

12 8503223

השוראת השפעות של שתי שיטות הפרדה מקובלות  
על מורפולוגיה של לימפוציטים ועל רגישותם לקרינת גמא

ר' קול

שכט חשמ"ה - פברואר 1985

English title and abstract included



#### LEGAL NOTICE

This publication is issued by the Nuclear Research Centre - Negev, Israel Atomic Energy Commission. Neither the Nuclear Research Centre - Negev, nor its contractors, nor any person acting on their behalf or on behalf of the Israel Atomic Energy Commission

make any warranty or representation, express or implied, with respect to the accuracy, completeness, or usefulness of the information contained in this publication, or that the use of any information, apparatus, method or process disclosed in this publication will not infringe upon privately owned rights, or

assume any liability with respect to the use of, or for damages resulting from the use of any information, apparatus, method or process disclosed in this publication.

Mention of commercial products, their manufacturers, or their suppliers in this publication does not imply or connote approval or disapproval of the products by the Nuclear Research Centre - Negev or by the Israel Atomic Energy Commission.

#### הודעה משפטית

פרסום זה מוצא לאור על-ידי הקריה למחקר גרעיני - נבג, הוועדה לאנרגיה אטומית של ישראל.

הקריה למחקר גרעיני - נבג והפועלים מטעמה או בשמה, או מטעם הוועדה לאנרגיה אטומית של ישראל או בשמה

אינם אחראים או ערבים, אחריות או ערבות כלשהי, במפורש או שלא במפורש, לדיוק, לשלמות ולשר-מושיות של המידע הכלול בפרסום זה או לכך שהשימוש בכל מידע, מכשיר, שיטה או תהליך הנדון בפרסום זה לא יפגע בזכויות פרטיות של אחרים,

ואינם מקבלים על עצמם כל התחייבות בנין הי-שימוש או נזקי השימוש בכל מידע, מכשיר, שיטה או תהליך הנדון בפרסום זה.

הציון של מוצרים מסחריים, של יצרניהם או של ספקיהם בפרסום זה אין משמעו אישור המוצרים על-ידי הקריה למחקר גרעיני - נבג או על-ידי הוועדה לאנרגיה אטומית של ישראל.

This publication and more information about its subject matter may be obtained at the following address:

Scientific and Technical Information Department  
Nuclear Research Centre - Negev  
P. O. Box 9007  
84 190 Beer-Sheva, ISRAEL

ניתן להשיג את הפרסום הזה וכן מידע נוסף בנושא הפרסום על-ידי פנייה לכתובת:

יחידת המידע  
הקריה למחקר גרעיני - נבג (קמ"ג)  
ת"ד 9007  
באר שבע 84 190

השוואת השפעות של שתי שיטות הפרדה מקובלות על המורפולוגיה של לימפוציטים

ועל רגישותם לקרינת גמא

(חיבור לקבלת החוואר מגיסטר במדעי הטבע, אוניברסיטת כן-גוריון בנגב, באר-שבע,

מרס 1981)

ר' קול

שבת תשמ"ה - פברואר 1985

#### תקציר

אוכלוסיית הלימפוציטים בדם הפריפרי מתחלקת לשתי תת-קבוצות עיקריות: תאי T ותאי B. מלבד הבדלים בתיפקוד מוצאים ביניהן גם הבדלים ברגישות לקרינה. המתקרים שנעשו במגמה לקבוע איזוהי תת-האוכלוסייה הרגישה יותר לקרינה, העלו תוצאות סותרות. נבדקה האפשרות שהשיטות בהן משתמשים להפרדת אוכלוסיית הלימפוציטים כולה מתוך הדם המלא, עור לפני ההפרדה לתת-האוכלוסיות, גורמות לשינויים בתאים ובכך תורמות להוצאות המנוגדות המתקבלות. דוגמות דם נלקחו ממספר תורמים. כל רוגמה נחלקה לשניים ומכל חלק הופרדו הלימפוציטים באחת משתי השיטות הבאות: (א) השקעת תאי הדם האדומים בכוח הכובד ואיסוף התאים הלבנים מעליהן; (ב) הפרדה באמצעות גרדיינט צפיפות עם פיקול (Ficoll-Paque). בתאים שהתקבלו בכל אחת משתי השיטות נבדקה המורפולוגיה באמצעות מיקרוסקופ האלקטרונים וכן נמדד כושרם של התאים לקלוט תימירין מסומן בטריטיום. ברוגמות שהופרדו עם פיקול הובחנה הופעתה של אוכלוסיית לימפוציטים שחלו בה שינויים הרומים לאלה החלים בתאים שעברו שיפעול. כמו-כן נמצא שההפרדה עם פיקול גורמת להגברת הרגישות לקרינה של לימפוציטים בלתי משופעלים. בבדיקת כושרם של הלימפוציטים שהתקבלו בשתי השיטות, לעבור טרנספורמציה לאחר הקרנה כקרינת גמא, עם שלושה מיטוגנים: PWM, Con A, PHA, שכל אחד מהם גורם לשיפעולה של תת אוכלוסייה אחרת, התברר שהתאים

