

ישיבה תיכונית חיספין

חיספין 240457

## השפעת הרצפטור CB2 לאנדוקנבידואידים על הגברת הרג חיידקים על ידי נויטרופילים בעזרת קנאביס.

תחום הדעת: ביולוגיה

מגיש: כרמל כץ

מקום מגורים: מעלה גלבע

תעודת זהות: 325533610

טלפון התלמיד: 0506332193

הנחיה:

ד"ר עידן כהן

מקום עבודה: מרכז רפואי העמק

כתובת דוא"ל תלמיד: carmel.katz.2004@gmail.com  
דניאל מבושוביץ, MSc  
מקום עבודה: גליליון



העבודה נעשתה במסגרת גליליון- השותפות האזורית להעשרה ומצינות במדעים וטכנולוגיה

דצמבר

2020

3.....	1. תקציר	3
4.....	2. סקירת ספרות	4
4 .....	2.1 מערכת החיסון	4
4 .....	2.2 נויטרופילים	4
5 .....	2.3 נטוזיס	5
7 .....	2.4 זיהומים (Sepsis)	7
7 .....	2.5 המערכת האנדוקנבינואידית	7
8.....	3. שיטות וחומרים	8
8 .....	3.1 לקיחת דמים מתורמים בריאים	8
8 .....	3.2 הפקת תאי נויטרופילים	8
9 .....	3.3 טיפול בנויטרופילים	9
10 .....	3.4 בדיקת השפעת תמצית קנאביס על הנויטרופילים	10
10 .....	3.5 הוספת מעכב תחרותי למדיום הגידול	10
11 .....	3.6 הוספת CBD	11
11 .....	3.7 כימות הנטוזיס	11
12.....	4. תוצאות	12
	4.1 בדיקת השפעת תמצית הקנאביס 2574 מעורבותו של הרצפטור לקנבינואידים CB2 על הגברת הנטוזיס	12
	4.2 בדיקת מעורבות CBD בהגברת הנטוזיס על ידי קנאביס	13
14.....	5. דיון ומסקנות	14
17.....	6. ביבליוגרפיה	17

## 1. תקציר

**רקע:** זיהום הוא גורם המוות העיקרי בארצות הברית, זיהומים חריפים מחמירים מחלות כרוניות ויכולים לגרום למחלות כרוניות חדשות, מה שמוביל לתוצאות כבדות משקל בטווח הארוך גם אצל אנשים שהחלימו ממחלות קשות. תאי דם לבנים מסוג נויטרופילים, פועלים להשמדת גורמים זרים הנכנסים לגוף ויכולים לגרום לזיהומים, כשלאחרונה התגלתה שיטה חדשה בה פועלים הנויטרופילים והיא מעוררת עניין רב. שיטה זו עובדת בעזרת רשתות אקסטרצלולריות תאיות או בקיצור נטוזיס (NETosis-neutrophil extracellular traps), תפקיד הרשתות הוא לנטרל את הגורמים הזרים הנכנסים וכך להגן עליו. במחקרים קודמים התגלה כי תמציות קנאביס מזנים מסוימים מגבירים מאוד את תהליך הנטוזיס ולזה משמעות רפואית משמעותית מאוד. במחקר זה נבדק המנגנון דרכו מוגבר הנטוזיס על ידי קנאביס בכדי להבין טוב יותר את מסלול זה.

**מטרת המחקר:** לבחון האם הרצפטור לקנבינואידים מסוג CB2 אחראי להגברת הנטוזיס והרג חיידקים המוגבר המושרה על ידי קנאביס, והאם עיכוב הרצפטור CB2 לקנבינואידים יפחית או יבטל את תהליך הגברת הנטוזיס המתרחש לאחר הדגרה עם קנאביס.

**שיטות העבודה:** נלקחו דמים מתורמים בריאים ומהם בודדו נויטרופילים בשיטת Negative selection. לנויטרופילים הנקיים הוספה תמצית הקנאביס מסוג 2574 ומעכב תחרותי לרצפטור CB2 (כדי לבטל את פעילות הרצפטור לטובת הניסוי) או לחילופין הוסף החומר CBD הטהור כתחליף לתמצית קנביס (בהנחה כי הוא החומר המשפעל היחיד) ובכדי לבדוק האם CBD אכן מתווך פעילות זו. בכדי לכמת את מידת הנטוזיס נמדדה כמות ה-DNA החוץ תאי שמהווה אינדיקציה ישירה לרמת הנטוזיס שהתרחשה. כימות ה-DNA התבצע בעזרת הוספת החומר SYTOX green ולאחר מכן הפלורסנציה נמדדה בעזרת מכשיר ELISA (excitation 504nm , emission 523 nm). התוצאות הוצגו ב-RFU – Relative Fluorescence Unit.

**תוצאות:** רמת הנטוזיס שהתבצעה בקבוצת הביקורת החיובית הייתה זהה (או בעלת סטייה קטנה וללא משמעות סטטיסטית) לרמת הנטוזיס בנויטרופילים שהוספה להם תמצית הקנאביס ושנחסם בהם הרצפטור CB2. בהוספת CBD כתחליף טהור לתמצית הקנביס גם כן לא נצפתה עלייה מכבר לדוגמת הביקורת החיובית.

**מסקנות:** נראה כי הרצפטור לקנבינואידים מסוג CB2 או הקנבינואיד CBD אינם שותפים בתהליך הגברת הנטוזיס על ידי תמצית הקנאביס 2574. מסקנה זו משאירה מספר שאלות פתוחות: איזה רצפטור כן שותף בתהליך/ באיזה מנגנון התהליך עובד, ואיזה קנבינואיד או חומר אחר ובאיזו דרך מסוגל לשפעל נויטרופילים ליצירת נטוזיס. שאלות אלו כדאי שיחקרו במחקרי המשך- ניסויי ההמשך יצטרכו לבדוק רצפטורים ומנגנונים נוספים שיכולים להיות שותפים בתהליך בכדי שנוכל להבין טוב יותר את עבודת מנגנוני הגוף.

