

ישיבה תיכונית חיספין.

חיספין 240457

השפעת הרצפטור CB1 לאנדוקנבידואידים על הגברת הרג חיידיקים על ידי נויטרופילים בעזרת קנאביס.

תחום הדעת: ביולוגיה

מגיש: הראל אלון
מקום מגורים: עין הנצי"ב
תעודת זהות: 214667248
טלפון התלמיד: 054-4443897
הנחיה:
ד"ר עידן כהן
מקום עבודה: מרכז רפואי העמק
כתובת דוא"ל: harelalon2004@gmail.com
דניאל מובשוביץ, MSc.
מקום עבודה: גליליוס



העבודה נעשתה במסגרת גליליוס - השותפות האזורית להעשרה ומצוינות במדעים וטכנולוגיה

נובמבר 2021

תוכן עניינים

3	1. תקציר
4	2. סקירת ספרות
4	2.1 מערכת החיסון
4	2.2 נויטרופילים
5	2.3 זיהומים חיידקיים
5	2.4 נטוזיס
6	2.5 המערכת האנדוקרינואידית וקנביס
8	3. שיטות וחומרים
8	3.1 לקיחת דמים
8	3.2 הפקת נויטרופילים
10	3.3 טיפול בנויטרופילים
10	3.4 הוספת מעכב תחרותי למדיום הגידול
10	3.5 חשיפת התאים הנויטרופילים לתמצית הקנאביס
11	3.6 הוספת PMA
11	3.7 כימות פעילות הנטוזיס
12	4. תוצאות
14	5. דיון ומסקנות
16	6. ביבליוגרפיה

1. תקציר

זיהום או ספסיס הוא גורם המוות העיקרי בארצות הברית כאשר ידוע כי זיהומים חריפים עלולים להחמיר 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. לאחרונה התגלתה שיטה חדשה בה פועלים הנויטרופילים והיא מעוררת עניין רב. שיטה זו עובדת בעזרת רשתות אקסטראצלולריות תאיות או בקיצור נטוזיס (NETosis-neutrophil extracellular traps). מנגנון ביולוגי הנוצר על-ידי נויטרופילים ונתגלה בשנים האחרונות. עם הפעלתו של המנגנון, הנויטרופילים משחררים DNA ותת-קבוצה מתכולת הגרגירים שלהם ויוצרים מלכודות חוץ-תאיות נויטרופיליות (NET). מבני DNA אלו יחד עם החלבונים הנלווים אליהם או בקיצור כרומטין, יכולים ללכוד ולהרוג מגוון חיידקים. תפקיד הרשתות הוא לנטרל את הגורמים הזרים הנכנסים וכך להגן עליו.

במחקר זה בדקנו את ההשפעה של תמצית קנאביס 2574 על תהליך יצירת הנטוזיס בנויטרופילים שבודדו מדמם של תורמים בריאים. מטרת המחקר היא לבחון האם הרצפטור לקנבינואידים מסוג CB1 אחראי להגברת הנטוזיס והרג חיידקים המוגבר המושרה על ידי קנאביס, והאם עיכוב הרצפטור CB1 לקנבינואידים יפחית או ינטרל את תהליך הנטוזיס המתרחש לאחר הדגרה עם קנאביס.

במחקר זה נלקחו דמים מתורמים בריאים ומהם בודדו נויטרופילים בשיטת Negative selection. תאי הנויטרופילים המבודדים הודגרו עם תמצית קנאביס 2574 ומעכב תחרותי לרצפטור CB1 (כדי לבטל את פעילות הרצפטור לטובת הניסוי) או לחילופין הוסף החומר THC טהור. בסיום התהליך נמדדה כמות ה-DNA החוץ תאי שמהווה אינדיקציה מדויקת וישירה לרמת הנטוזיס שהתבצעה. כימות ה-DNA התבצעה בעזרת הוספת SYTOX green, חומר הנקשר באפיניות גבוהה ל-DNA וזורח בירוק רק לאחר ההיקשרות אך אינו מסוגל לחדור לתאים חיים. מידת הפלורסנציה נמדדה בעזרת מכשיר ELISA שבדק את מידת פליטת האור על ידי החומר באורכי גל , 504 excitation emission 523 . התוצאות הוצגו כ- RFU – Relative Fluorescence Unit.

תוצאות הניסוי הראו כי רמת הנטוזיס שהתבצעה בקבוצת הביקורת הייתה זהה (או בעלת סטייה קטנה וללא משמעות סטטיסטית) לרמת הנטוזיס בנויטרופילים שהוספה להם תמצית הקנאביס ושנחסם בהם הרצפטור CB1. בנוסף נראה כי המרכיב הפעיל בצמח הקנביס, THC, הוא אינו זה שמשפיע על תהליך הנטוזיס.

מסקנות אלו משאירות מספר שאלות פתוחות כגון: האם ואיזה רצפטור כן שותף בתהליך/ איך משופעל מנגנון התהליך, ואיזה חומר בקנביס אחראי לשפעולו. שאלות אלו צריכות להיחקר 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

תפקידה של מערכת החיסון הוא להגן עלינו מפני גורמים זרים התוקפים את גופנו (בנימין, 2020). המערכת יודעת למנוע, לאתר, להשמיד וליצור זיכרון חיסוני כנגד גופים זרים, כימיקלים ופתוגניים (Better health n.d). פעולתה מתבצעת תוך שילוב בין התגובה המולדת (Innate) לתגובה הנרכשת (adaptive) (גרטי, 2009) כשהמנגנון החיסוני מורכב מכמה שלבי הגנה. תחילה, ישנו מחסום פיזי הכולל את העור והגנות שונות על פתחי הגוף כמו שערות, ריסים וקרומים ריריים. מחסומים פיזיים אלו, מונעים את עיקר חדירות הפתוגניים. במקביל, בתוך הגוף, נמצא קו ההגנה השני בו פועלים תאי הדם הלבנים, אשר נמצאים בסיוור מתמיד אחר מחוללי מחלות.