שהופרדו עם פיקול ושופעלו על-ידי Con A הראו רגישות רבה יותר. לגבי שני המיטוגנים האחרים - לא נמצא הבדל בין התאים שהתקבלו בשתי שיטות. התאים המגיבים ל-Con A ידועים כבעלי עמירות גבוהה יותר לקרינה. ניתן להסביר את המימצא שתאים שהופרדו על פיקול מראים רגישות רבה יותר לקרינת גמא, הן במצבם הבלתי משופעל והן לאחר שיפעולם עם Con A, על-ידי כך ששיטת הפרדה זו גורמת להרחקה סלקטיבית של חלק מהתאים המגיבים למיטוגן זה ושעמידותם לקרינה גבוהה יותר. הרחקה של תת אוכלוסיה עמידה לקרינה גורמת להגברת רגישותה של האוכלוסיה כולה. השימוש בשיטות הפרדה שונות תורם, איפוא, לתוצאות הסותרות המתקבלות בעבודות עם לימפוציטים, בין היתר גם בבדיקת רגישותן היחסית של תת-האוכלוסיות שלהם לקרינה.

COMPARISON OF TWO DIFFERENT SEPARATION TECHNIQUES ON THE HUMAN LYMPHOCYTES  
MORPHOLOGY AND SENSITIVITY TO GAMMA RADIATION

(Thesis for the degree of Master of Sciences in Natural Sciences,  
Ben-Gurion University of the Negev, Beer-Sheva, March 1981)

Rina KOL

February 1985

ABSTRACT

The lymphocytes in the Peripheral blood are divided into two main subclasses: T cells and B cells. These differ from each other in function and in their sensitivity to radiation. The effort to study which group is more sensitive to radiation have resulted in many contradictory results. In the present study we examined whether the methods that are used to separate the lymphocytes from the whole blood, before their separation into subclasses, have an effect on the cells and whether this might contribute to the contradictory results. Blood samples were taken from several normal donors and each sample was divided into two fractions. Lymphocytes in each fraction were separated by one of the two following methods: a) sedimentation of erythrocytes by gravitation; b) separation on Ficoll-Paque density gradient. For cells obtained by these two methods, the ultrastructure was examined by electron microscopy and their ability to incorporate radioactive thymidine was measured. Samples separated on Ficoll-Paque showed a subpopulation with morphological changes similar to those occurring in lymphocytes undergoing stimulation. Unstimulated Cells separated on Ficoll-Paque showed greater sensitivity to radiation. The effect of gamma radiation

on the capability of lymphocytes to undergo transformation in response to three mitogens: PHA, PWM and Con A was examined. Different mitogens stimulate different lymphocytes subpopulations. There was no difference between the two separation methods regarding the sensitivity to gamma radiation of stimulation by PAH and PWM. The transformation by Con A of lymphocytes separated on Ficoll-Paque was more radiosensitive. This could indicate that the separation by Ficoll-Paque density gradient causes a selective depletion of T lymphocytes that react with Con A and are considered more radioresistant. The use of different methods for separating lymphocytes from whole blood, each has a different influence on the cells, can contribute to the contradictory results that were obtained with regard to the sensitivity of human lymphocytes to radiation.

---

Received: April 1981.

Published without scientific editing by the NRCN Scientific and Technical Information Department.

