE-1 (Gil <i>et al.</i> , 1989) Bronchodilatory in humans (Falk <i>et al.</i> , 1990) Acetylcholinesterase inhibitor, aiding memory (Perry <i>et al.</i> , 2000)	CBD THC THC?, CBD
β -Myrcene		 Hops	Blocks inflammation via PGE-2 (Lorenzetti <i>et al.</i> , 1991) Analgesic, antagonized by naloxone (Rao <i>et al.</i> , 1990) Sedating, muscle relaxant, hypnotic (do Vale <i>et al.</i> , 2002) Blocks hepatic carcinogenesis by aflatoxin (de Oliveira <i>et al.</i> , 1997)	CBD CBD, THC THC CBD, CBG
Linalool		 Lavender	Anti-anxiety (Russo, 2001) Sedative on inhalation in mice (Buchbauer <i>et al.</i> , 1993) Local anesthetic (Re <i>et al.</i> , 2000) Analgesic via adenosine A _{2A} (Peana <i>et al.</i> , 2006) Anticonvulsant/anti-glutamate (Elisabetsky <i>et al.</i> , 1995)	CBD, CBG? THC THC CBD CBD, THCV, CBDV
β -Caryophyllene		 Pepper	AI via PGE-1 comparable phenylbutazone (Basile <i>et al.</i> , 1988) Gastric cytoprotective (Tambe <i>et al.</i> , 1996) Anti-malarial (Campbell <i>et al.</i> , 1997) Selective CB ₂ agonist (100 nM) (Gertsch <i>et al.</i> , 2008) Treatment of pruritus? (Karsak <i>et al.</i> , 2007) Treatment of addiction? (Xi <i>et al.</i> , 2010)	CBD THC ? THC THC CBD
Caryophyllene Oxide		 Lemon balm	Decreases platelet aggregation (Lin <i>et al.</i> , 2003) Antifungal in onychomycosis comparable to ciclopiroxolamine and sulconazole (Yang <i>et al.</i> , 1999) Insecticidal/anti-feedant (Bettarini <i>et al.</i> , 1993)	THC CBC, CBG THCA, CBGA
Nerolidol		 Orange	Sedative (Binet <i>et al.</i> , 1972) Skin penetrant (Cornwell and Barry, 1994) Potent antimalarial (Lopes <i>et al.</i> , 1999, Rodrigues Goulart <i>et al.</i> , 2004) Anti-leishmanial activity (Arruda <i>et al.</i> , 2005)	THC, CBN - ? ?

(modificata da Russo E, 2011)

I terpeni più significativi dal punto di vista quantitativo e fisiologico per quanto concerne il possibile ruolo farmacologico, sono il β -Caryophyllene ed il β -Mircene.

Beta-Cariofillene

Beta-cariofillene (β -Caryophyllene) è il più comune delle due forme di cariofillene, si ritrova anche in cannella, chiodi di garofano, pepe nero, origano, basilico, rosmarino e nel luppolo. Dell'

olio essenziale di Cannabis rappresenta circa il 18-20 % dell'olio essenziale.

Ha mostrato efficacia come analgesico²⁴, antiossidante, e la sua attività antinfiammatoria via PGE-1 simile a quella esercitata dall'indometacina, è paragonabile in potenza alla sostanza tossica fenilbutazone, ma differenza di questi agenti il cariofillene ha mostrato un effetto citoprotettivo nei confronti della mucosa gastrica²⁵.

Il **Mircene**, presente nell'olio essenziale in una percentuale del 22-23 %, è il più comune tra i monoterpenoidi presenti nella cannabis, e come il cariofillene possiede un'importante efficacia antinfiammatoria, analgesica ed ansiolitica^{26,27} ed è largamente sfruttato nell'industria dei cosmetici.

Il mircene riduce l'infiammazione tramite la via delle prostaglandine (PGE-2)²⁶, e l'inibizione della carcinogenesi epatica delle aflatoxine²⁸ mentre l'attività analgesica mostrata in modelli murini può venire bloccata dal naloxone, forse attraverso l'interazione con il recettore α -2 adrenergico²⁹. Inoltre, sempre in studi di laboratorio eseguiti su roditori, si è visto che il mircene agisce da muscolo-rilassante riuscendo ad alte dosi a potenziare l'effetto dei barbiturici in termini di lunghezza del sonno³⁰.