במקרה של חדירת פתוגן זר לאיבר כלשהו או למערכת הדם, ראשונים מגויסים לאזור הזיהום תאי מערכת החיסון הלבנים בעיקר בעלי יכולת בולענות בתהליך הנקרא פגוציטוזה. בתהליך זה תאי הדם הלבנים הבולעניים כגון נויטרופילים ומאקרופאגים, "בולעים" את הפתוגנים והורגים אותם בעזרת תהליכים תוך תאיים. שלב ההגנה הנוסף מאוחר יותר הוא המערך החיסוני הנרכש. התאים העיקריים הפועלים בשלב זה הם תאים לבנים מסוג T ו-B. תפקידם של תאי לימפוציטים מסוג T הוא שמקובל לחלקם לשני סוגי תאים עיקריים מסוג T ו-B. תפקידם של תאי לימפוציטים מסוג T הוא לחפש תאי גוף מזוהמים ולהרוג אותם במהרה. בינתיים, תאי B ותאי T מסייעים, משתמשים במידע שנאסף מהאנטיגנים הייחודיים לכל פתוגן, כדי להתחיל לייצר חלבונים המכונים נוגדנים. תאי B יכולים לייצר מיליוני נוגדנים, הנעים בגוף ומתקפים פולשים עד שמרבית האיום מנוטרל (איחוד והצלה, ל"ת; גרטי, 2009; וולף, 2018; Khan Academy, n.d).

2.2 נויטרופילים

תאי הדם הלבנים (לויקוציטים) מחולקים לשלוש קבוצות של סוגי תאים: גרנולוציטים, לימפוציטים ומונוציטים. הקבוצה הגדולה ביותר היא הגרנולוציטים שלהם אין את היכולת לזהות זיהומים ספציפיים והם תוקפים ללא אבחנה כל גוף זר. וגם היא מתחלקת לשלושה סוגים של תאים: נויטרופילים, באזופילים ואאוזינופילים. הנויטרופילים זהו לפני יותר מ-100 שנה, אולם הידע על אופן גיוסם לאתרי זיהומים ואינטראקציה עם תאים אחרים במערכת החיסון התרחב מאוד בשנים האחרונות בשל טכניקות מתפתחות, המאפשרות תצפיות על נויטרופילים ברקמות. הנויטרופילים מיוצרים ומתמיינים לתאי נויטרופילים בוגרים במח העצם ומשתחררים למחזור הדם (Nauseef & Borregaard, 2014). מקובל להניח כי אורך חייהם של הנויטרופילים נע בין 8 לכ-24 שעות. הנויטרופילים הם הסוג הנפוץ ביותר של תאי דם לבנים במערכת החיסון ומהווים כ-40-70 אחוזים מכלל תאי הדם הלבנים בגופם של אנשים בריאים. תפקידם העיקרי של הנויטרופילים הוא להוות את קו ההגנה הראשוני כנגד פתוגנים שונים ולטפל בזיהומים המעורבים חיידקים ווירוסים (הקריה הרפואית רמב"ם, ל.ת).

הנויטרופילים נמצאים בדם באופן קבוע, אך בעת דלקת אקוטית, בייחוד כתוצאה מזיהום חיידקי, מתרחשת עלייה משמעותית במספרם (נויטרופיליה) תוך כמה שעות. כמון כן ריכוז הנויטרופילים בדם גם יכול לרדת משמעותית (נויטרופניה) בעקבות שימוש בתרופות מסוימות, תהליכים סרטניים-חיידקיים ובעיות בתהליך היצור שלהם. הנויטרופילים הם אלו שמגיעים ראשונים לאזור

הזיהום והם מתחילים את התגובה הדלקתית- הם מפרישים חומרים הקוראים לתאי מערכת החיסון הנוספים להגיע לאזור המזוהם. מצד אחד, מספר נמוך של נויטרופילים (נוטרופניה) מעלה מאוד את הסיכוי לחלות ולמות מזיהומים כאשר מהצד השני, פעילות יתר של נויטרופילים עלולה לגרום נזק רב לרקמות ואיברים באזורי דלקת (פלורנטין, 2011; הקריה הרפואית רמב"ם, ל.ת.; ליס, 2017).

2.3 זיהומים חיידקיים

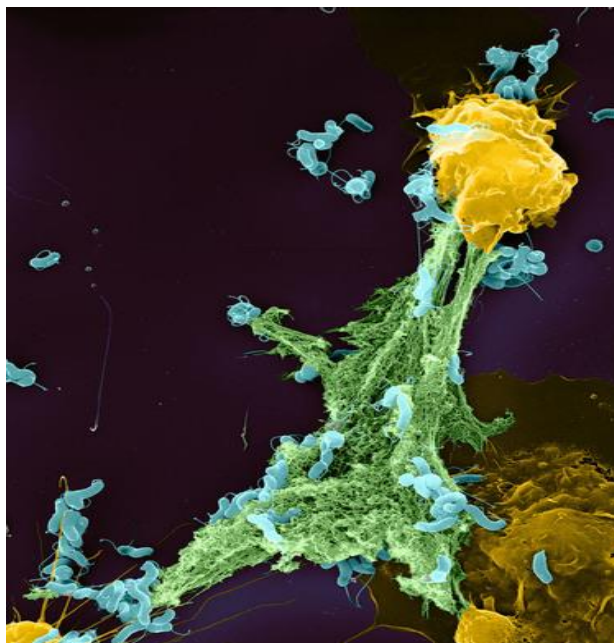
זיהום חיידקי הוא זיהום הנגרם על ידי חיידקים פתוגניים החודרים לגוף. התגובה החיסונית גורמת לתגובה דלקתית המתבטאת בחום, כאבי שרירים, חולשה, בנפיחות ובאבדן תיאבון. כיום ניתן לטפל בזיהומים חיידקיים באמצעות אנטיביוטיקה (מכבי, ל.ת.; מאוחדת, ל.ת.). אלח דם (או Sepsis) הוא מצב מסכן חיים שנגרם בעקבות תגובת יתר של מערכת החיסון של הגוף כתוצאה מזיהום. זיהוי מוקדם של מקרי ספסיס מאפשר התערבויות, כגון אנטיביוטיקה ועירוי נוזלים (O'Brien Jr et al., 2007). כיום אלח דם הוא אחד מגורמי התמותה מרכזיים בעולם על פי ניתוח נתונים שבוצע במרכז הארצי למניעת זיהומים ועמידות לאנטיביוטיקה במשרד הבריאות. לאחרונה דווח כי מספר מקרי התמותה מזיהומים נרכשים (זיהומים בהם נדבקים מטופלים במהלך שהותם בבית החולים) בבתי החולים הכלליים עומד על כ-4000 ל-6000 מקרים בשנה בישראל לפני הקורונה והוא סיבת המוות השלישית אחרי סרטן ומחלות לב (איגוד רופאי בריאות הציבור בישראל, 2020). בארצות הברית ישנם כ-750,000 מקרים של אלח דם בשנה, שהם כ-2% מכלל האישפוזים. הטיפול בחולים אלה, מביא לעלויות גדולות לבתי החולים העולות על 16 מיליארד דולר (O'Brien et al., 2007).