עמודתוכן העניינים

1	1	מבוא
1	1.1	תיאור אוכלוסיות הלימפוציטים
3	1.2	הפרדת הלימפוציטים מתוך הדם המלא
5	1.3	טרנספורמציה של לימפוציטים
6	1.4	השפעת קרינה מייננת על תאי יונקים
7	1.5	השפעת הקרינה המייננת על הלימפוציטים
10	2	שיטות וחומרים
10	2.1	לקיחת הדם והפרדתו
11	2.2	הכנת הפרפט למיקרוסקופ האלקטרוני
12	2.3	קליטת תימדין מסומן בטריטיום לתוך ה-DNA של לימפוציטים בלתי משופעלים
12	2.4	הקרנת לימפוציטים מופרדים בקרינת גמא
13	2.5	בדיקת טרנספורמציה של לימפוציטים מוקרנים - בהשפעת מיטוגנים
13	2.6	בדיקת יצירת רוזטות עם כדוריות דם ארומות של כבש
14	3	תוצאות
14	3.1	שינויים מורפולוגיים
25	3.2	השפעת שיטות ההפרדה על מידת השיפעול של לימפוציטים על פי קליטת תימדין מסומן בטריטיום
26	3.3	עמידות לקרינת גמא של לימפוציטים שהופרדו בשתי שיטות ההפרדה
26	3.4	עמידות לקרינה של תאים נייחים ותאים המשופעלים על-ידי מיטוגנים שונים
29	3.5	יצירת רוזטות מטיפוס E ו-EAC כתלות בשיטת ההפרדה
30	4	דיון בתוצאות
30	4.1	שינויים מורפולוגיים המופיעים בלימפוציטים כתלות בשיטת ההפרדה
31	4.2	מאפייניט ביזכימיים כמדור להשפעת שיטות ההפרדה
32	4.3	השפעת קרינת גמא על הלימפוציטים המתקבלים בשתי שיטות ההפרדה
35	5	סיכום
36		הבעת תורה
37		סימוכין

1.1 תיאור אוכלוסיית הלימפוציטים

הלימפוציטים, המצויים רק בבעלי חוליות, הם התאים המרכזיים במערכת האימונולוגית של הגוף, שתפקידה להגן עליו מפני זיהומים ומחלות. אצל היונקים מהווים הלימפוציטים כ-1% מהמשקל הכולל של הגוף. גוף האדם מכיל בממוצע כ- $10^{12}$  לימפוציטים והם מהווים כ-20%-25% ממספרם הכולל של האים הלבנים<sup>(1)</sup>. תיאורם האנטומי המרויך ניתן לראשונה בשנת 1891 על-ידי Ehrlich ואז גם נקבע שמם, אך הבנת התיפקוד שלהם וחיבתם במערכת האימונולוגית של הגוף החלו להתברר רק במשך שתי עשרות השנים האחרונות<sup>(2)</sup>.

הלימפוציטים נוצרים מתאי-אם הנורדים משק החלמון, הכבד העוברי, הטחול ומוח העצם אל הרקמות הלימפחיות העיקריות שהן הטימוס והבורסה של פבריציוס (Borsa of Fabricius) - בעופות. כיונקים מוחלפת הבורסה של פבריציוס על-ידי הכבד העוברי ומוח העצם. באיברים אלה עוברים הלימפוציטים פרוליפרציה ודיפרנציאציה והופכים להיות לתאים בעלי כושר לבצע תגובות אימונולוגיות. הלימפוציטים, שאך זה עברו דיפרנציאציה, נודדים אל האיברים ההיקפיים של המערכת הלימפואידית כמו הטחול, בלוטות הלימפה וה-Payer's patches שבמעיים.

הדיפרנציאציה המתרחשת באיברים המרכזיים של המערכת הלימפית, אינה תלויה באנטיגנים; באיברים ההיקפיים של המערכת חלה פרוליפרציה ודיפרנציאציה נוספת וזו קורית כתוצאה מחשיפה לאנטיגן.

מהאיברים ההיקפיים יוצאים התאים אל מערכת הלימפה ההיקפית המתנקזת אל צינור הלימפה הראשי (right thoracic duct) ה ניל אל הלב ואל זרם הדם. הלימפוציטים שברקמות נמצאים במצב של שיווי משקל דינמי עם הלימפוציטים שבמערכת הדם הפריפרי. הלימפוציטים בדם הפריפרי, למרות היותם דומים מבחינה מורפולוגית, מהווים למעשה אוכלוסייה הטרונ-גנית שניתן לחלקה לפי מספר קריטריונים<sup>(3)</sup>.