In una review del 2006 (Russo et al.)³¹ vengono analizzati diversi studi in cui si evidenzia come la combinazione di THC, CBD e Terpeni produca, *in vivo*, maggiori benefici rispetto ad ognuno dei singoli componenti, sia in studi condotti su roditori, che condotti su umani.

Oltre alla maggiore efficacia farmacologica, è da menzionare la sensibile riduzione di possibili effetti avversi imputabili alle singole sostanze.

Considerate nell'insieme, le informazioni fin qui esposte supportano la teoria che lo sviluppo di preparazioni ricche in fito-cannabinoidi e terpenoidi possa rafforzare ed ampliare le applicazioni cliniche e terapeutiche degli estratti di cannabis contenenti THC o altri cannabinoidi.

Le maggiori evidenze emergono nel trattamento di sindromi di dolore cronico, infiammatorio e neuropatico^{14,23}, e in disturbi di tipo neuropsichiatrico, in particolar modo sindromi ansioso-depressive.^{20,23, 32,33}

Attività antinfiammatoria ed analgesica

La più grande rivelazione riguardo il cariofillene è stata forse la dimostrazione dell'attività di agonismo selettivo nei confronti del recettore CB2, suggerendo ulteriori prove a supporto della possibile sinergia tra cannabinoidi e terpenoidi^{14,19,20,23}

In uno studio del 2013 viene dimostrato che il Beta-Cariofillene somministrato oralmente

possiede un effetto analgesico²⁴ nel dolore infiammatorio e neuropatico di roditori CB2mediato. Questo era però assente veniva indotto un blocco selettivo del CB2r dal suo specifico antagonista SR144528.

In questo senso trovano ragione teorie sull'effetto sinergico che può scaturire da preparazioni composte da cannabinoidi e molecole non cannabinoidi.

Uno studio del 2008 (Comelli et al.)³² mette a confronto l'attività analgesica di un estratto di Cannabis sativa arricchito con CBD, THC, terpeni, e flavonoidi, rispetto a quella ottenuta dalle singole molecole della preparazione, in un modello murino di dolore neuropatico

L'estratto di cannabis arricchito (eCBD) era composto da 64.5% CBD, 4% THC, <4% e non cannabinoidi (terpeni, carotenoidi).

Quattro gruppi di roditori vengono esposti per un periodo di 7 giorni a progressiva costrizione del nervo sciatico, e ne viene valutata la risposta nocicettiva in termini di sensibilità termodolorifica e allodinia allo stimolo meccanico.

Il trattamento con eCBD, per i 7 giorni successivi alla lesione, risolve completamente l'iperalgia termica, ed attenua parzialmente l'allodinia da stimolo meccanico, mentre lo stesso schema di somministrazione cronica di estratto di THC puro non ottiene alcuna risposta.

Per verificare che la completa risposta allo stimolo termodolorifico determinata da eCBD non derivi solo da un meccanismo sinergico tra THC e CBD, è stato somministrato un analogo schema di trattamento con la combinazione di solo THC e CBD. Quest'ultimo ha rilevato un risultato farmacologico sovrapponibile a quello ottenuto dall'estratto di solo CBD, dimostrando che la maggiore attività analgesica registrata per eCBD sia da imputare agli altri componenti dell'estratto, in particolare ai terpeni presenti.

Insieme al sistema endocannabinoide sembrano giocare un importante ruolo anche i recettori vanilloidi. L'ultimo giorno di trattamento è stata studiata l'interazione tra i recettori CB1, CB2 e TRPV1 ed i loro specifici antagonisti, monitorandone l'attivazione durante la somministrazione di eCBD. La sola Capsazepina ha determinato una completa regressione dell'effetto iper-analgesico termodolorifico di eCBD. Inoltre, è stata indagata tramite analisi spettrofotometrica l'alterazione della concentrazione del citocromo p450 ultimati i 14 giorni di trattamento. Dalla misurazione effettuata a livello dei microsomi epatici dei roditori, è emerso che nel gruppo trattato con eCBD c'è stata una riduzione del 40% della concentrazione di citocromo p450. Al contrario, la proteina non ha subito alcuna significativa variazione né dalla somministrazione dei singoli THC e CBD, né dall'estratto di THC+CBD.