2.4 נטוזיס

הנטוזיס או מלכודות אקסטרצלולריות תאיות, הוא מנגנון ביולוגי הנוצר על-ידי נויטרופילים ונתגלה בשנים האחרונות. עם הפעלתו של המנגנון, הנויטרופילים משחררים DNA ותת-קבוצה מתכולת הגרגירים שלהם ויוצרים מלכודות חוץ-תאיות נויטרופיליות (NET). מבני DNA אלו יחד עם החלבונים הנלווים אליהם או בקיצור כרומטין, יכולים ללכוד ולהרוג מגוון חיידקים (איור 1) (Matoszka et al, 2012). תהליך זה חשוב על מנת לשלוט בזיהומים חוץ-תאיים (זיהומים חיידקיים, פטרייתיים ונגיפיים) שיכולים לגרום נזק לגוף (Mesa & Vasquez, 2013) ומהווה מנגנון נוסף ומקביל ליכולת הבליעה של תאים אלה.

לנטוזיס יש שתי צורות פעולה: התאבדותית – המאופיינת במוות של תא הנויטרופיל לאחר שחרור הרשת. והחיונית – בה התא נותר חי. תהליך זה נצפה במגוון רחב של תגובות כנגד זיהומים חיידקיים, פטרייתיים וויראליים. השוני העיקרי בין שתי צורות הפעולה, הוא סוג הגירוי שמפעיל אותם כנגד הפתוגן, התזמון שבו הפעולה מתרחשת, משך התהליך, והתוצאה הסופית של חיות התא. הנטוזיס בצורתו ההתאבדותית, מפזר כרומטין המכיל DNA גרעיני הכולל את תוכן התא בעקבות התפרקות הקרום התאי. לעומתו, נטוזיס חיוני משחרר DNA מיטוכונדריאלי והתא נשאר שלם לאחר השחרור (Oyarzún et al., 2016; Yousefi et al., 2019). המשמעות הביולוגית של יכולת יצירת הרשתות עצומה, וממשיכה להיבדק במחקרים נוספים. כדי לפתח תרופות שונות שישלבו תהליך זה, נדרשת הבנה טובה יותר של מאפייני ה- NETosis הקשורים למצבי מחלה ספציפיים,

זיהומים ודרכי טיפול בעזרת נטוזיס העשויים להוביל לזיהוי מטרות טיפוליות חשובות (Kaplan & Rabic, 2012).



איור 1: סריקת מיקרוסקופ אלקטרוניים של רשתות הנטוזיס (NETosis). הנויטרופילים (בצהוב) מזהים במקרה זה חיידקים (בכחול). ויוצרים מלכודת אקסטרצלולריות (בירוק) Arterioscler (Thalin et al., 2019)

2.5 המערכת האנדוקנבינואידית וקנביס

המערכת האנדוקנבינואידית (Endocannabinoid system-ECS) היא מערכת העברת אותות הקיימת בגופם של מרבית היונקים (קנאביס, 2015). אפיון פעילות המערכת האנדוקנבינואידית, התגלה כמבטיח טיפול במגוון רחב של מחלות ומצבים פתולוגיים שונים. החל מהפרעות במצב הרוח וחרדה, הפרעות תנועה למשל מחלת הפרקינסון והנטינגטון, כאב נטורופתי, טרשת נפוצה ופגיעה בעמוד השדרה, סרטן, טרשת עורקים, אוטם שריר הלב, שבץ מוחי, יתר לחץ דם, גלאוקומה, השמנת יתר / תסמונת מטבולית ואוסטאופורוזיס (Pacher, Bátkai & Kunos, 2006). כאמור, המערכת האנדוקנבינואידית משמעותית מאוד לגופינו ומשפיעה על מנעד רחב מאוד של תהליכים ביולוגיים כימיים ופיזיולוגיים בגוף ומהווה גורם מכריע בבריאות ותקינות תפקוד המערכות בגוף. בעוד שהמערכת האנדוקנבינואידית משפיעה כאמור על מגוון רחב של תהליכים ביולוגיים, כמו למשל תחושת תאבון, עייפות ושינה, חוקרים מאמינים שמטרת קיומה העיקרית של מערכת זו, היא שמירה על 'הומאוסטזיס' (מצב יציב. מיוונית: Homeostasis) – היכולת של יצור ביולוגי לשמור על סביבה פנימית יציבה למרות השינויים שחלים בסביבה החיצונית (קנאביס, 2015).

מולקולות שונות בצמח הקנאביס המכונות פיטו-קנבינואידים מחקות את פעולת האנדוקנבינואידים הטבעיים ומשפעות רצפטורים ספציפיים לקנבינואידים בגופנו. דוגמאות לשני

פיטו-קנאבינואידים מוכרים הם ה-THC (tetrahydrocannabinol) שהוא החומר הפסיכואקטיבי בצמח הקנביס ו-CBD (Cannabidiol) שהוא גם כן חומר פעיל אך ללא השפעה רגשית או נפשית כלשהי. עד כה נתגלו רק כמאה קנבינואידים בצמח הקנאביס (קנאביס, 2015). המספר ההולך וגדל של מחקרים פרה-קליניים וניסויים קליניים בתרכובות המווסתות את מערכת האנדוקנבינואידים יביאו ככל הנראה לגישות טיפוליות חדשניות במספר מחלות שהטיפולים הקיימים בהן אינם נותנים מענה מלא לצורך של המטופלים (Pacher, Bátkaï & Kunos, 2006).