## 2. סקירת ספרות

### 2.1 מערכת החיסון

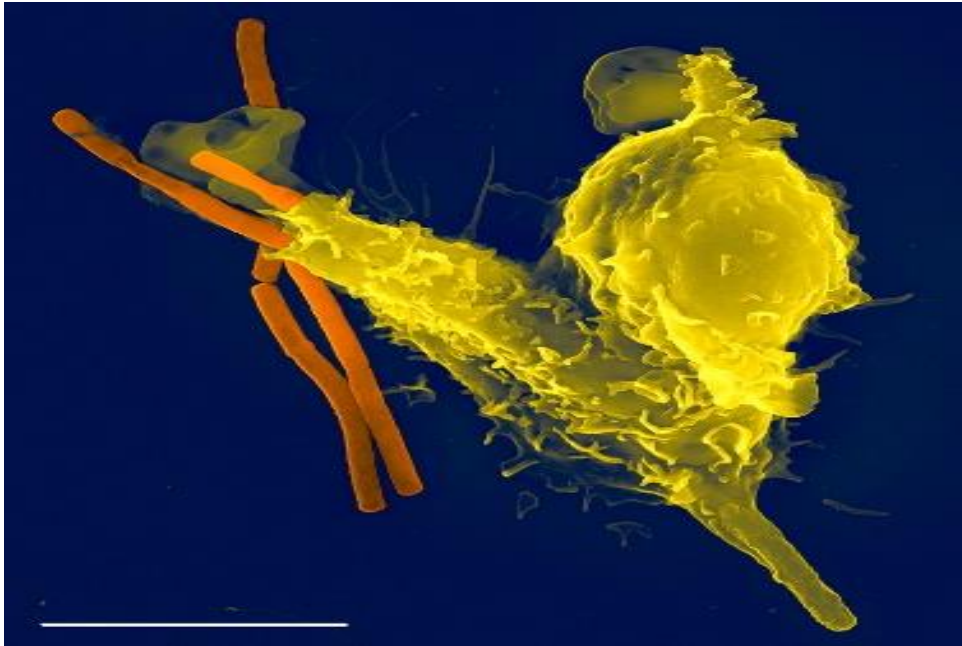
מטרתה העיקרית של מערכת החיסון היא לנטרל גורמים מהווי סיכון לגוף. מקובל לחלק את מרכיבי מערכת החיסון לשתיים – מערכת החיסון המולדת (The innate system) ומערכת החיסון הנרכשת (The adaptive system). המערכת המולדת כוללת תאים כמו מקרופאגים ונויטרופילים, שתפקידם העיקרי הוא להיות הקו הראשון והכללי ביותר שנלחם נגד גורמים מזיקים, במגע הראשון שלהם עם הגוף (וולף, 2018). המאפיין המובהק ביותר של המערכת הוא חוסר הספציפיות שלה, כלומר כל מולקולה או תא השייכים למערכת המולדת, פועלים נגד מגוון רחב של מחוללי מחלות, אך ורק על בסיס ההבחנה בין "זר" לבין "עצמי" וללא יכולת היכרות והבחנה ספציפית בין גורמים שונים. כמו כן המערכת מתאפיינת בכך שאין לה יכולת זיכרון וזאת בניגוד למערכת החיסון הנרכשת (אימונולוגיה, ל.ת.). תאי מערכת החיסון השייכים למערכת המולדת הם בכללם תאים פגוציטים, בעלי יכולת בליעה או "פגוציטוזה". מאפייני הפעילות העיקריים כתוצאה מפעילות של תאים אלו הם סימני הדלקת המקומית הקלאסית כגון אודם, נפיחות וחום במקום הפגיעה (איחוד הצלה, ל.ת.). על אף שתגובת המערכת המולדת מגינה על הגוף מפני פלישה של מיקרואורגניזמים והיא קריטית לקיומנו, היא יכולה לגרום גם לנזקים משמעותיים לרקמות או לעורר התפתחות של מחלות אוטואימוניות. מסיבה זו מערכת החיסון המולדת חייבת להיות תחת שליטה קפדנית (Błach-Olszewska, 2005).

בניגוד למנגנון הפעולה של המערכת המולדת, תאי המערכת הנרכשת, הכוללת תאים מסוג B או T, יודעים להגיב באופן ספציפי וממוקד לגורמים מזיקים. הם לומדים אותם, רוכשים זיכרון חיסוני וכך יודעים ולהגיב בעוצמה רבה יותר בפעם הבאה שייתקלו באותם גורמים מזיקים (וולף, 2018). במחקר זה נתמקד במערכת המולדת (innate) ובתהליכים המתרחשים בה.

### 2.2 נויטרופילים

הנויטרופילים הם חלק מאוכלוסיית תאי הדם הלבנים הנמצאים במחזור הדם. הנויטרופילים ידועים כבעלי תפקיד בקו הקדמי של מערכת החיסון המולדת. לנויטרופילים יש מספר רב של משימות מול מגוון רחב של מחלות (Hasler, Giaglis & Hahn, 2016). הנויטרופילים זהו לפני יותר מ-100 שנה, אולם הידע על אופן גיוסם למקומות זיהומים בגוף והאינטראקציה שלהם עם תאים אחרים במערכת החיסון, התרחב מאוד בשנים האחרונות, בין השאר בשל טכניקות מתפתחות המאפשרות תצפיות על נויטרופילים ברקמות (Nauseef & Borregaard, 2014). הנויטרופילים נוצרים במח העצם ואורך החיים שלהם במחזור הדם נמשך כמספר שעות עד לקצת יותר מיממה. הנויטרופילים הם סוג של תא המסווג למשפחת הגרנולוציטים (משפחת תאי דם לבנים במערכת החיסון). לגרנולוציטים (ובתוכם הנויטרופילים) אין יכולת לזהות זיהומים ספציפיים – הם תוקפים ללא אבחנה כל גוף זר באותה הדרך. הנויטרופילים משמידים חיידקים על ידי בליעתם בתהליך שנקרא פגוציטוזה (איור 1). באופן שוטף, הנויטרופילים נמצאים בזרם הדם, אך כשמתחילה דלקת, בייחוד דלקת כתוצאה מזיהום חיידקי

לדוגמה, הנויטרופילים הם אחד מהסייענים הראשונים שמגיעים לאזור, בתור התחלה דרך כלי הדם, ולאחר מכן דרך הרקמות ומספרם עולה בחדות. הנויטרופילים מהווים בין 40%-ל-70% מסך כל תאי הדם הלבנים, ריכוזם במצב נורמלי בדם נע בין 3,000 ל-7,000 תאים למיקרו ליטר, וירידה במספרם אל מתחת ל-1,000 מעלה את הסיכון לזיהומים (הפורטל לרפואה פרטית, ל.ת.; הקריה הרפואית רמב"ם, ל.ת.).



איור 1: נויטרופילים (בצהוב) בולעים חיידק (כתום) (Educalingo, n.d).

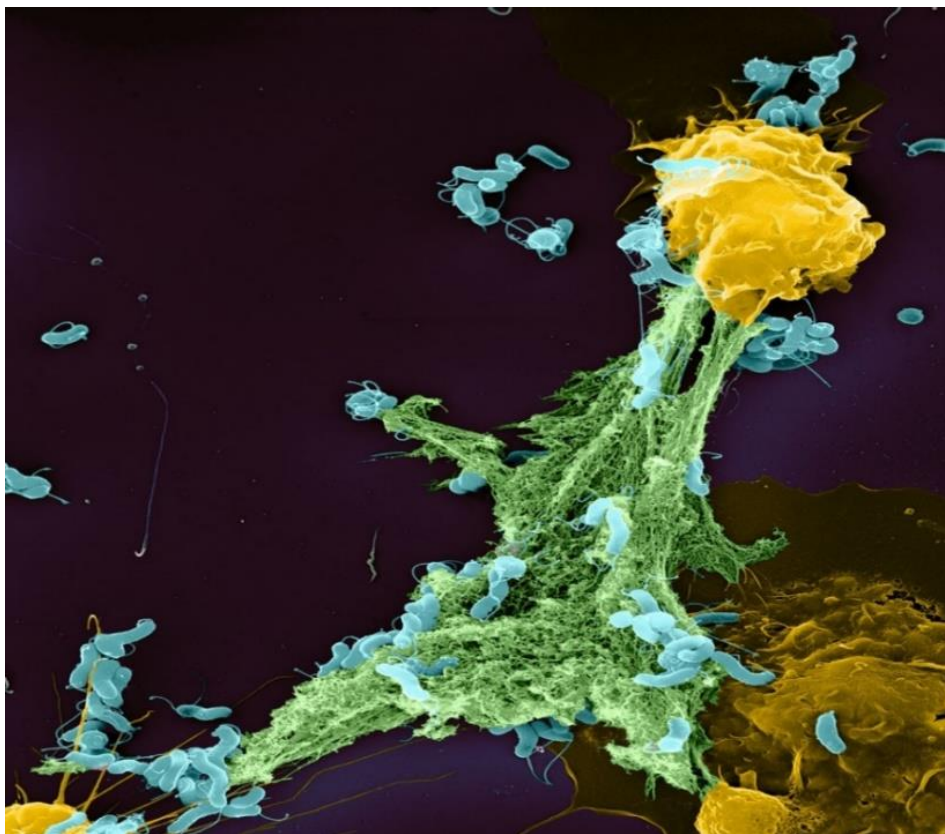
בנוסף לתהליך הפגוציטוזה נתגלה כי לנויטרופילים יש מנגנון להשמדת חיידקים נוסף וחדש, בו עבודה זו עוסקת. דרך זו התגלתה לפני זמן קצר יחסית, היא פועלת בעזרת שחרור אקטיבי של רשתות אקסטרצלולריות תאיות או בקיצור נטוזיס (NETosis-neutrophil extracellular traps) כנגד חיידקים בתהליך התאבדות (Wang et al, 2009).