Dai risultati esposti emerge come nella modulazione nocicettiva descritta un importante ruolo è mediato dai recettori vanilloidi TRVP1 e dalla riduzione dell'attività del citocromo p450, a cui

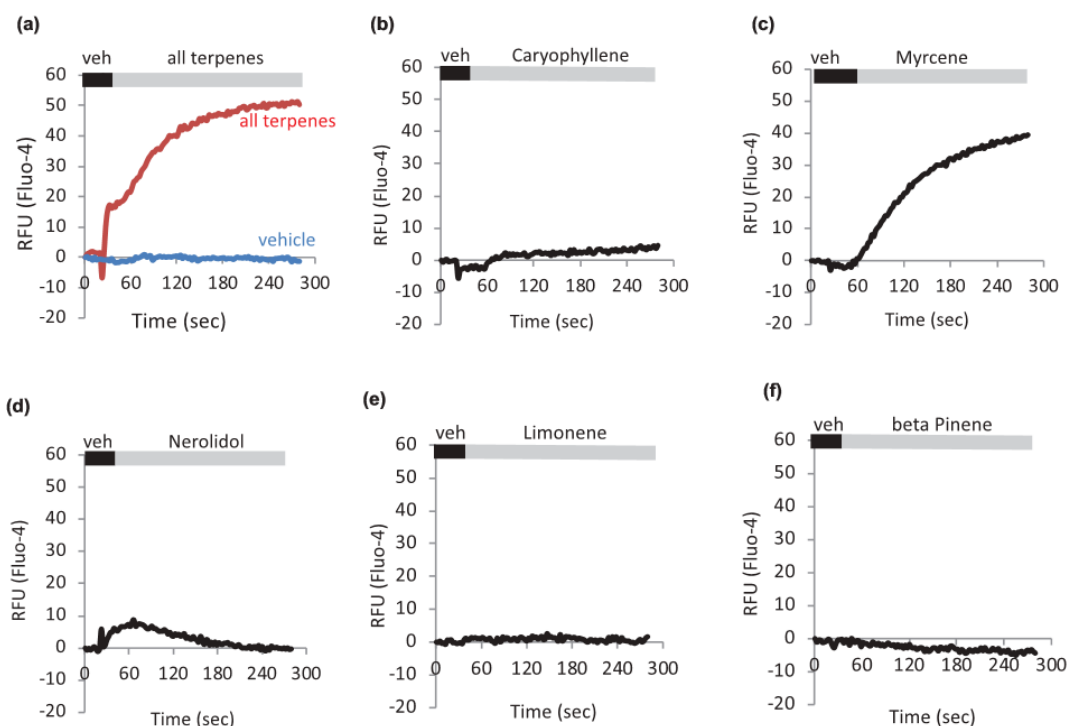
consegue un aumentata biodisponibilità del cannabidiolo, ed alla luce delle numerose evidenze circa le attività antinfiammatorie ed antiossidanti di terpeni^{19,20,23} e flavonoidi, non può essere esclusa una loro importante azione sinergica³⁴ negli effetti terapeutici riscontrati.

Questo studio³² dimostra quindi che una preparazione a base di CBD contenente terpeni e flavonoidi produce un maggiore effetto analgesico rispetto ai singoli cannabinoidi, nel trattamento del dolore neuropatico in un modello murino, e sottolinea ancora una volta quanto sia complessa l'interazione tra sistema endocannabinoide e vanilloide nella modulazione degli stimoli nocicettivi.

In questo contesto si inserisce uno studio³⁵ preliminare del 2019 che indaga l'interazione tra il terpenoide Mircene e l'attività del TRVP1 (Nociceptive Transient Receptor Potential channel).

Dai risultati emerge come il Mircene induca un flusso di ioni Ca²⁺ TRVP-mediato sensibilmente maggiore rispetto agli altri terpeni contenuti nell'estratto utilizzato, e come questo venga inibito dallo specifico antagonista del recettore TVRP1, la capsazepina.

Questi dati evidenziano quindi come il TVRP1 sia bersaglio, oltre che del THC e del CBD, anche di terpenoidi come il Mircene, suggerendone il potenziale terapeutico effetto analgesico³³.



Il sistema endocannabinoide, come ampiamente descritto, è distribuito in tutto il sistema nervoso centrale, e tra le numerose attività in cui è coinvolto gioca un ruolo importante anche nella regolazione del tono umore³⁶.

Mentre i possibili benefici del THC sulla depressione rimangono controversi ³⁷, molto meno preoccupanti sarebbero i preparati a predominanza di CBD o CBG^{15,16}.

Ormai è noto come anche in vivo gli effetti psicostimolanti del THC, alla base del suo scarso utilizzo in pz affetti da depressione, sarebbero certamente modulati ed attenuati se presente anche basse concentrazioni di CBD¹⁹.