כאמור, 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 CB1 נמצא בעיקר על תאי מערכת החיסון, מתבררת היום ההשפעה אנטי דלקתית של צריכת הקנביס. כיוון שקולטן מסוג CB1 נקשר בעיקר לקנבינואיד THC שהינו בעל אפקטים פסיכו-אקטיביים, הוא מהווה מטרה אטרקטיבית לטיפול במחלות אוטואימוניות (קאנה טיים, 2020).

שאלת המחקר: האם הרצפטור לקנאביס CB1 מעורב בהגברת נטוויזיס והרג חיידקים מוגבר בנויטרופילים המושרה על ידי קנאביס.

מטרת המחקר: לבחון האם הרצפטור לקנבינואידים מסוג CB1 אחראי להגברת הנטוויזיס והרג חיידקים המוגבר, המושרה על ידי קנאביס, והאם עיכוב הרצפטור CB1 לקנבינואידים יפחית או יבטל את תהליך הגברת הנטוויזיס המתרחש לאחר הדגרה עם קנאביס.

השערת המחקר: כיוון שהרצפטור לקנבינואידים מסוג CB1 מתבטא על תאי מערכת החיסון בכלל ונויטרופילים בפרט, עשויה להיות לו השפעה על תהליך הנטוויזיס בתאי נויטרופילים. לכן הנחנו כי הרצפטור CB1 עשוי להיות מעורב בתהליך הגברת הנטוויזיס והרג החיידקים בנויטרופילים על ידי תמציות קנביס. אם יעוכב הוא עלול לפגוע בהרג החיידקים המוגבר המושרה על ידי תמציות קנביס (על בסיס ידע קודם המראה שקנאביס גורם להגברת נטוויזיס אך עדיין לא ידוע באיזה מנגנון הוא עושה זאת).

3. שיטות וחומרים

3.1 לקיחת דמים

נלקחה תרומת דם של 5 מ"ל במבחנות EDTA כגורם מעכב קרישה מ-3 תורמים, זכרים בריאים. **מטרת השיטה**- עיכוב קרישת הדם כדי שיתאפשר תאי נויטרופילים חיים. **עקרון השיטה**- הדם נקרש כאשר הוא יוצא מהגוף שלנו בגלל פעילות טרומבוציטים (טסיות דם) שנמצאים בדם. החומר EDTA, הוא חומר מעכב קרישה- כאשר הדם נמצא במבחנה שבה ישנו החומר EDTA הדם לא נקרש ונשאר נוזלי וכך ניתן להשתמש בדם לשימוש ניסויי שמצריך דם נוזלי כגון: ספירת דם, משטחי דם, הפרדת תאים, בדיקת סוג דם.

3.2 הפקת נויטרופילים

מטרת השיטה- בידוד הנויטרופילים משאר מרכיבי הדם השונים.

עקרון השיטה- השיטה שבה מבודדים את הנויטרופילים היא שיטת ה-Negative selection, הפועלת בעזרת ערכה המכילה שני מרכיבים עיקריים, קוקטייל נוגדנים וחלקיקים מגנטיים. קוקטייל הנוגדנים מכיל הרכבים שונים של נוגדנים, שמתחברים לאזורים המותאמים להם על פני שלל מרכיבי הדם מלבד נויטרופילים (-Negative selection) שעליהם נעשה הניסוי. כאשר מוסיפים את הבידודים המגנטיים, הם מתחברים לקצה החופשי של הנוגדנים המחוברים לאנטיגנים וכך האנטיגנים הלא רצויים מתמגנטים למגנט ה-EasySep, ובעקבות זאת לקצוות המבחנה והנויטרופילים הרצויים מבודדים.

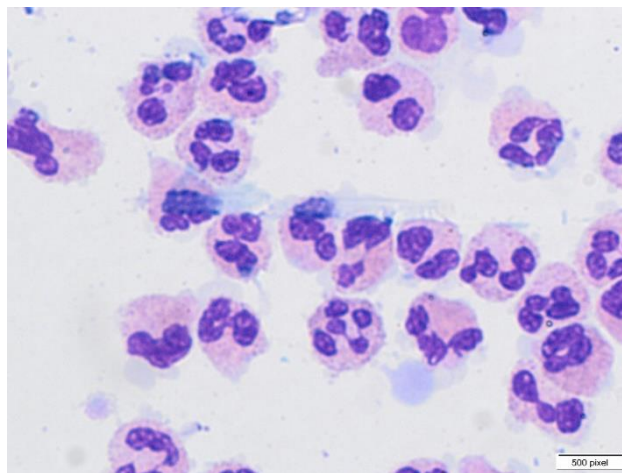
מהלך השיטה- הוכנסו לתוך המבחנות עם הדם בידיים מגנטיים ונוגדנים של חברת Stemcell הנקשרים לכל מרכיבי הדם למעט הנויטרופילים. מבחנות אלו הונחו באינקובציה, בטמפרטורת החדר למשך חמש דקות, בתוך סטנד קיט magnet של חברת EasySep (איור 2). פעולה זו חזרה על עצמה שלוש פעמים ובסופה התקבלו נויטרופילים נקיים (איור 3). כדי לוודא שיש לנו רק נויטרופילים נלקחה הדגימה בכדי לצבוע אותה בצביעת גימזה (איור 4).



איור 2 : מבחנות הניסוי בתוך ה- stand kit magnet בתחילת תהליך ההתמגנטות לפני ההפרדה. צולם על ידי התלמיד, במעבדת מחקר של ד"ר עידן כהן במרכז הרפואי העמק במהלך הניסוי (2021).



איור 3: הנויטרופילים הנקיים בסוף תהליך ההתמגנטות. לאחר 5 דקות ניתן לראות את הפרדה שנעשתה על ידי הבידים במבחנה והצבתה במגנט. צולם על ידי התלמיד במעבדת מחקר של ד"ר עידן כהן במרכז הרפואי העמק (2021).



איור 4: הנויטרופילים לאחר צביעת גימזה מראים את מידת הניקיון הגבוהה של הפרדת התאים. צולם על ידי התלמיד, במעבדת מחקר של ד"ר עידן כהן במרכז הרפואי העמק (2021).