### 2.3 נטוזיס.

מנגנון הנטוזיס המופעל על ידי נויטרופילים, התגלה לפני זמן קצר יחסית ומעורבותו הרבה בשלל מחלות, מעוררת עניין רב במחקר קליני ובסיסי גם יחד. תהליך זה מתרחש כאשר תא הנויטרופיל "יורה" בצורה אקטיבית רשתות אקסטרצלולריות תאיות לעבר מזהמים שונים. כיום מוגדר תהליך זה כסוג חדש של מוות תאי מתוכנן שבו התא יוצר רשתות, מחומרי התא שלו עצמו (ולכן ישנו מוות תאי) המיועדות לשמירה על הגוף והריגת הגורמים הזרים שנכנסים אליו (Wang et al, 2009). רשתות אלה עשויות מכרומוטין, חומר המצוי בגרעין התא ומכיל את תוכן ה-DNA הגנומי שעטוף בחלבונים ייחודיים

הנקראים היסטונים. כאשר נכנס גורם מחלה לגוף והנויטרופילים פועלים במסלול הנטוזיס, הכרומוטין נפתח ונפרס בצורה אקטיבית ויוצר רשתות דביקות המסוגלות לכלוא ולהרוג חיידקים ווירוסים (איור 2) (Wang et al, 2009; Infomed, n.d).

מחקרים אחרונים זיהו כי גם שלל תנאים פזיולוגיים שונים מסוגלים לגרות את הנויטרופילים לייצור רשתות נטוזיס גם ללא נוכחות פתוגניים ועלולים לגרום או להחמיר מחלות כמו סוכרת, זאבת, דלקות מפרקים ומעיים וכמובן סרטן (Mesa & Vasquez, 2013; Hasler, Giaglis & Hahn, 2016). למרות שלתהליך הנטוזיס יש תפקיד מגן חשוב מאוד בגופנו מפני פתוגניים, מחקרים אחרונים מראים כי אם התהליך זה מתרחש ללא בקרה בתוך כלי הדם, עלולים להתפתח מספר רב של סיכונים ומחלות אוטואימוניות כמו היווצרות נוגדנים עצמיים, קרישיות יתר, חסימות עורקים ועליה בסכנה להתרחשות באוטם שריר הלב ושבצים (Thålin et al, 2019). נראה כי לנושא מחקר זה עשויה להיות משמעות עצומה גם בעבור טיפולים בזיהומים שגובים את חייהם של אלפי אנשים כל שנה וגם בהתפתחות והחמרה של מחלות וגורמים סיכון למוות.



**איור 2: צילום של סריקת מיקרוסקופ אלקטרוניים המצלם רשתות נטוזיס (NETosis).** נויטרופילים (בצהוב) תוקפים חיידקים (בכחול) ויצרים רשתות אקסטרצלולריות (בירוק) (Thålin et al, 2019). הצילום במקור ללא צבע

## 2.4 זיהומים (Sepsis)

זיהומים הם אחד מגורמי המוות העיקריים בארצות הברית וסיבת המוות השכיחה ביותר בקרב חולים קשים ביחידות לטיפול נמרץ שאינן כליליות. דלקות בדרכי הנשימה, ובמיוחד דלקת ריאות - הם המקום הנפוץ ביותר לזיהום. מחקרים אחרונים מצביעים על כך שזיהומים חריפים מחמירים מחלות כרוניות קיימות או גורמים למחלות כרוניות חדשות, מה שמוביל לתוצאות כבדות משקל בטווח הארוך גם אצל אנשים שהחלימו ממחלות קשות (Mayr, Yende & Angus, 2014).

אלח דם (Sepsis), הינו מצב חרום רפואי, המתפתח בעקבות תגובה סוערת וקיצונית של הגוף לזיהום ועלול לגרום לנזק ברקמות, לכשל רב מערכתי ואף למוות. בשלבים המוקדמים של הזיהום ניתן לטעות באבחנה כאשר זיהוי וטיפול מוקדם עשוי להציל חיים. ארבעה סוגים עיקריים של זיהומים גורמים לרוב מקרי הספסיס הם זיהומי ריאות, דרכי השתן, עור ומעי (מרכז רפואי כרמל, 2016). אנשים עם מערכת חיסונית פגיעה יהיו חשופים יותר להידבקות במחלות זיהומיות, בין היתר חולים במחלות כרוניות או אוטואימוניות, חולים המטופלים בסטרואידים, חולי סרטן, מושתלי איברים וכיוצא באלו (מאוחדת, ל.ת). כפי שנאמר, ספסיס הוא מצב מסכן חיים ומתים ממנו עשרות אלפים כל שנה בארץ ובעולם ולכן אנו מתמקדים בו במחקר זה, בניסיון למצוא טיפול אפקטיבי המסייע לצמצום התמותה מאלח דם.

## 2.5 המערכת האנדוקנבינואידית

המערכת האנדוקנבינואידית היא מערכת העברת אותות, הקיימת בגופם של יונקים. מערכת זו, אחראית למגוון תפקודים בגוף כמו שינה, רעב, עיכול וכאב והיא מופעלת על ידי סדרה של מוליכים הנקראים אנדו-קנבינואידים ומקבוצה ספציפית של קולטנים (רצפטורים) שנמצאים בעיקר במערכת העצבים, במערכת החיסון והעיכול. הגוף מפריש באופן טבעי אנדו קנבינואידים אשר נקלטים בקולטנים אלו, ומעבירים מסרים עצביים ופיזיולוגיים שאחראים למגוון תפקודים בגוף כגון בקרת משק האינסולין, בקרת המערכת החיסונית, למידה מוטורית, תיאבון, תחושת כאב, מצב הרוח וזיכרון. האנדוקנבינואיד העיקרי בגוף האדם נקרא Anandamide והוא משפיע על מגוון תפקודים במערכת העצבים המרכזית וההיקפית (מדיקאן, ל.ת). בצמח הקנביס ישנם מרכיבים המכונים פיטו-נבינואידים (קנבינואידים המיוצרים בצמח באופן טבעי) המחקים את פעולתם של האנדוקנבינואידים. הפיטו-קנבינואידים העיקריים המיוצרים בצמח הקנאביס אותם זיהו כיום הם THC ו-CBD, ומהווים את החומרים הפעילים בקנאביס לשימוש רפואי, אך כאמור יש עוד מספר רב מאוד של קנאבינואידים נוספים (כיום זוהו קרוב ל-150). הקולטנים הראשיים במערכת האנדוקנבינואידית שלנו, שזוהו עד כה הם שני רצפטורים עיקריים לקנבינואידים הנקראים CB1 ו-CB2. הראשון (CB1) המתבטא בעיקר במוח ובמערכת העצבים, ומגיב לקנאבינואידים CBD ו-THC גם יחד. הרצפטור CB2, המתבטא במעי, במח העצם, בטחול ובעיקר בתאי מערכת החיסון, מגיב בעיקר לקנבינואידים CBD ו-CBN.