Sicuramente, i risultati ottenuti in termini di miglioramento sintomi affettivi e cognitivi con la sola inalazione del profumo di agrumi³⁸ in pz affetti da depressione, suggeriscono fortemente la possibilità di una sinergia in una preparazione tra fito-cannabinoidi e terpenoidi.

Altre evidenze in questo senso arrivano dallo studio³⁹ di Rochefort del 2002, in cui l'aumento dell'esposizione agli odori in topi adulti ha indotto meccanismi di neurogenesi a livello del sistema olfattivo. Tali risultati potrebbero supportare gli eventi di plasticità neuronale che caratterizzano la depressione ⁴⁰ ed il coinvolgimento del sistema endocannabinoide nel trattamento delle addiction ⁴¹.

Bibliografia

1. Appendino, G.; Chianese, G.; Tagliatela-Scafati, O. *Cannabinoids: Occurrence and medicinal chemistry*. *Curr. Med. Chem.*, 2011, 18, 1085–1099.
2. Hartsel, J.A.; Eades, J.; Makriyannis, A. *Cannabis sativa and hemp*. In *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*, 2016, 735–754.
3. Nicholson AN, Turner C, Stone BM, Robson PJ. *Effect of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on nocturnal sleep and early-morning behavior in young adults*. *J Clin Psychopharmacol*, 2004, 24: 305–313.
4. Murillo-Rodriguez E, Millan-Aldaco D, Palomero-Rivero M, Mechoulam R, Drucker-Colin R). *Cannabidiol, a constituent of Cannabis sativa, modulates sleep in rats*. *FEBS Lett*, 2006, 580: 4337–4345.
5. Russo EB, Guy GW. *A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol*. *Med Hypotheses*, 2006, 66 (2), 234-46.
6. Morgan CJ, Curran HV. *Effects of cannabidiol on schizophrenia-like symptoms in people who use cannabis*. *Br J Psychiatry*, 2008, 192: 306–307.

7. Pertwee RG. *The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin*. Br J Pharmacol, 2008, 153: 199–215.
8. Boychuk DG, Goddard G, Mauro G, Orellana MF. *The effectiveness of cannabinoids in the management of chronic non malignant neuropathic pain: a systematic review*. J Oral Facial Pain Headache, 2015, 29: 7-14.
9. Gui H, Liu X, Wang ZW, He DY, Su DF, Dai SM. *Expression of cannabinoid receptor 2 and its inhibitory effects on synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2014, 53: 802-809.
10. Brown AJ. *Novel cannabinoid receptors*. Br J Pharmacol, 2007, 152: 567-575.
11. Rahn EJ, Hohmann AG. *Cannabinoids as pharmacotherapies for neuropathic pain: from the bench to the bedside*. Neurotherapeutics, 2009, 6: 713-737
12. Williamson EM, Evans FJ. *Cannabinoids in clinical practice*. Drugs, 2000, 60: 1303-1314
13. Evans FJ. *Cannabinoids: the separation of central from peripheral effects on a structural basis*. Planta Med, 1991; 57: S60-S67.
14. D.C. Hammell, L.P. Zhang, F. Ma, S.M. Abshire, S.L. McIlwrath, A.L. Stinchcomb, K.N. Westlund. *Transdermal cannabidiol reduces inflammation and pain-related behaviours in a rat model of arthritis*, 2016.
15. Crippa JA, Zuardi AW, Hallak JE. *Therapeutical use of the cannabinoids in psychiatry*. Rev Bras Psiquiatr. 2010, 32: S56-S66.
16. Crippa JA, Derenusson GN, Ferrari TB, Wichert-Ana L, Duran F, Marti NSRO et al. *Neural basis of anxiolytic effects of cannabidiol (CBD) in generalized social anxiety disorder: a preliminary report*. J Psychopharmacol 2011, 25: 121-130.
17. Stephen P.H.Alexander, *Therapeutic potential of cannabis-related drugs* 2016
18. Zanelati TV, Biojone C, Moreira FA, Guimaraes FS, Joca SR . *Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors*. Br J Pharmacol 2010, 159: 122-128.
19. Russo, E.B. *Taming THC: Potential Cannabis Synergy and Phytocannabinoid-terpenoid Entourage Effects*. Br J Pharmacol, 2011.
20. Eric P. Baron DO. *Medicinal Properties of Cannabinoids, Terpenes, and Flavonoids in Cannabis, and Benefits in Migraine, Headache, and Pain: An Update on Current Evidence and Cannabis Science*. Headache Currents, 2018.
21. E. Joy Bowles *The Chemistry of Aromatherapeutic Oils*, 3rd edn. Allen & Unwin: Crow's Nest, NSW 2003.
22. Buchbauer G. *Biological activities of essential oils*. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, 2010, pp. 235–280.