3.3 טיפול בנויטרופילים

מטרת השיטה- לאפשר לנויטרופילים לחיות זמן ממושך המדמה את זמן חייהם במחזור הדם.
עקרון השיטה- מדיום הגידול שהוכן לנויטרופילים, מדמה את סביבת ה"חיים" הטבעית של הנויטרופילים.

מהלך השיטה- הוכן מדיום הגידול RPMI (Roswell Park Memorial Institute) כך שיכיל 2% Fetal Calf Serum ואנטיביוטיקה (בכדי למנוע גדילת חיידקים) ב- 100 מיקרוליטר ובריכוז סופי של 150,000 תאים לכל בארית. לכל טיפול (כל אחת מדגימות הדם) ביצענו שלוש חזרות. התאים הודגרו לזמן קצר של כ- 20 עד 30 דקות באינקובטור לגידול תאים (well plate 96) בטמפי של 37°C בנכחות של 5% CO_2 באור, בכדי לספק לנויטרופילים סביבה אופטימלית, עד להדבקת התאים לתחתית הבארית.

3.4 הוספת מעכב תחרותי למדיום הגידול

מטרת השיטה- לעכב את הרצפטור CB1 על ידי מעכב תחרותי כדי לבדוק האם רצפטור זה מושפע ממצוי הקנאביס שתוסף בהמשך.

עקרון השיטה- מעכב תחרותי נקשר לרצפטור לו הוא מיועד, כך שאינו מאפשר לו לבצע את תפקידו. כדי לבדוק האם רצפטור מסוים שותף בתהליך/ מושפע מחומר כלשהוא, מעכבים את הרצפטור שרוצים לבדוק ובודקים האם חל שינוי בתהליך. אם חל שינוי, סימן שהרצפטור שמעוכב שותף בתהליך, כי בלעדיו התהליך היה שונה. אם לא חל שום שינוי בתהליך, סימן שהרצפטור הנבדק לא קשור לתהליך כיוון שאיתו וגם בלעדיו התהליך היה זהה.

מהלך השיטה- הוסף למדיום הגידול מעכב תחרותי -AM251, לאחר מכן הודגרו התאים למשך שלושים דקות נוספות באינקובטור לגידול תאים (well plate 96) בטמפי של 37°C בנכחות של 5% CO_2 , בכדי לספק לנויטרופילים סביבה אופטימלית, עד להצמדות התאים לתחתית הבארית. שלב הדגרה זה יאפשר למעכב להקשר ולחסום את הרצפטור ולא יאפשר למולקולות הרלוונטיות בתמצית הקנביס שתוסף בהמשך לשפעל את התאים במידה והם משופעלים דרך רצפטור רלוונטי זה.

3.5 חשיפת התאים הנויטרופילים לתמצית הקנאביס

מטרת השיטה- לבדוק האם הרצפטור CB1 מעורב בתהליך הנטוויס המוגבר, המתרחש כתוצאה מאקטוב תאי הנויטרופילים על ידי תמיסת הקנאביס 2574.

עקרון השיטה- בניסויים שנעשו בעבר, הודגם שמיצוי הקנאביס 2574 מאקטב את תאי הנויטרופילים ליצירת נטוויס מוגברת והרג כפול של חיידקים. בשלב זה הוסף המיצוי, המאקטב את התאים כדי להבחין האם הרצפטור הנחקר שותף בתהליך הגברת הרג החיידקים (neutrophil priming) והודגר למשך 4 שעות לשם יצירת המטוויס.

מהלך השיטה- הדגרת מדיום גידול התאים עם המעכב התחרותי, לטובת חסימת הרצפטור על ידי המעכב. הוספה של מיצוי הקנאביס 2574 לטובת איקטוב התאים למשך 4 שעות.

3.6 הוספת PMA

מטרת השיטה - הוסף מגרה PMA (phorbol myristate acetate) בכדי לייצר סטימולציה והדמיה של נוכחות חיידקים.

מהלך השיטה - הוסף החומר PMA בריכוז סופי של 50 nM לכלים בהם שוהים הנויטרופילים. תהליך זה נמשך שלוש שעות באינקובטור בטמפ' של 37 °C בנוכחות של 5% CO₂. בסיום תהליך הנטוויס, הפלטה סורכזה בכדי להפריד בין תאים שלמים ושברי תאים גדולים למדיום הגידול. מדיום הגידול נאסף בפלטה חדשה. תהליך זה מהווה בקרה חיובית ליכולת התאים החיוביים להגיב לזיהום חיידקי.

3.7 כימות פעילות הנטוויס

מטרת השיטה - לכמת את פעילות הנטוויס באמצעות כימות ה-DNA חוץ תאי.

עיקרון השיטה - יש לציין כי הודגם בעבר כי כמות ה-DNA בתרחיף נובע ישירות מעוצמת תהליך הנטוויס ולכן כמות ה-DNA תהווה מדד ישיר לעוצמתו של התהליך (משום שבתהליך הנטוויס נפלט DNA אל הסביבה החוץ תאית).

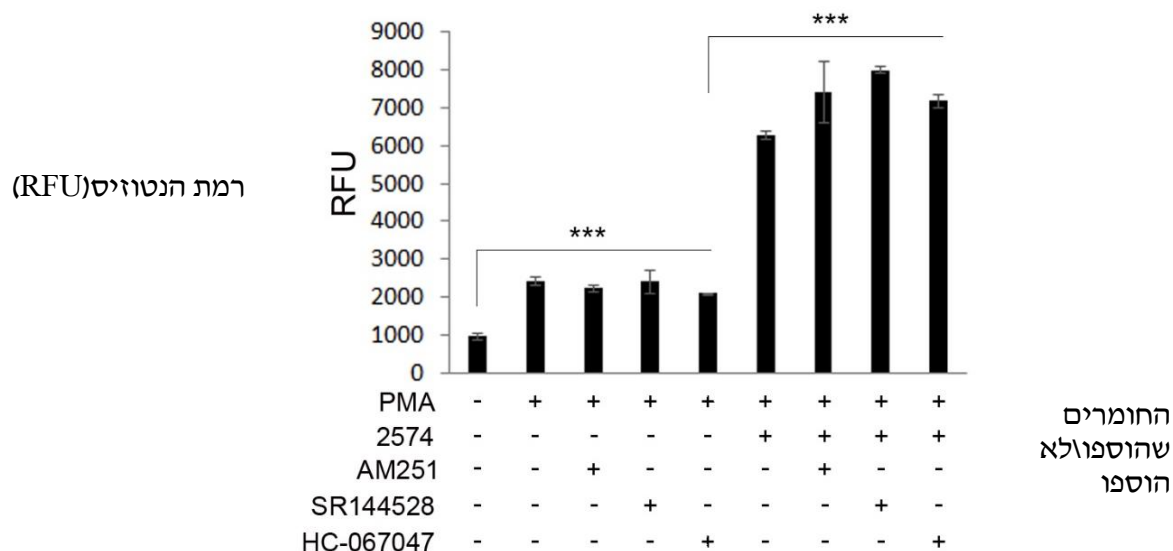
כמות ה-DNA בתרחיף תכומת בעזרת הוספה של SYTOX green, חומר הנקשר בצורה ספציפית למולקולות DNA חופשיות ומייצר פלורסנציה אך ורק לאחר קישור ל-DNA. הבדיקה תבצע בעזרת מכשיר ELISA שבודק פלורסנציה 523 emission, 504 excitation והתוצאות יוצגו באופן מדיד ומספרי - RFU (Relative Fluorescence Unit).