כיום הקנאביס מהווה תרופה ופתרון טוב להקלה בתסמינים של מגוון מחלות כמו סרטן סוכרת כאבים ראומטיים ואפילו פוסט טראומה (פארמוקן, ל.ת).

בשנים האחרונות התברר כי צריכת קנביס, משפיעה באופן ניכר גם על מרכיבי מערכת החיסון, מה שיכול להביא לפיתוח תרופות ומציאת פתרונות חדשניים במגוון מחלות. כעקרון נמצא כי לצריכת קנביס יש אפקט רגולטורי חזק ומדכא על מערכת החיסון וגורם בעיקר להחלשה ודיכוי של פעולות ותפקודים שונים של תאי המערכת החיסונית. יחד עם זאת, ההבנה כי ביטוי הקולטן CB2 נמצא בעיקר על תאי מערכת החיסון, מתבררת היום ההשפעה אנטי דלקתית של צריכת הקנביס. כיוון שקולטן מסוג CB2 נקשר בעיקר לקנבינואיד CBD שאינו בעל אפקטים פסיכו-אקטיביים, הוא מהווה מטרה אטרקטיבית לטיפול במחלות אוטואימוניות (קאנה טיים, 2020).

**שאלת המחקר:** האם הרצפטור לקנאביס CB2 מעורב בהגברת נטוזיס המושרה על ידי קנאביס.

**מטרת המחקר:** לבחון האם הרצפטור לקנבינואידים מסוג CB2 אחראי להגברת הנטוזיס המושרה על ידי קנאביס, והאם עיכוב הרצפטור CB2 לקנבינואידים יפחית או יבטל את תהליך הגברת הנטוזיס המתרחש לאחר הדגרה עם קנאביס.

**השערת המחקר:** כיוון שהרצפטור לקנבינואידים מסוג CB2 מתבטא על תאי מערכת החיסון בכלל ונויטרופילים בפרט עשויה להיות לו השפעה על תהליך הנטוזיס בתאי נויטרופילים. לכן הנחנו כי הרצפטור CB2 מעורב בתהליך הגברת הנטוזיס והרג החיידקים בנויטרופילים. אם יעוכב הוא עלול לבטל את תהליך הנטוזיס המוגבר המושרה על ידי תמציות קנביס (על בסיס ידע קודם המראה שקנאביס גורם להגברת נטוזיס). בנוסף, על פי ידע קודם יש קשר הדוק בין הרצפטור CB2 לחומר CBD ולכן הוספנו לכמה מהדוגמאות את החומר CBD, הנחנו כי הוספת CBD לנויטרופילים עשויה להגביר נטוזיס במידה שהרצפטור מסוג CB2 אכן שותף בתהליך.

### **3. שיטות וחומרים**

#### **3.1 לקיחת דמים מתורמים בריאים**

נלקחו דמים משלושה תורמים בריאים בעזרת לוקח דם מקצועי בבית החולים העמק בעפולה. הדם נלקח במבחנות EDTA בכדי לעכב את קרישת הדם בדוגמה. נלקחו 3 עד 5 מ"ל דם מכל תורם בריא.

#### **3.2 הפקת תאי נויטרופילים**

**מטרת השיטה-** בידוד הנויטרופילים מדגימות הדם.



**עקרון השיטה-** תאי הנויטרופילים יבודדו מדוגמאות דם מלא בשיטת הסלקציה השלילית ( negative selection). בשיטה זו נבודד את תאי הנויטרופילים על ידי קשירת כל מרכיבי הדם האחרים מלבד תאי הנויטרופילים. החומרים השונים נדבקים למגנט לאחר שנקשרו לחרוזים מגנטיים (איור 3). בסיום התהליך, בתחתית המבחנה מתקבלים אך ורק תאי נויטרופילים מבודדים שאיתם ניתן לעבוד. שיטה זו היא חדשנית יחסית והעיקרון שבו השיטה הזו עובדת הוא הפוך מהעיקרון שהיה נהוג עד לא מזמן (סלקציה חיובית) בו היו קושרים את תאי הנויטרופילים לבידים המגנטיים ומדביקים רק אותם אל המגנט, במחקר זה לא נעשה שימוש בשיטה זו כיוון שהיא פחות אפקטיבית וגורמת לאיקטוב תאי מערכת החיסון.

**מהלך השיטה-** הוכנסו לתוך שלוש המבחנות עם הדם בידיים מגנטיים ונוגדנים של חברת Stem-cell הנקשרים לכל מרכיבי הדם למעט נויטרופילים (לכל מרכיב בדם שהיה צריך להיקשר, היו נוגדנים ספציפיים שנקשרו אליו וכאשר חוברו לבידים המגנטיים נדבקו למגנט ואיתם גם מרכיבי הדם הלא רצויים). המבחנות הונחו באינקובציה, בטמפרטורת החדר לחמש דקות בתוך סטנד קיט- magnet של חברת EsaySep (איור 3). פעולה זו חזרה על עצמה שלוש פעמים ובסופה התקבלו נויטרופילים נקיים.



**איור 3:** stand kit magnet של חברת EasySep, (התמונה צולמה במהלך הניסויים שביצענו בתאריך 1/4/2020 במעבדה של ד"ר עידן כהן בבית חולים העמק בעפולה). ניתן לראות את הבידים המגנטיים בלבד בעמודה השלישית ואת מרכיבי הדם שהופרדו ונדבקו לדופן בשתי העמודות הסמוכות לה. נוזל הדם הצהבהב (סרום) מכיל בשלב זה רק נויטרופילים מבודדים.

### 3.3 טיפול בנויטרופילים

**מטרת השיטה-** לאפשר לנויטרופילים לחיות זמן ממושך בדומה לזמן חייהם במחזור הדם.

**עקרון השיטה-** מדיום הגידול אותו מכינים לנויטרופילים, מדמה את סביבת ה"חיים" הטבעית של הנויטרופילים. הנויטרופילים הם תאים שלא מתחלקים (מתרבים) וכדי שיתאפשר שימוש בהם לטובת הניסוי, יש ליצור להם סביבה שדומה לסביבה התוך גופית שבה הם נמצאים במצב רגיל. מדיום הגידול מאפשר להם את הסביבה האידיאלית בה הם יוכלו להתקיים כמו שצריך בשביל הניסוי. בנוסף, לנויטרופילים ותאים מסוג זה יש נטייה להידבק למשטחים ולכן הודגרו לאחר הטיפול לזמן נוסף על מנת שיידבקו לתחתית הבארית.

**מהלך השיטה-** מכינים את מדיום הגידול כך שיכיל 2% Fetal Calf Serum ואנטיביוטיקה ב- 100 מיקרוליטר ובריכוז סופי של 150,000 תאים לכל בארית, בשלוש חזרות בהם זרענו נוטרופילים. לאחר מכן, התאים הוכנסו לכעשרים עד שלושים דקות נוספות לאינקובטור לגידול תאים בטמפרטורה של 37°C בריכוז מבוקר של פחמן דו חמצני שעומד על 5%, לאחר כעשרים עד שלושים דקות התאים נדבקו לתחתית הבארית והוצאו מהאינקובטור (נבדק במיקרוסקופ אור).