23. Federica Pellati, Virginia Brighenti , Johanna Sperlea , Lucia Marchetti , Davide Bertelli and Stefania Benvenuti. *New Methods for the Comprehensive Analysis of Bioactive Compounds in Cannabis sativa L. (hemp)*. *Molecules*, 2018.
24. A.-L. Klauke et al. *The cannabinoid CB2 receptor-selective phytocannabinoid beta-caryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain*. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2014, 24: 608-620.
25. Singh B, Sharma RA. *Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications*. *3 Biotech*. 2015, 5: 129-151.
26. Van Cleemput M, Cattoor K, De Bosscher K, Haegeman G, De Keukeleire D, Heyerick A. *Hop (Humulus lupulus)-derived bitter acids as multipotent bioactive compounds*. *J Nat Prod*. 2009, 72: 1220-1230.
27. Lorenzetti BB, Souza GE, Sarti SJ, Santos Filho D, Ferreira SH. *Myrcene mimics the peripheral analgesic activity of lemongrass tea*. *J Ethnopharmacol*. *J Ethnopharmacol*. 1991, 34: 43-48.
28. De Oliveira AC, Ribeiro-Pinto LF, Paumgarten JR. *In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by beta-myrcene and other monoterpenoid compounds*. *Toxicol Lett*. 1997, 92 : 39-46.
29. Rao VS, Menezes AM, Viana GS (1990). *Effect of myrcene on nociception in mice*. *J Pharm Pharmacol*. 1990, 42: 877-878.
30. do Vale TG, Furtado EC, Santos JG Jr, Viana GS (2002). *Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from Lippia alba (Mill.) Brown*. *Phytomedicine* 2002, 9: 709-714.
31. Russo E. *A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol*. *Med Hypotheses*, 2006, 66 (2), 234-46,.
32. Comelli et al. *Antihyperalgesic Effect of a Cannabis sativa Extract in a Rat Model of Neuropathic Pain: Mechanisms Involved*. *Phytother Res*, 2018.
33. Ferber et al. *The "Entourage Effect": Terpenes Coupled with Cannabinoids for the Treatment of Mood Disorders and Anxiety Disorders*. *Curr Neuropharmacol.*, 2020.
34. Sandra Blasco-Benito. *Appraising the "entourage effect": antitumor action of a pure cannabinoid versus a botanical drug preparation in preclinical models of breast cancer*. *Biochem Pharmacol*, 2018.
35. C. Jansen, L.M.N Shimoda, J.K. Kawakami, L. Ang, A.J. Bacani. *Myrcene and terpene regulation of TRPV1*. *Channels (Austin)*, 2019.
36. Fusar-Poli P, Allen P, Bhattacharyya S, Crippa JA, Mechelli A, Borgwardt S et al. *Modulation of effective connectivity during emotional processing by Delta9-*

tetrahydrocannabinol and cannabidiol. Int J Neuropsychopharmacol. 2010.

37. Denson TF, Earleywine M. *Decreased depression in marijuana users*. Addict Behav, 2006, 31: 738–742.
38. Komori T, Fujiwara R, Tanida M, Nomura J, Yokoyama MM). *Effects of citrus fragrance on immune function and depressive states*. Neuroimmunomodulation 1995, 2: 174–180.
39. Rochefort C, Gheusi G, Vincent JD, Lledo PM. *Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory*. J Neurosci, 2002, 22: 2679–2689.
40. Gerdeman GL, Lovinger DM). *Emerging roles for endocannabinoids in long-term synaptic plasticity*. Br J Pharmacol, 2003, 140: 781–789.

Material and methods

Human osteoblastic SaOS-2 cells were treated with H₂O₂ (100, 200 and 250 μM) to simulate strong oxidative stress conditions and consequent inflammatory response. Several concentrations of CBD, β-myrcene and β-caryophyllene (ranging from 0,1 to 100 μM) were tested, in order to highlight their antioxidant and anti-inflammatory power. Moreover, cells were treated with the following combinations: CBD + β-myrcene (ratio 4:1), CBD + β-caryophyllene (ratio 4:1) and CBD + β-myrcene + β-caryophyllene (ratio 4:1:1).

The following tests have been performed.