### 1.1.1 משך החיים

אצל האדם, כשליש מהלימפוציטים הם בעלי משך חיים של כ-10 עד 20 יום והאחרים יכולים להגיע עד חמש שנים ויותר.

### 1.1.2 גודל

מבחינת הגודל ניתן לחלק את הלימפוציטים לשתי קבוצות עיקריות:

(א) לימפוציטים קטנים שקוטנם  $8+6$  מיקרון ונפחם  $300+200$  מיקרון מעוקב;

(ב) לימפוציטים גדולים שקוטנם  $9+5$  מיקרון ונפחם  $9000+3000$  מיקרון מעוקב.

יש הנוהגים לאפיין קבוצה שלישית של לימפוציטים בינוניים. אצל האדם הבוגר הנורמלי, 10% מהתאים הם לימפוציטים גדולים והשאר - קטנים. הלימפוציטים הגדולים הם ברובם קצרי חיים ובקרב הלימפוציטים הקטנים קיימת אוכלוסיה של ארוכי חיים.

### 1.1.3 תפקוד

מבחינת התפקוד מחלקים את הלימפוציטים לשתי תת-אוכלוסיות עיקריות:

(א) תאי T - על קבוצה זו נמנים הלימפוציטיט הפריפריאליים שעברו דיפרנציאציה בטימוס

לפני יציאתם לרקמות הלימפואידיות הפריפריאליות. אלה ברובם תאים קטנים יותר

ומקובל לחשוב שהם גם בעלי משך החיים הארוך יותר. תאי T הפוגשים אנטיגן עוברים

שורה של שינויים תאים הנגמרים ביצירת לימפובלסט. הם מסנטזים לעצמם את

המרכיבים הדרושים להם אך אינם מפרישים גופיפי נגד (Antibodies). תאי T אחראים

על מספר תופעות הקשורות בחיסון המתווך על-ידי תאים (cell mediated immunity)

כמו: רגישות יתר מושהית (delayed hypersensitivity); דחיית שתלים; פעילות

ציטוטוקסית של התאים; תגובות בריאקציות מעורבות של לימפוציטים

(mixed lymphocyte reaction).

(ב) תאי B - תאים אלה התגלו לראשונה בעופות בכורסה של פבריציוס ומכאן שמו. אצל

יונקים, הם עוברים דיפרנציאציה בכבד העוברי או במח העצם לפני יציאתם לרקמות

הלימפואידיות הפריפרייות שהן כעיקרון קשורות למעי כמו התוספתן

(appendix), Peyer's patches, וישקדים (tonsils).

באדם הבריא הנורמלי מהווים תאי B-15% עד 30% ותאי T-כ-55% עד 75% מכלל

הלימפוציטים בדם הפריפרי.

התפקיד המרכזי שממלא הטימוס בתהליכים האימונולוגיים נקבע לראשונה על-ידי J.E.A.P. Millet בלונדון ועל-ידי Yancovie ו-Waksman בכוסטון בין השנים 1961-1962. באותו זמן עברו שתי קבוצות נוספות על אותם נושאים P. A. Good וקבוצתו במינסוטה, ו-M.L. Warner במלבורן. עבודותיהם הן שהיו למעשה את הבסיס להבנת שיתוף הפעולה בין אוכלוסיות התאים. כיום ידוע כי כדי לקבל תגובה חיסונית תקינה ררושה נוכחותם של מקרופאגים וכן נוכחות נורמלית של תת-האוכלוסיות של הלימפוציטים כיהם מספרי נכון, תיפקוד נכון של כל אחת מהן בנפרד ושיתוף פעולה ביניהן<sup>(1,4-6)</sup>.

## 1.2 הפרדת הלימפוציטים מתוך הרם המלא

אחת הבעיות העיקריות בעבודה עם הלימפוציטים, כאשר באים לנסות ולקבוע בהם מאפיינים כלליים, היא העובדה שקיימים הברלים אישיים בין פרט לפרט, בין ארם אחד למשנהו, גם כשהמורבר הוא בקבוצת אנשים בריאים ונורמלים בני אותה קבוצת גיל. הרברים אמורים הן לגבי התמונה המורפולוגית והן לגבי בריקה של תיפקודים אימונולוגיים, כמו טרנספורמציה של לימפוציטים *in vitro*. אפילו נלקח אותו תורם ונעשתה בו סדרות בדיקות בהפרשי זמן - גם אז נתקבלו תוצאות השונות זו מזו<sup>(7-9)</sup>.