### 3.4 בדיקת השפעת תמצית קנאביס על הנויטרופילים.

**מטרת השיטה-** לוודא לפני תחילת הניסוי כי תמצית הקנאביס אכן מגבירה נטוזיס כפי שנמצא במעבדה לפנינו.

**מהלך השיטה-** השיטה בוצעה בחמישה טיפולים שונים, כאשר לכל טיפול שלוש חזרות- ביולוגיות שונות לכל טיפול. בדוגמה הראשונה לא הוספו אי אלו חומרים נוספים לתאים (ביקורת שלילית). בטיפול השני הוספנו רק את החומר PMA (phorbol 12- myristate 13-acetate) המדמה נוכחות חיידקים ומהווה ביקורת חיובית. בטיפול השלישי הוספה למדיום הגידול עם הנויטרופילים תמצית קנביס מסוג 2574 יחד עם PMA (מבחנת הניסוי עצמו) עם או בלי מעכב תחרותי של הרצפטור CB2. לחלופין בדוגמה החמישית הוספנו את הקנבינואיד CBD שאמור לאקטב את הרצפטור CB2 ובעצם להחליף את השימוש בתמצית קנביס מלאה (במידה והוא אכן הגורם המאקטב) יחד עם PMA.

### 3.5 הוספת מעכב תחרותי למדיום הגידול

**מטרת השיטה-** לעכב את הרצפטור CB2 הנמצא בנויטרופילים על ידי מעכב תחרותי, כדי לבדוק האם רצפטור זה מושפע מתמצית הקנאביס שתוסף בהמשך למדיום הגידול עם הנויטרופילים.

**עקרון השיטה-** מעכב תחרותי נקשר לרצפטור לו הוא מיועד ולא מאפשר לו לבצע את תפקידו כמו במצב רגיל. כדי לבדוק האם רצפטור מסוים שותף בתהליך או מושפע מחומר כלשהוא, מעכבים את הרצפטור שרוצים לבדוק ובודקים האם חל שינוי בתהליך בו חושבים שהרצפטור מעורב. אם חל שינוי סימן שהרצפטור שמעוכב מעורב בתהליך, כי בלעדיו התהליך היה שונה, אם לא חל שינוי בתהליך, סימן שהרצפטור הנבדק לא קשור לתהליך כיוון שאיתו או בלעדיו, התהליך היה זהה.

**מהלך השיטה-** הוסף למדיום הגידול המעכב התחרותי SR144528 בריכוז של 1 μM/ml, לאחר מכן הודגרו התאים למשך שלושים דקות נוספות באינקובטור בטמפ' של 37°C בנוכחות של 5%

CO<sub>2</sub>. שלב ההדגרה יאפשר למעבד להקשר ולחסום את הרצפטור ולא יאפשר למולקולות הרלוונטיות בתמצית הקנביס שתוסף בהמשך, לשפעל את התאים במידה והם משופעלים דרך רצפטור רלוונטי זה. לאחר מכן הוספנו לתאים את תמצית הקנביס יחד עם PMA לצורך שיפעול תהליך הנתוזיס והדגרנו כ- 4 שעות.

### 3.6. הוספת CBD

**מטרת השיטה-** לבדוק האם CBD כמרכיב המצוי בקנביס משפעל את תהליך הגברת הנתוזיס. שיטה זו היא אינה המשך רציף של הניסוי אלא שיטת בדיקה נוספת שהתבצעה בכדי לנסות ולאמת את התוצאות ולגלות האם CBD בצורה ישירה או עקיפה(דרך הרצפטור או ישירות בדיפוזיה) אחראי לנתוזיס המוגבר.

**עקרון השיטה-** אנו יודעים מהספרות שיש קשר בין החומר CBD לבין הרצפטור CB2. קנבינואיד זה נקשר ל רצפטור - CB2, ולכן אנחנו הוספנו את הקנבינואיד לדוגמאות עם הנויטרופילים בכדי לבדוק האם הנתוזיס יוגבר (לא על ידי חסימה של הרצפטור כפי שמתואר בשלב הקודם, אלא על ידי קישור חומר לרצפטור, בדיקה על דרך החיוב).

**מהלך השיטה-** CBD הוסף למבחנות חדשות עם הנויטרופילים בשלוש כמויות שונות (0.1, 0.5, 1 ml) בנוסף לחומר PMA. לכל טיפול בוצעו שלוש חזרות ביולוגיות שונות (משלושה תורמים שונים), לאחר מכן המבחנות הונחו בטמפרטורת החדר למשך שעה לטובת היקשרות של החומר לרצפטור (לשלב זה גם התבצעה ביקורת בכלי נוסף שהכיל גם תמצית קנביס כדי להראות את הפער או הדמיון בכלים עם ה-CBD לנתוזיס מוגבר המתבצע ע"י קנביס).

### 3.7 כימות הנתוזיס

**מטרת השיטה-** מדידה של כמות ה-DNA החוץ תאי במדיום הגידול העליון (ללא נוכחות תאים) בכדי לכמת את רמת הנתוזיס.

**עיקרון השיטה-** חשוב להדגיש כי מכיוון שרק בתהליך הנתוזיס משוחרר ה-DNA של הנויטרופילים אל מחוץ לתא ניתן לכמת את ה-DNA החוץ תאי שיהווה מדד ישיר לעוצמתו של התהליך. החומר SYTOX green מייצר פלורסנציה (זוהר פי עשרת אלפים ממה שהוא במצבו הרגיל) כאשר הוא נקשר למולקולות DNA דו גדיליות חופשיות. לכן כאשר נפריד על ידי סירכוז את מדיום הגידול עם ה-DNA משברי התאים והנויטרופילים החיים, נוכל למדוד את ה-DNA החופשי במדיום על ידי SYTOX green. לאחר שנכמת את רמת הפלורסנציה, נוכל להשוות בין הדוגמאות ולכמת פי כמה עלתה כמות DNA החוץ תאית ונוכל להסיק מהי רמת הנתוזיס. חשוב להדגיש כי SYTOX green אינו מסוגל לחדור לתאים חיים או שלמים ולכן אין חשש שיצבע או ימדוד DNA מתכולת תאים שכאלה.

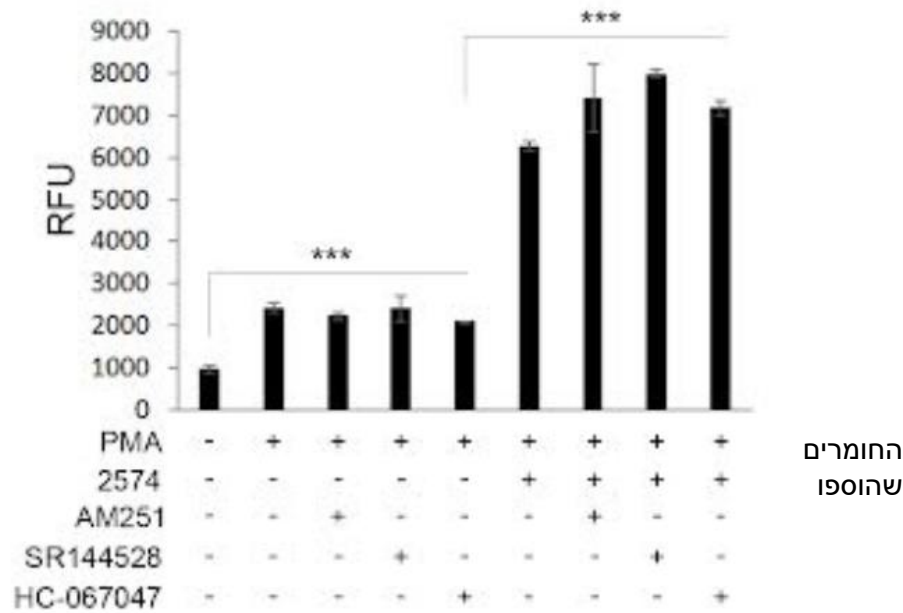
**מהלך השיטה-** בסיום תהליך הנתוזיס, הפלטה סורכזה על ידי צנטרפוגה למשך כחמש דקות ב 4000 RPM בכדי להפריד בין תאים שלמים ושברי תאים גדולים למדיום הגידול בכדי שנוכל לבדוק את מדיום הגידול בלבד ללא תאי נויטרופילים (שלמים או שבורים). מדיום הגידול עם מולקולות DNA חופשיות

נאסף בפלטה חדשה אליה הוסף SYTOX green 50 nM. הבדיקה של כמות ה-DNA לאחר הוספת ה-SYTOX green התבצעה בעזרת מכשיר ELISA שבודק פלורסנציה, 504 excitation, 523 emission והתוצאות הוצגו ב-RFU – Relative Fluorescence Unit. מכשיר זה בודק פלורסנציה ומציג אותה במספר (יחידות יחסיות), כך שכלל שהפלורסנציה תהיה גבוהה יותר, סימן שהיו יותר מולקולות DNA חופשיות שה-SYTOX green – נקשר אליהן וזהר מה שמעיד על יותר נטוזיס.