מהלך השיטה - הוסף SYTOX green 50 nM למבחנות הטיפול והביקורת והן הוכנסו למכשיר ה-ELISA שמוודד את עוצמת הפלורסנציה.

בדיקת השפעת תמצית הקנאביס 2574 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 כאשר לכל טיפול התבצעו שלוש חזרות שונות מתאים שנילקחו משלושה תורמים שונים. בדוגמה אחת לא הוכנסו חומרים כלל (קבוצת הביקורת השלילית) - נמצא כי בדוגמה זו נמדדה כמות DNA של קצת פחות מ-1000 יחידות יחסיות, בדוגמה נוספת הוסף החומר PMA (המדמה נוכחות חיידקים כביקורת חיובית) - בדוגמה השנייה נמדדה כמות של קרוב ל-3000 יחידות יחסיות ובכלי השלישי הוסף PMA יחד עם תמצית קנאביס 2574 (כביקורת חיובית נוספת כדי להראות שקנביס מגביר נטוזיס) - בדוגמה זו נמדדה רמת נטוזיס של קרוב ל-7000 יחידות יחסיות (איור 4). בשלב נוסף של ניסוי זה נבדק האם הרצפטור לקנבינואידים CB1 מעורב בתהליך הגברת הנטוזיס. נבדקו שלוש דוגמאות נוספות שהכילו נויטרופילים ובנוסף אליהם את החומרים: PMA, תמצית הקנאביס 2574 ואת המעכב התחרותי AM251 לרצפטור CB1. נמצא כי רמת הנטוזיס שנמדדה בכלי עם התוספת של המעכב התחרותי, הייתה קצת יותר מ-7000 (איור 4), תוצאה דומה מאוד לתוצאה בכלי ללא המעכב התחרותי (סטייה קטנה ולא משמעותית סטטיסטית).

רמת הנטוזיס בנוכחות קנאביס ומעכבי רצפטורים למערכת הקנבינואידית.



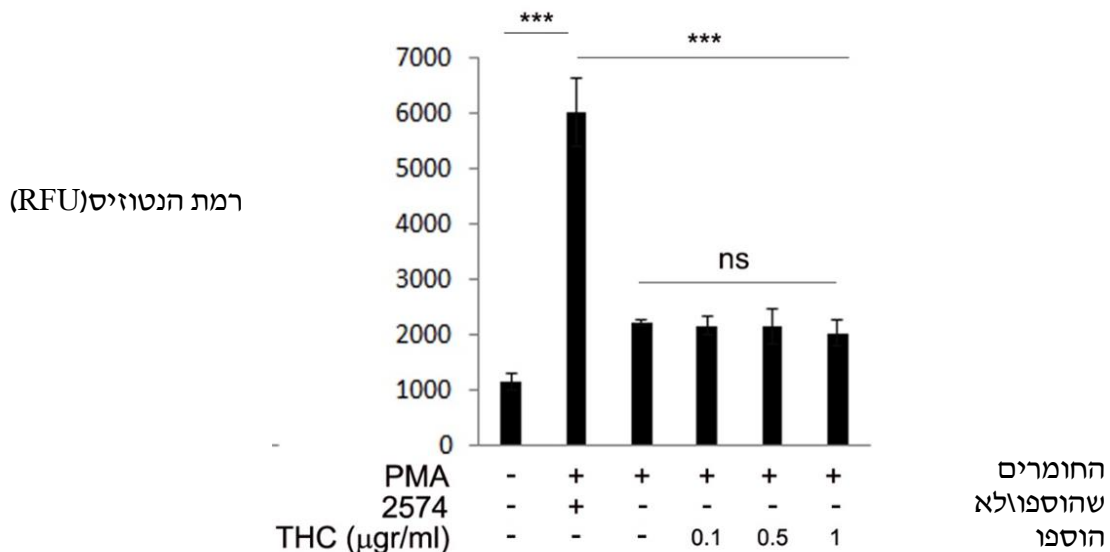
איור 4: השפעת מעכבי רצפטורים למערכת הקנבינואידית על רשתות נויטרופיליות אקסטרצלולריות. בניסוי השתמשנו בחומרים PMA, תמצית קנביס 2574, ו-AM251 בלבד, כל עמודה מייצגת ממוצע של ניסויים משלושה תורמים, כולל סטיית תקן וסימוני ה+ וה- מייצגים את החומרים שהופיעו/ לא הופיעו בכלי: תחת כל עמודה מסומן בקו אופקי לאחד החומרים סימן +/-, אם סומן הסימן +, הכלי מכיל את החומר. אם סומן -, הכלי אינו מכיל את החומר. ציר ה-Y

מסמל את רמת הנתוזיס היחסי כתלות ב-DNA חוץ תאי שנמדד בעזרת Sytox green (ביחידות RFU) וציר ה-X את החומרים שהיו/ לא היו בכלי.