אחד הדברים שהקשו על קבלת מידע על הלימפוציטים מן הדם הפריפרי היה חוסר היכולת לקבל פרפרט נקי של לימפוציטים שהופררו מתוך הרם המלא. שיטות ההפרדה הפשוטות ביותר התבססו על שקיעת התאים האדומים בכוח הכובד או השקעתם בדרך של סירכוז. בשיטה זו מתקבלת פרקציה עליונה הענייה בתאים אדומים, אך מכילה אוכלוסיה מגוונת של תאים לבנים. בהמשך החלו מפעילים שלב נוסף של ניקוי על-ידי העברתו של פרפרט הדם העני בתאים אדומים דרך קולונה של צמר זכוכית או סיבי ניילון, או השראתו לזמן מה בתוך בקבוק של תרבות רקמה ששטח דפנותיו גדול. המקרופאגים וטסיות הדם נצמדים לסיבי הניילון, לסיבי הזכוכית או לדפנות הכלי, ובאופן כזה הם מורחקים מתוך תרחיף התאים. מתקבלת דוגמת רם המכילה אחוז גבוה יותר של לימפוציטים ויש בה כל הלימפוציטים מכחינת הגורל שלהם. אם מניחים לאוכלוסיה זו לעבוד אינקובציה של מספר שעות בתוך קרקע המזון, אזי הלימפוציטים הגרולים מתים ונשארים רק הלימפוציטים הקטנים. החסרון של השימוש בקולונה של סיבי ניילון או סיבי זכוכית הוא בכך שהם גורמים לשינויים ממכרנליים בתאים<sup>(10)</sup>.

התפתחות נוספת חלה בחקר הלימפוציטים עם פיתוחן של שיטות להפרדתם על-ידי גרדיינט של צפיפויות. תחילה השתמשו ליצירת הגרדיינט בקסטרו (Dextran) שהוא פולימר גבה-מולקולרי של (D-glucopyranose) המסוגלת מסוכרוז (Sucrose) על-ידי חיידקים. בשיטה זו מקבלים העשרה של כמות הלימפוציטים, אך הפרפט המתקבל אינו נקי לגמרי מתאים אחרים.

בשנת 1964 התפרסמה שיטתו של A. Böyum<sup>(11)</sup> להפרדת תאי רט לבנים והיא הותאמה להפרדת לימפוציטים<sup>(12)</sup>. השיטה מבוססת על השימוש בתמיסה של Metrizoate המכילה פוליסקריד.

החומר שמקובל להשתמש בו כיום הוא Ficoll-Paque. זוהי תמיסה המכילה פיקול 400 (מ.מ. 400000) שהוא פולימר של סוכרוז, Epichlorohydrin המסיס בקלות במים וכן sodium diatrizoate, הגורם לתמיסה להיות בעלת צמיגות נמוכה וצפיפות גבוהה.

במערכת ההפרדה יש שתי פאזות מימיות: האחת היא שכבת ה-Ficoll-Paque בעלת הצפיפות הגבוהה, שעל גביה מניחים את נוזל הרם המיועד להפרדה. החומר עובר סירכוז ממושך שבמהלכו מתחלק הדם המלא לשתי פרקציות עיקריות: תאי הדם האדומים והגרנולוציטים שוקעים לתחתית המבחנה ואילו הלימפוציטים יחד עם המונוציטים וטסיות הדם נשארים באינטרפזה בין הפיקול והרוגמה. לאחר הוצאת הלימפוציטים נעשית שטיפה המרחיקה את טסיות הדם ומתקבל פרפט המכיל 95%±5 לימפוציטים שרמת החיוניות שלהם גבוהה והם מהווים 50%±15 מתוך כלל הלימפוציטים שהיו בדוגמת הדם המקורית.