## 4. תוצאות

### 4.1 בדיקת השפעת תמצית הקנאביס 2574 מעורבותו של הרצפטור לקנבינואידים CB2 על הגברת הנטוזיס

ידוע לנו מניסויים קודמים שתמציות קנאביס מסוג 2574 מגבירה את הנטוזיס. ולכן בשלב הראשון נבדקה ההשפעה של תמצית הקנאביס 2574 על רמת הנטוזיס בתאי נויטרופילים. בשלושה טיפולים שונים אשר לכל טיפול התבצעו שלוש חזרות. בדוגמה אחת לא הוכנסו חומרים כלל (קבוצת הביקורת השלילית) – נמצא כי בדוגמה זו נמדדה כמות DNA של קצת פחות מ-1000 יחידות יחסיות. בדוגמת ביקורת שלילית נוספת המכילה דוגמאות מאותם תורמים הוספנו PMA (המדמה נוכחות חיידקים כביקורת חיובית) או יחד עם המעכב כביקורת שלילית נוספת בכדי לוודא שלמעכב עצמו אין כל השפעה על התהליך. בדוגמאות אלו נמדדו כ-3000 יחידות פלורסנציה יחסיות. בסט הדוגמאות השלישי הוספו PMA יחד עם תמצית קנאביס 2574 (כביקורת חיובית נוספת להראות שקנאביס מגביר נטוזיס) – בדוגמה זו נמדדה רמת נטוזיס של קרוב ל-7000 יחידות יחסיות (איור 4). לבסוף בדקנו האם הרצפטור לקנבינואידים CB2 מעורב בתהליך הגברת הנטוזיס. בשלב זה בדקנו שוב שלוש דוגמאות נויטרופילים שנלקחו מאותם תורמים והוספנו את החומרים: PMA + תמצית הקנאביס 2574 + המעכב התחרותי SR 144528 לרצפטור CB2. את מעכב הרצפטור שמנו מכיוון שאנו רוצים לבחון האם הרצפטור שותף בתהליך הגברת הנטוזיס או לא ולכן אם נגרום לחסימת הרצפטור ולאחר מכן נוסיף את תמצית הקנאביס (שמגבירה נטוזיס לפי התוצאות בתחילת הפסקה) נוכל לראות האם הרצפטור שותף או לא – האם התוצאות השתנו איתו ובלעדיו. נמצא כי רמת הנטוזיס שנמדדה בדוגמאות עם או בלי המעכב התחרותי, היו יחסית זהות ועמדו על קצת יותר מ-7000 (איור 4).

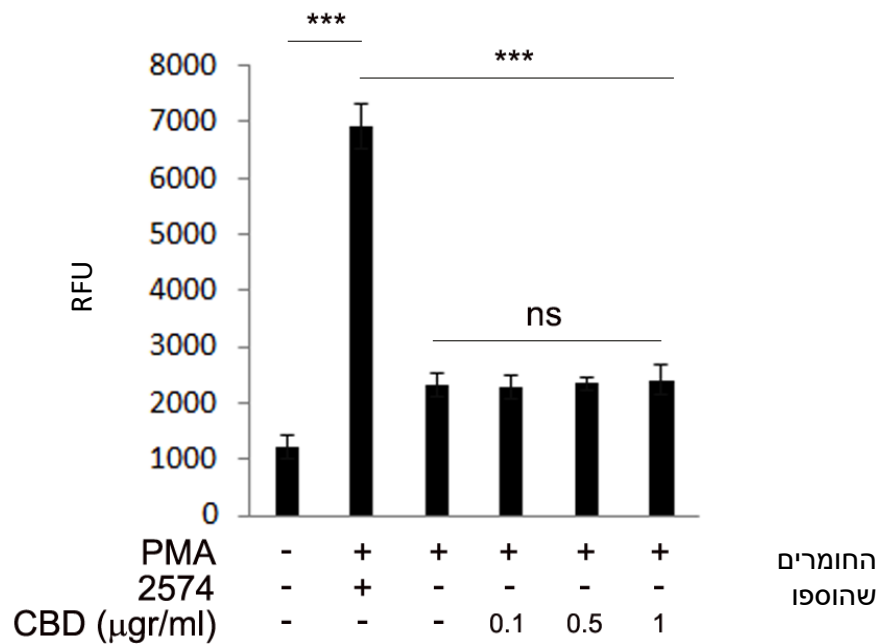


**איור 4: השפעת מעכבי רצפטורים למערכת הקנבינואידית על רשתות נויטרופיליות אקסטרצלולריות.** בניסוי השתמשנו בחומרים PMA, תמצית קנביס 2574, ו-SR144528 בלבד, כל עמודה מייצגת ממוצע של ניסויים משלושה תורמים, כולל סטיית תקן וסימוני ה+ וה- - מייצגים את החומרים שהופיעו/ לא הופיעו בכלי: תחת כל עמודה מסומן בקו אופקי לאחד החומרים סימן +/-, אם סומן הסימן +, הכלי מכיל את החומר. אם סומן -, הכלי אינו מכיל את החומר. ציר ה-Y מסמל את רמת הנטוזיס היחסי כתלות ב-DNA חוץ תאי שנמדד בעזרת Sytox green (ביחידות RFU) וציר ה-X את החומרים שהיו/ לא היו בכלי.

#### 4.2 בדיקת מעורבות CBD בהגברת הנטוזיס על ידי קנאביס

כיוון ש-CBD מגיב (אגוניסט) עם הרצפטור מסוג CB2 בדקנו בניסוי נוסף בגישה אחרת ובו ניסינו לחסום את הרצפטור. בניסוי זה, בשונה מהניסוי הקודם, ניסינו לאקטב את הרצפטור על ידי הוספת CBD טהור כתחליף לנוכחות קנביס. ההנחה שלנו הייתה שאם הרצפטור CB2 אכן מעורב במנגנון הגברת הקנאביס אז גם הוספה של החומר CBD (שמגיב איתנו היטב) תגרום לתהליך הנטוזיס להתגבר בדומה לשימוש בתמצית של זן 2574.

כמו בשלב הקודם, גם כאן ביצענו ביקורות חיוביות ושליליות כאשר לשאר הדוגמאות הוספנו גם CBD בריכוזים עולים במקום תמציות קנביס. נמצא כי בקבוצת הביקורת רמת הנטוזיס הייתה קצת יותר מ-1000 יחידות יחסיות, בכלי שהכיל PMA רמת הנטוזיס הייתה קצת יותר מ-2000 יחידות יחסיות ובשלושת הכלים הבאים שהכילו PMA ו-CBD בריכוזים שונים רמת הנטוזיס הייתה כמעט זהה (קצת יותר מ-2000), בדומה לרמת הנטוזיס כאשר הדוגמה הכילה רק PMA (איור 5).