CELL VIABILITY

Saos-2 were pre-treated for 24 h with the different compounds and then co-treated with H₂O₂. After 24 h cell viability was determined by MTT test. Cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and incubated in 100 μl/well serum-free medium supplemented with 10 μl MTT solution (5 mg/ml) at 37 °C. After 4 h, the supernatant was removed, and the formazan crystals were dissolved by incubation with 150 μl/well DMSO for 20 min. The plate was then agitated and absorbance at 570 nm was measured in a microplate reader.

PROTEIN CARBONYLATION

Through Western Blot analysis, the total content of carbonylated proteins was quantified. Protein carbonyl content is indeed a commonly used marker of oxidative modification of proteins, providing significant evidence of oxidative stress. After the indicated treatments, cells were collected and lysed in RIPA Buffer added with protease inhibitors. Protein concentrations were determined using BCA assay kit. Proteins were separated by electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked with a solution of 5% milk in TBS-Tween 0,1% for 1 h, and incubated with the primary antibody overnight at 4°C. After the

incubation, membrane was rinse with distilled water, incubated with the secondary antibody for 1h at RT, and washed again. Revelation was achieved through chemiluminescence.

INFLAMMATION MARKERS

The expression levels of inflammatory markers (COX2 and iNOS) were quantified by Western blotting. Each experiment was performed three times and the levels of proteins expression were normalised to the level of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression.

NO RELEASE

In order to evaluate both oxidative and inflammatory stress, nitrite (NO) levels were measured in SaOS-2 supernatants with Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylenediamine dihydrochloride, and 2.5% phosphoric acid). Equals volumes of supernatant and Griess reagent were incubated at room temperature for 5 min. Nitrite concentrations were determined spectrophotometrically at 550 nm using a standard curve generated with serial dilutions of sodium nitrite.

PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES

Total RNA was isolated from cultured Saos-2 cells using a commercially available kit (RNeasyMini kit) for RT-PCR. Aliquots containing equal amounts of mRNA were subjected to real-time PCR to quantify the expression of proinflammatory cytokines. cDNA synthesis was performed using 1 mg DNase-treated total RNA. The cDNA mixture obtained was subjected to real-time PCR using SYBR Green I dye and primers for: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF α . Each real-time PCR was performed three times and the levels of mRNA expression were calculated and normalised to the level of GAPDH mRNA at each time.

TBARS ASSAY

Lipid peroxidation has been commonly used as an indicator of ROS-mediated damage to cell membranes. The level of lipid peroxidation was measured using TBARS assay. Cells were homogenized with 0.5% Triton X-100 and the cell homogenates were mixed with 1 ml of 0.67% TBA, 1 ml 20% trichloroacetic acid, and 1.5 ml 0.04% BHT. The mixtures were incubated in a boiling water bath for 20 min. After cooling to room temperature, the reaction mixtures were centrifuged at 4000g for 10 min and the absorbances of the supernatants were measured at 532 nm. The concentrations of TBARS were calculated using MDA (malonydialdehyde) as a reference standard.

	Contro l	Cbd	Myrce ne	Cbd /Myrce ne	β - caryophyll ene	Cbd/ β - caryophyll ene	Cbd/Myrcene/ β - caryophyllene
inflammation markers %							
COX2	75	60	67,5	20,75	69,25	22,25	19
INOS	59,75	49,5	52,25	6,75	54,75	10,75	6
proinflammatory cytokines %							
: IL-1 β	62,5	53	56,5	15,25	58	16	14,75
IL-6	69,5	58	60,75	18,25	61,25	19,75	16,25
IL-8	74,12	59,25	66,75	18,75	67	20,25	17,75
IL-10	59,75	50,25	53,75	12,75	52	11,25	10
TNF α	72,25	58,25	65,75	9,25	67,25	12,75	7,5

The above table shows results about cells treated with the following combinations: CBD + β -myrcene (ratio 4:1), CBD + β -caryophyllene (ratio 4:1) and CBD + β -myrcene + β -caryophyllene (ratio 4:1:1).

Referring to the expression levels of inflammatory markers - COX2 and iNOS - quantified by Western blotting) we can see the significant decrease by using the combination CBD + β -caryophyllene and the synergistic effect for the triple combination CBD + β -myrcene + β -caryophyllene (19% and 6% as final result).

With reference to proinflammatory cytokines, the synergistic effect of the triple combination (CBD + β -myrcene + β -caryophyllene) is very noticeable for all the cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF α .