יתרונה הגדול של שיטת ההשקעה הוא בכך, שיש בה התערבות מיזערית של גורמים חיצוניים העלולים להשפיע על התאים. אולם אוכלוסיית התאים המתקבלת היא הטרוגנית ומכילה גם תאי דם נוספים מלבד הלימפוציטים.

ההפרדה באמצעות גרדיינט הצפיפויות עם פיקול מפעילה גורמים כימיים ופיסיקליים על התאים ועלולה לגרום להם לשינויים. יתרונה הגדול הוא בכך שמרבית התאים שאינם לימפוציטים, מורחקים.

### 1.3 טרנספורמציה של לימפוציטים

בדם הפריפרי נמצאים הלימפוציטים במצב ניח ( $G_0$ ). המטבוליזם שלהם נמוך, סינתזת DNA נמוכה ביותר ואין חלוקת תאים. ניתן לגרום ללימפוציטים לעבור שיפעול *in vitro* על-ידי חשיפתם למיטוגנים. המיטוגנים מעוררים סינתזת DNA בלימפוציטים וגורמים לחלוקה. לקטינים רבים מצמחים ידועים בהשפעתם המיטוגנית על הלימפוציטים של האדם. הלקטינים הם חלבונים, או גלקופרוטאינים, הנקשרים לשיירים קרבוהידרטים ספציפיים שעל פני שטח התא. בניגוד למרבית האנטיגנים, הלקטינים הם מיטוגנים כלליים המשפעלים אוכלוסיות של לימפוציטים<sup>(1)</sup>.

lymphocyte transformation הוא המונח שהשתמש בו לראשונה Nowell בשנת 1960,<sup>(13)</sup> כדי לתאר את השינוי המורפולוגי המתרחש בעת שלימפוציט קטן הנמצא במצב ניח, עובר טרנספורמציה ללימפובלסט, לאחר שנחשף לאנטיגן ספציפי או למיטוגן לא ספציפי. הטרנספורמציה של הלימפוציטים *in vitro* היא תהליך המייצג תופעה החלה *in vivo* כאשר לימפוציט מגיב עם אנטיגן לו הוא דגיש באופן ספציפי. בטכניקה זו משתמשים כדי לברוק את הכושר האימונולוגי התאי של חולים.

התהליכים הביוכימיים המתרחשים בתאים שעברו שיפעול, כוללים תופעות מוקדמות הקשורות בממברנה, כמו למשל:

(א) הגדלת החרירות לקטיונים חר-ערכיים ( $K^+$ ,  $Na^+$ ) ורו-ערכיים ( $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ )<sup>(15,14)</sup>.

(ב) הגדלת הסינתזה של פוספוליפידים<sup>(16)</sup>.

(ג) הגברת הקליטה של יורירין<sup>(17)</sup>.

(ד) שינוי בפוטנציאל הממברנה של הלימפוציט<sup>(18)</sup>.

לאחר מכן מתרחשים תהליכי סינתזה של חלבונים, DNA, RNA.<sup>(19,1)</sup>

תופעה אחרונה זו של הגדלת סינתזת ה-DNA, מסתיימת בחלוקת התאים, מהווה את הבסיס למרבית הבדיקות הקליניות שנועדו לבדוק את כושרם של הלימפוציטים לעבור טרנספורמציה.

בבדיקות מסוג זה מקובל להשתמש בחומרים מיטוגניים שונים כמו, PHA

(Phytohemagglutinin), המשפעל כ-80% מהתאים וכן בחומרים הידועים כיכולתם הספציפית

לשפעל רק חלק מהתאים. מיטוגן לא ספציפי משפעל רק כ-30% מהתאים. כמו-כן מקובל להשתמש באנטיגנים המשפעלים רק את אותם התאים הרגישים לאנטיגן הנבדק. בניגוד לשימוש במיטוגנים, הרמה של סינתזת ה-DNA נמוכה יותר ויש להמתין זמן ארוך יותר לקבלת התגובה המקסימלית. החומרים המקובלים ביותר, הידועים ביכולתם הספציפית לשפעל תאי T או תאי B, מסוכמים בטבלה 1.