**איור 5: השפעת CBD טהור על תהליך הנטוזיס.** בשלב זה של הניסוי הייתה נוכחות של שני חומרים: PMA ו-CBD (תמצית הקנאביס 2574 הייתה רק כביקורת לנטוזיס מוגבר). תחת כל עמודה מסומן בקו אופקי לאחד החומרים סימן +/-, אם סומן הסימן +, הכלי מכיל את החומר. אם סומן -, הכלי אינו מכיל את החומר. ציר ה-Y מסמל את רמת הנטוזיס היחסי כתלות ב-DNA חוץ תאי שנמדד בעזרת Sytox green (ביחידות RFU).

## 5. דיון ומסקנות

זיהומים מהווים את גורמי המוות העיקריים בארצות הברית וסיבת המוות השכיחה ביותר בקרב חולים קשים ביחידות לטיפול נמרץ שאינן כלליות. דלקות בדרכי הנשימה, ובמיוחד דלקת ריאות הם המקום הנפוץ ביותר לזיהום. מחקרים אחרונים מצביעים על כך שזיהומים חריפים מחמירים מחלות כרוניות קיימות או גורמים למחלות כרוניות חדשות, מה שמוביל לתוצאות כבדות משקל בטווח הארוך גם אצל מחלימים ממחלות קשות (Mayr, Yende & Angus, 2014).

לאחרונה התגלתה דרך חדשה שלא הייתה ידועה למדע קודם לכן, שבה תאי דם לבנים מסוג נוטרופילים פועלים להשמדת גורמים זרים הנכנסים לגוף, והיא מעוררת עניין רב בשל חשיבותה וחוסר המידע המספק שיש עליה. השיטה החדשה עובדת בעזרת רשתות אקסטרצלולריות תאיות או בקיצור נטוזיס (NETosis-neutrophil extracellular traps). כיום מוגדר תהליך זה כסוג חדש של מוות תאי מתוכנן שבו התא מתפוצץ ויוצר רשתות המיועדות לשמירה על הגוף והריגת הגורמים הזרים שנכנסים אליו (Wang et al, 2009).

במחקרים קודמים התגלה כי לתמציות קנאביס שונות יש השפעה על תהליך הנטוזיס, למעשה התגלה שקנאביס יכול לגרום גם להכפלת עוצמתו של הנטוזיס, מה שבעצם גורם להכפלת הרג החיידקים על ידי הנויטרופילים, ולכך יכולה להיות משמעות רפואית רבה לטיפול בחולים הנפגעים מזיהומים, בדגש על זיהומים שעמידים לאנטיביוטיקה. המחקר שלנו עוסק בתהליך זה בגלל המשמעות שיש לו לטיפולים בזיהומים, בניסיון לספק טיפול טוב יותר לחולים הנפגעים מזיהומים ולחולים מדוכאי מערכת חיסונית (כדוגמת חולי סרטן- המשתמשים העיקריים בקנביס כיום בארץ).

למרות שלתהליך הנטוזיס יש תפקיד מגן חשוב מאוד בגופנו מפני פתוגניים, מחקרים אחרונים מראים כי אם התהליך זה מתרחש ללא בקרה בתוך כלי הדם, עלולים להתפתח מספר רב של סיכונים. אחת הבעיות היא קרישיות יתר (טרומבוזיס) (Thålin et al, 2019). ישנם מספר מצבים הגורמים להיווצרותם של קרישי דם: ירידה בזרימת הדם, נזק לדופן כלי הדם ועלייה בקרישיות הדם (כללית, 2018). כמו שנכתב, נטוזיס מוגבר גורם לעלייה בקרישיות הדם וזה יכול לגרום לקרישי דם שיובילו בסופו של דבר לפקקת (טרומבוזיס).

כ-45 אלף ישראלים סובלים מקרישי דם בכל שנה ורק מיעוט מהם סובל מסימנים מוקדמים ומאובחן בזמן (כללית, 2018), לפי הנתונים, טרומבוזיס הוא מצב מסכן חיים ולכן חשוב מאוד למנוע גם מצב של "יתר" נטוזיס.

בעבודה זו נכתב על החשיבות של גילוי המנגנון דרכו ניתן להגביר נטוזיס בעזרת קנאביס אצל אנשים הזקוקים לכך כדי לנצח זיהומים וגורמים זרים הנכנסים אליהם אל הגוף ומאיימים על חייהם אבל חשוב לא פחות מכך לדאוג שלא ייווצר אצל חולים אלו נטוזיס יתר שיגרום לטרומבוזיס שיסכן אותם ויקטין את סיכוייהם לשרוד.

האוכלוסייה שמטופלת בקנאביס בצורה הרבה ביותר היא אוכלוסיית חולי הסרטן ולכן בזכות שימוש כרוני בקנאביס מקל מאוד על תסמיני המחלה והטיפול. מצד שני שימוש בקנביס שעלול להוביל ליצירת טרומבוזות מסכן מאוד את חייהם של החולים. כשלוש חודשים בחשבון כי סיבת המוות העיקרית והשניה בשכיחותה אצל חולי סרטן, מלבד המחלה עצמה, היא היווצרות של טרומבוזות כתוצאה מהמחלה עצמה ובעיקר מהטיפול האנטי סרטני, לעבודה זו חשיבות רבה בהבנה והתאמה של זני קנביס שלא יסכנו את החולים.

במחקר זה נבדק הקשר בין הרצפטור CB2 לתהליך הגברת הנטוזיס על ידי תמצית הקנאביס מזן 2574. ההשערה שלנו הייתה שהרצפטור CB2 עשוי להיות מעורב בתהליך הגברת הנטוזיס על ידי הקנאביס. השערה זו התבססה על ידע קודם על כך שהרצפטור CB2 נמצא במקומות ומערכות שונות בגוף, בין השאר בנוכחות גבוהה במערכת החיסון ולכן הנחנו שעשויה להיות לו השפעה על תהליך הנטוזיס (פארמוקן, ל.ת).

בשונה מההשערה, ממצאי המחקר הראו כי הרצפטור אינו שותף בתהליך הגברת הנטוזיס- המושרה מקנביס. התוצאות ללא עיכוב הרצפטור ועם עיכובו היו מאוד דומות ובשיטה השנייה, כך גם החומר CBD שנקשר לרצפטור ובלעדיו התוצאות היו דומות מאוד, מה שמראה באופן ישיר על חוסר מעורבותם בתהליך. שימוש בתמצית הקנאביס 2574, בה ככל הנראה מעורב רצפטור או קנבינואיד אחר אותו כדאי לגלות במחקרים המשכיים.

את מעורבותו של הרצפטור CB2 בתהליך הנטוזיס בדקנו בכמה גישות - בדקנו בניסוי האם חסימת הרצפטור על ידי המעכב SR144528 מביא לפגיעה או הפחתה בתהליך. נקטנו גישה אחרת ואיקטבנו את הרצפטור בעזרת הקנבינואיד הפעיל CBD שנקשר אליו. בשתי השיטות נראה כי גם הרצפטור בצורה ישירה וגם CBD בצורה ישירה או עקיפה אינם שותפים בהפעלת מנגנון הנטוזיס המוגבר על ידי קנביס.

לממצאי המחקר שלנו יכולות להיות השלכות על הבנה טובה יותר של מנגנוני הגוף ובדגש על מערכת החיסון, אנו שואפים לדעת בצורה מיטבית איך עובדות מערכות הגוף והתהליכים המתרחשים בהן, ולכן יש לנו מוטיבציה רבה לעשות מחקרים מסוג זה. אמנם בשלב זה, לא מצאנו את הרצפטור או את המנגנון המעורב בתהליך שחקרנו אך מחקרנו, במקביל עם העבודה הנוספת שנעשתה במעבדה, מצביע כנראה על קיום מנגנון נטוזיס חדש לחלוטין שעובד בכיוון שונה ממה שחקרנו עד עתה, ויתכן שיתגלה בעזרת הקנביס מנגנון נטוזיס חדש לחלוטין ולא ידוע שאינו תלוי כמובן ברצפטורים CB1/2 ולא בקנבינואידים הידועים והנחקרים THC/CBD.