בדיקת מעורבות THC בהגברת הנתוזיס על ידי קנאביס בדרך חיובית

כיוון ש-THC להגיב היטב עם הרצפטור מסוג CB1 בדקנו בניסוי נוסף בגישה החיובית ואחרת מהגישה בשלב הקודם בו ניסינו לחסום את הרצפטור. הפעם ניסינו לאקטב את הרצפטור על ידי הוספת THC טהור כתחליף לתמצית קנביס בהנחה שאולי מרכיב זה הוא החומר הפעיל בתמצית. כמו בשלב הקודם, גם כאן ביצענו ביקורות חיוביות ושיליות כאשר לשאר הדוגמאות הוספנו גם THC בריכוזים עולים במקום תמציות קנביס. נמצא כי בקבוצת הביקורת רמת הנתוזיס הייתה קצת יותר מ-2000 יחידות יחסיות ובשלושת הכלים הבאים שהכילו PMA ו-THC בריכוזים שונים רמת הנתוזיס הייתה כמעט זהה (קצת יותר מ-2000), בדומה לרמת הנתוזיס כאשר הדוגמה הכילה רק PMA (איור 5), כלומר ל THC אין ערך מוסף לשם הגברת הנתוזיס.

השפעת THC כחומר המשפעל המשפיע על הגברת הנתוזיס על ידי קנביס



איור 5: השפעת THC טהור על תהליך הנתוזיס. בשלב זה של הניסוי הייתה נוכחות של שני חומרים: PMA ו-THC (תמצית הקנאביס 2574 הייתה רק כביקורת לנתוזיס 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 הנתוזיס היחסי כתלות ב-DNA חוץ תאי שנמדד בעזרת Sytox green (ביחידות RFU).

זיהומים מהווים כגורמי המוות העיקריים בארצות הברית וסיבת המוות השכיחה ביותר בקרב חולים קשים ביחידות לטיפול נמרץ שאינן כליליות על פי ניתוח נתונים שבוצע במרכז הארצי למניעת זיהומים ועמידות לאנטיביוטיקה במשרד הבריאות. לאחרונה דווח כי מספר מקרי התמותה מזיהומים נרכשים (זיהומים בהם נדבקים מטופלים במהלך שהותם בבית החולים) בבתי החולים הכלליים עומד על כ-4000 ל-6000 מקרים בשנה בישראל (איגוד רופאי בריאות הציבור בישראל, 2020). בארצות הברית ישנם כ-750,000 מקרים של אלח דם בשנה, שהם כ-2% מכלל האישפוזים. הטיפול בחולים אלה, מביא לעלויות גדולות לבתי החולים העולות על 16 מיליארד דולר (O'Brien jr et al., 2007). 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 נייטרופילים פועלים להשמדת גורמים זרים הנכנסים לגוף, והיא מעוררת עניין רב בשל חשיבותה בשליטה בזיהומים החוץ תאיים בגופנו וחוסר המידע המספק שיש עליה. השיטה החדשה עובדת בעזרת רשתות אקסטרצלולריות תאיות או בקיצור נטוזיס (NETosis-neutrophil extracellular traps). כיום תהליך זה מוגדר כסוג חדש של מוות תאי מתוכנן שבו התא מתפוצץ ויוצר רשתות המיועדות לשמירה על הגוף והריגת הגורמים הזרים שנכנסים אליו (Mesa & Vasquez, 2013).

במחקרים קודמים התגלה כי לתמציות קנאביס מסויימות יש יכולת רגולציה על תהליך הנטוזיס. למעשה התגלה שקנאביס יכול לגרום גם להכפלת עוצמתו של הנטוזיס, מה שבעצם גורם לעלייה משמעותית מאוד בהרג החיידקים על ידי הנייטרופילים. לכך יכולה להיות משמעות רפואית עצומה לטיפול בחולים הנפגעים מזיהומים, בדגש על זיהומים שעמידים לאנטיביוטיקה. המחקר שלנו עוסק בתהליך זה בגלל המשמעות שיש לו לטיפול בזיהומים, בניסיון לספק טיפול טוב יותר לחולים הנפגעים מזיהומים.

במחקר זה נבדק הקשר בין הרצפטור CB1 לתהליך הגברת הנטוזיס על ידי תמצית הקנאביס 2574. השערת המחקר הייתה שהרצפטור CB1 עשוי להיות מעורב בתהליך הגברת הנטוזיס על ידי הקנאביס. השערה זו התבססה על ידע קודם על כך שהרצפטור CB1 נמצא במקומות ומערכות שונות בגוף, בין השאר בנוכחות גבוהה במערכת החיסון ולכן הנחנו שעשויה להיות לו השפעה על תהליך הנטוזיס (פארמוקן, ל.ת).

בשונה מהשערת המחקר, ממצאי המחקר הראו כי הרצפטור המדובר אינו שותף בתהליך הגברת הנטוזיס- התוצאות ללא עיכוב הרצפטור ועם עיכובו היו מאוד דומות ובשיטה השנייה, עם החומר THC ובלעדיו התוצאות היו דומות מאוד. על ידי תמצית הקנאביס 2574, אלא בתהליך זה מעורב ככל הנראה רצפטור אחר אותו עלינו לגלות במחקרים המשך. מעורבותו של הרצפטור בתהליך זה נבדקה מכמה כיוונים כדי לוודא את מעורבותו או את אי מעורבותו בתהליך- בדקנו בניסוי בשתי שיטות שונות- האחת דרך חסימת הרצפטור על ידי המעכב AM251 וגם בניסיון לאקטב את הרצפטור בעזרת הקנבינואיד הפעיל THC. בשתי השיטות נראה כי גם הרצפטור בצורה ישירה וגם THC בצורה עקיפה אינם שותפים בהפעלת מנגנון הנטוזיס.

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 כי ייתכן שקיים מנגנון נטוזיס חדש שאינו תלוי לא ברצפטורים CB1/2 ולא בקנבינואידים הידועים והנחקרים THC/CBD. חשוב לציין כי המנגנון דרכו מתרחש תהליך הגברת הנטוזיס לא חייב להיות דרך רצפטורים, הוא יכול להיות דרך מסלולים נוספים שאינם ידועים לנו כרגע. בעקבות שלילת הרצפטורים הידועים לנו עד כה, הממצאים עד כה מחזקים את ההשערה שמנגנון זה פועל אולי דרך סוכרים או חומצות שומן הנמצאות בתמצית הקנאביס ולא כפי ששיערנו בהתחלה- דרך רצפטורים לקנבינואידים. בעקבות מחקר זה הומלץ להמשיך לחקור כדי למצוא את המנגנון שכן מעורב בתהליך כדי שבעתיד נוכל להתאים תרופות וטיפולים נכונים יותר למגוון החולים הרחב שצורך קנביס רפואי.