טבלה 1 מיטוגנים המשפעלים תת-אוכלוסיות של לימפוציטים

מיטוגן	קיצור	מקור ביולוגי	השפעה ספציפית יחסית
Phytohemagglutinin	PHA	Phaseolus Vulgaris (Kidney bean)	תאי T
Pokeweed Mitogen	PWM	Phytolacca Americana	תאי B
Concanavalin A	Con-A	Conavalia Ensuformis (Jack bean)	תאי T

#### 1.4 השפעת קרינה מייננת על תאי יונקים

מרבית המידע על השפעות הקרינה המייננת על מערכות ביולוגיות, לקוח מתוך ניסויים שנעשו בעלי חיים, במערכות *in vitro* של תאים שנחשפו לקרינה בתרבות, או בכדיקות של חולים שקיבלו טיפול על-ידי הקדנה.

הדעה הרווחת כיום היא, שהקרינה גורמת לנזק שהוא בעל פוטנציאל לטאלי והוא יגרום למות התאים אם לא יתוקן.

כאשר תאים נחשפים לקרינה חלה בהם סינתזת DNA שאינה תלויה בשלב בו נמצא התא במעגל חייו (cell cycle); סינתזה זו חלה גם כאשר התא אינו נמצא בשלב הסינתזה הרגיל שלו והיא מכונה "unscheduled DNA synthesis". היא איננה סמיקונסרטיבית באופייה והיא מייצגת את היכולת של התאים לחקן נזק שנגרם ל-DAN.

אם לאחר ההקרנה שומרים את התאים במצב שהוא פחות מאופטימלי הדרוש להם לביצוע תהליכים של חלוקת התא, מקבלים הגברה של אפקט התיקון של הנזק בעל הפוטנציאל הלטאלי.

רגישותם של התאים לקרינה משתנה בהתאם לשלב בו נמצא התא במעגל חיו: תאים שהם בעלי שלב  $G_1$  קצר, מראים רגישות רבה לקרינה בשלב ה- $G_2$ . הם פחות רגישים בשלב ה- $G_1$  ועמירים ביותר לקראת סוף שלב ה-S. התאים שבהם שלב ה- $G_1$  ארוך, מראים רגישות נמוכה ביותר לקרינה במשך רוב שלב ה- $G_1$  ורק לקראת סוף השלב רגישותם גולה. שינויי הרגישות האחרים רומים לאלה שבתאים בעלי שלב  $G_1$  קצר<sup>(20)</sup>.

### 1.5 השפעת הקרינה המייבנת על הלימפוציטים

הלימפוציטים נמנים על סוגי התאים הרגישים ביותר לקרינה, הן באדם והן בחיות. ירידה במספר הכללי של הלימפוציטים בדם הפריפרי ניתן לגלות כבר אחרי חשיפה כל-גופית לדוזה של 25 ראד. בנוסף על ההפחתה במספרם חלים בלימפוציטים גם שינויים מורפולוגיים כתוצאה מהקרינה<sup>(21)</sup>.

הלימפוציטים מתנהגים באופן שונה משאר התאים, באשר למועד שבו הם מתים, לאחר שנחשפו לקרינה.

מרבית התאים, בהיחשפם לדוזות מתונות של קרינה (50+100 ראד), אינם מתים אלא לאחר המיטוזה הראשונה או השניה שלאחר החשיפה. מוות זה מכונה "mitotic death".

בלימפוציטים אנו מוצאים תופעה לפיה דוזות נמוכות יחסית של קרינה יכולות לגרום למוות מידי של התאים, מבלי שייכנסו כלל למעגל המיטוטי. תופעה זו מכונה בשם "interphase death".

סף הקרינה שמעליו ניתן לגלות מחלות במערכת הדם כתוצאה מקרינה, הוא 100 ראד לכל הגוף. פגיעה כזו עלולה לגרום כעקבותיה התפתחות זיהומים כתוצאה מאבדן הלימפוציטים מן הדם הפריפרי ופגיעה בתאים המייצרים דם במח העצם. זיהומים הם מן הגורמים העיקריים למוות כתוצאה מחשיפה של אנשים לקרינה בטווח הקצר. בטווח הארוך - יש סיכוי גבוה יותר לפתח סרטן כתוצאה מפעולה בלתי סדירה של המערכת האימונולוגית<sup>(20)</sup>.

גם בבדיקות של הלימפוציטים שנעשו *in vitro* התגלתה רגישותם הרבה לקרינה. לימפוציטים נורמליים של אדם מראים שינוי בכושר התנועה שלהם ושינויים מורפולוגיים כבר לאחר חשיפה של 2+5 ראד, כאשר הם מוקרנים ונשארים בתרבות זמן מה לאחר ההקרנה<sup>(21)</sup>.