חשוב לציין כי המנגנון דרכו מתרחש תהליך הגברת הנטוזיס לא חייב לעבור בהכרח דרך רצפטורים, הוא יכול להיות דרך מסלולים נוספים שאינם ידועים לנו כרגע כמו דיפוזיה ישירה דרך טרנספורטרים או תעלות ייחודיות או באופן פסיבי. בעקבות שלילת הרצפטורים הידועים לנו עד כה, מתגברת ההשערה שמנגנון זה פועל אולי דרך סוכרים או חומצות שומן הנמצאים בתמצית הקנאביס ולא כפי ששיערנו בהתחלה - דרך רצפטורים לקנבינואידים. אמליץ להמשיך לחקור את כל הרצפטורים היכולים להיות קשורים ובמקביל מסלולים שונים שיכולים להיות קשורים ובדרך שלילה זו יתקרב הגילוי של המנגנון שכן מעורב בתהליך וכך נוכל בעתיד להתאים תרופות וטיפולים נכונים יותר וחסרי סיכונים למגוון החולים הרחב שצורך קנביס רפואי.



## 6. ביבליוגרפיה

איחוד הצלה. (ל"ת). מערכת חיסון. אוחר בתאריך 28/1/2021, מתוך :  
<https://1221.org.il/%D7%9E%D7%A2%D7%A8%D7%9B%D7%AA-%D7%97%D7%99%D7%A1%D7%95%D7%9F/>

אימונולוגיה. (ל.ת). מערכת החיסון המולדת. אוחר בתאריך 28/1/2021, מתוך :  
<https://www.immunology.org.il/08/mecrct-hison-moldet/>.

גבעון, ש', מנחם נ'. (2018). קרישי דם: מתחילים ברגליים ועלולים להיסחף לריאות. כללית. אוחר בתאריך 8/12/2021 מתוך: [https://www.clalit.co.il/he/your\\_health/family/Pages/dvt.aspx](https://www.clalit.co.il/he/your_health/family/Pages/dvt.aspx)

הפורטל לרפואה פרטית. (ל.ת). נוטרופילים: פענוח בדיקות/תוצאות בדיקות רפואיות מעבדה. אוחר בתאריך: 28/1/2021, מתוך:  
<https://www.beok.co.il/exc/14/>

הקריה הרפואית רמב"ם. (ל.ת). נוגדנים כנגד נוטרופילים Neutrophils. אוחר בתאריך 28/1/2021, מתוך:

<https://www.rambam.org.il/?catid=%7B334c3c3c-1eed-4c76-8f1d-ea2e5ee71a1b%7D>

וולף, י'. (2018). המנצחים על התזמורת החיסונית. מכון דוידסון. אוחר בתאריך 28/1/2021, מתוך :

<https://davidson.weizmann.ac.il/online/sciencepanorama/%D7%94%D7%9E%D7%A0%D7%A6%D7%97%D7%99%D7%9D-%D7%A2%D7%9C-%D7%94%D7%AA%D7%96%D7%9E%D7%95%D7%A8%D7%AA-%D7%94%D7%97%D7%99%D7%A1%D7%95%D7%A0%D7%99%D7%AA>

מאוחדת. (ל.ת) זהירות זיהום. אוחר בתאריך 31/1/2021, מתוך:

<https://www.meuhedet.co.il/%D7%94%D7%9E%D7%93%D7%A8%D7%99%D7%9A-%D7%94%D7%A8%D7%A4%D7%95%D7%90%D7%99-%D7%A9%D7%9C-%D7%9E%D7%90%D7%95%D7%97%D7%93%D7%AA/%D7%96%D7%94%D7%99%D7%A8%D7%95%D7%AA-%D7%96%D7%99%D7%94%D7%95%D7%9D-%D7%9E%D7%94-%D7%97%D7%A9%D7%95%D7%91-%D7%9C%D7%93%D7%A2%D7%AA-%D7%A2%D7%9C-%D7%9E%D7%97%D7%9C%D7%95%D7%AA-%D7%96%D7%99%D7%94%D7%95%D7%9E%D7%99%D7%95%D7%AA>

מדיקאן. (ל.ת). קנאביס רפואי אוחר בתאריך 31/1/2021 מתוך:

<https://medican.co.il/%D7%94%D7%9E%D7%A2%D7%A8%D7%9B%D7%AA-%D7%94%D7%90%D7%A0%D7%93%D7%95%D7%A7%D7%A0%D7%91%D7%99%D7%A0%D7%95%D7%90%D7%99%D7%93%D7%99%D7%AA-%D7%95%D7%A7%D7%A0%D7%91%D7%99%D7%A0%D7%95%D7%90%D7%99%D7%93%D7%99>

מרכז רפואי כרמל. (2016). אלח דם (ספסיס) מהווה את אחד האתגרים הקשים ביותר למערכת

הבריאות. אוחר בתאריך 31/1/2021, מתוך: <https://hospitals.clalit.co.il/carmel/he/News-Articles/Pages/Fight-sepsis.aspx>

פארמוקן. (ל.ת). איך הקנאביס נקלט בגופנו. אוחר בתאריך 31/1/2021 מתוך:

<https://pharmacann.co.il/%D7%94%D7%9E%D7%A2%D7%A8%D7%9B%D7%AA-%D7%94%D7%90%D7%A0%D7%93%D7%95%D7%A7%D7%A0%D7%91%D7%99%D7%A0%D7%95%D7%90%D7%99%D7%93%D7%99%D7%AA>

קאנה טיים, (2020), קנאביס והמערכת החיסונית: מערכת מורכבת, אוחר בתאריך 14/5/2021

מתוך [קנאביס והמערכת החיסונית: פעולת איזון מורכבת - קאנה טיים \(cannatime.co.il\)](http://cannatime.co.il).

Błach-Olszewska, Z. (2005). Innate immunity: cells, receptors, and signaling pathways. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 53(3), 245-253. Received on 14/5/2021.

Educalingo. (n. d). Neutrophil. Received on 31/1/2021 from: <https://educalingo.com/en/dic-pl/neutrofile>

Hasler, P., Giaglis, S., & Hahn, S. (2016). Neutrophil extracellular traps in health and disease. *Swiss medical weekly*, 146(4142). Recived on 13/2/2021.

Infomed. (n.d). chromatin. Received on 25/7/2021 from: [המדריך - כרומטין \(chromatin\) | המלא | Infomed](#)

Mayr, F. B., Yende, S., & Angus, D. C. (2014). Epidemiology of severe sepsis. Recive on 28/1/2021. From: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/viru.27372>

Mesa, M. A., & Vasquez, G. (2013). NETosis. *Autoimmune diseases*, 2013. Received on 28/1/2021.

Nauseef, W. M., & Borregaard, N. (2014). Neutrophils at work. *Nature immunology*, 15(7), 602-611. Received on 28/1/2021.

Thålin, C., Hisada, Y., Lundström, S., Mackman, N., & Wallén, H. (2019). Neutrophil extracellular traps: villains and targets in arterial, venous, and cancer-associated thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 39(9), 1724-1738. Received on 13/5/2021.

Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., ... & Coonrod, S. A. (2009). Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *Journal of Cell Biology*, 184(2), 205-213. Received on 28/1/2021.