6. ביבליוגרפיה

איגוד רופאי בריאות הציבור בישראל. (2020). הפחתה של עשרות אחוזים בשיעור הזיהומים הנרכשים בבתי החולים. אוחזר בתאריך 04/02/2021 מתוך :
[/https://publichealth.doctorsonly.co.il/2020/06/195706](https://publichealth.doctorsonly.co.il/2020/06/195706)

איחוד והצלה. (ל.ת). מערכת חיסון (העשרה). אוחזר בתאריך 05/02/2021 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/>

גרטי, א'. (2009). התגובה החיסונית הנרכשת. מכון דוידסון. אוחזר בתאריך 06/02/2021 מתוך :
https://davidson.weizmann.ac.il/online/maagarmada/med_and_physiol/%D7%94%D7%AA%D7%92%D7%95%D7%91%D7%94-%D7%94%D7%97%D7%99%D7%A1%D7%95%D7%A0%D7%99%D7%AA-%D7%94%D7%A0%D7%A8%D7%9B%D7%A9%D7%AA

המרכז הרפואי תל-אביב ע"ש סוראסקי (ל.ת). איכילוב נלחם בזיהומים. אוחזר בתאריך 06/02/2021 מתוך :

<https://www.tasmc.org.il/Articles/Epidemiology/Pages/Fighting-Infections.aspx>

הקריה הרפואית רמב"ם. (ל.ת). נוגדנים כנגד נויטרופילים Neutrophils. אוחזר בתאריך 06/02/2021 מתוך :

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

וולף, י'. (2018). החיילים הקרביים של מערכת החיסון. מכון דוידסון. אוחזר בתאריך 06/05/2020 מתוך :

<https://davidson.weizmann.ac.il/online/sciencepanorama/%D7%94%D7%97%D7%99%D7%99%D7%9C%D7%99%D7%9D-%D7%94%D7%A7%D7%A8%D7%91%D7%99%D7%99%D7%9D-%D7%A9%D7%9C-%D7%9E%D7%A2%D7%A8%D7%9B%D7%AA-%D7%94%D7%97%D7%99%D7%A1%D7%95%D7%9F>

ליס, צ'. (2017). NEUTROPHILS. כללית. אוחזר בתאריך 04/02/2021 מתוך :
https://www.clalit.co.il/he/medical/lab_tests/Pages/neutrophils.aspx

מאוחדת. (ל.ת). זהירות, זיהום : מה חשוב לדעת על מחלות זיהומיות. אוחזר בתאריך 07/05/2021 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->

<https://www.maccabi4u.co.il/16417-he/Maccabi.aspx>

מכבי. (ל.ת.). זיהום חיידקי (Bacterial infection). . אוחזר בתאריך 07/05/2021 מתוך :
<https://www.maccabi4u.co.il/16417-he/Maccabi.aspx>

פארמוקן. (ל.ת.). איך הקנאביס נקלט בגופנו? הכירו את המערכת האנדוקנבינואידית. אוחזר
בתאריך 4/02/2021 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>

פלורנטיין, ד'י. (2011). הכל על monocytes ושאר תאי הדם הלבנים : פענוח ספירת דם. כללית.
אוחזר בתאריך 06/02/2021 מתוך :

https://www.clalit.co.il/he/your_health/family/Pages/differential.aspx

קאנה טיים, (2020), קנאביס והמערכת החיסונית : מערכת מורכבת, אוחזר בתאריך 14/5/2021
מתוך [קנאביס והמערכת החיסונית: פעולת איזון מורכבת - קאנה טיים\(cannatime.co.il\)](http://cannatime.co.il)

קנאביס. (2015). המערכת האנדוקנבינואידית – קנאביס בגוף האדם. אוחזר בתאריך 04/02/2021
מתוך :

<https://www.xn--4dbcyzi5a.com/%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/#gsc.tab=0>

Better health (n.d.) Immune system explained. . retrieved on 12/04/2020 from:

<https://www.betterhealth.vic.gov.au/health/conditionsandtreatments/immune-system>

Kaplan, M. J., & Radic, M. (2012). Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *The Journal of Immunology*, *189*(6), 2689-2695.

Khan Academy. (n.d). Innate immunity. Retrieved from:

<https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/organ-systems/the-immune-system/a/innate-immunity>

Matoszka, N., Działo, J., Tokarz-Deptuła, B., & Deptuła, W. (2012). NET and NETosis--new phenomenon in immunology. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*, *66*, 437-445

Mayr, F. B., Yende, S., & Angus, D. C. (2014). Epidemiology of severe sepsis. Recived 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*.

Nauseef, W. M., & Borregaard, N. (2014). Neutrophils at work. *Nature immunology*, *15*(7), 602-611.

O'Brien Jr, J. M., Ali, N. A., Aberegg, S. K., & Abraham, E. (2007). Sepsis. *The American journal of medicine*, *120*(12), 1012-1022.

Oyarzún, C. P. M., Carestia, A., Lev, P. R., Glembotsky, A. C., Ríos, M. A. C., Moiraghi, B., ... & Heller, P. G. (2016). Neutrophil extracellular trap formation and circulating nucleosomes in patients with chronic myeloproliferative neoplasms. *Scientific reports*, *6*(1), 1-13.

Pacher, P., Bátkai, S., & Kunos, G. (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacological reviews*, *58*(3), 389-462.

Thalin, C., Hisada, Y., Lundsrom, S., Mackman, N., Hakan, W. (2019). Villains and Targets in Arterial, Venous, and Cancer-Associated Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* retrieved on 28/02/2021 from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.119.312463>

Yousefi, S., Stojkov, D., Germic, N., Simon, D., Wang, X., Benarafa, C., & Simon, H. U. (2019). Untangling “NETosis” from NETs. *European journal of immunology*, *49*(2), 221-227.