לימפוציטים ששופעלו בתרכות על-ידי הוספת מיטוגן מראים עמידות גבוהה יותר לקרינה<sup>(22)</sup> מאשר תאים בלתי משופעלים. התהליך המדוייק האחראי למתן השפעה מגינה זו אינו ברור די הצורך, אך ההנחה היא שהאקטיבציה, המעלה את הפעילות המטבולית של התא, גורמת גם לשיפועלה של המערכת האנזימתית הקשורה בתיקון נזקי הקרינה. כבר הראו שקיימת התאמה בין מידת השיפועל של התאים לבין כושרם לתקן נזקי קרינה<sup>(23)</sup>.

בריקות העלו שתת-האוכלוסיות של הלימפוציטים שונות זו מזו ברגישותן לקרינה, אך הקביעה מי משחי הקבוצות העיקריות רגישה יותר - שנוייה במחלוקת. קביעה זו חשובה מאד כאשר באים להעריך את מצבו האימונוולוגי של אדם שנחשף לקרינה, הן מסיכנת רפואיות והן כעקבות תאונה.

רשימה של מספר עבודות וסימוכין שתוצאותיהן מדגימות את הסתירה הקיימת לגבי הקביעה איזו היא תת-האוכלוסיה של הלימפוציטים הרגישה יותר לקרינה, מובאת בטבלה 2.

תוצאות סותרות אלה גרמו לנו לחשוב שההבדלים שקיבלו החוקרים השונים, הם פועל יוצא של שיטות העבודה השונות ואינם מייצגים הבדלים ברגישות של תת-האוכלוסיות של הלימפוציטים, לקרינה.

טבלה 2 ממצאי מחקרים אודות רגישותן לקרינה של תת-אוכלוסיות הלימפוציטים.

הסימון	החוקר	הבדיקה	תוצאה
(25)	P. T. Hoppe Cancer 40 (1977) 2071	בדיקת חולים	אין הבדל ברגישות
(26)	K. Indestroen Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys. 5 (1979) 1761	בדיקת חולים	תאי B רגישים יותר
(27)	M. Bolla J. Radiol. 60 (1979) 695	בדיקת חולים	תאי T רגישים יותר
(28)	Ben Smit Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys. 5 (1979) 1841	בדיקת חולים	אין הבדל ברגישות
(29)	E. Baral Acta Radiol. Therapy Phys. Biol. 15 (1976) 149	במכונה	תאי B רגישים יותר
(30)	J. Sprent Europ. J. Immun. 2 (1974) 204	במכונה	תאי T רגישים יותר
(31)	J. S. Prosser Int. J. Radiat. Biol. 30 (1976) 459	במכונה	תאי B רגישים יותר
(32)	A. Facchini Radiat. Res. 68 (1976) 339	במכונה	תאי T רגישים יותר



## 2 שיטות וחומרים

### 2.1 לקיחת הדם והפרדתו

20 מ"ל דם ורידי נלקחו במזרק שנשטף בהפריין (Evans Medical Ltd., UK) מתורמים בריאים, גברים, שגילם נע בין שלושים לארבעים שנה. הדם נחלק לשניים ומכל חלק הופרדו הלימפוציטים כאחת משתי השיטות הבאות:

#### 2.1.1 הפרדה בדרך השקיעה

הדם הוכנס לתוך כלי שהושם באינקובטור בטמפרטורה של  $37^{\circ}\text{C}$  למשך 90 דקות. תאי הדם האדומים שקעו לתחתית הכלי, והפלסמה המכילה את תאי הדם הלבנים ואת הלימפוציטים - המרוכזים בעיקר מעל לשכבת תאי הדם האדומים - נאספה בעזרת מזרק. התרחיף עבר סירכוז של 10 דקות במהירות של 400 g, הפלסמה הורחקה והתאים הורחפו בקרקע מזון Hepes Buffer 20 mM + RPMI 1640 (Bio-Lab Ltd., Israel) ואנטיביוטיקה (Combined Antibiotics, Bio-Lab Ltd., Israel). התאים נספרו ועברו מיהול סופי בתוך קרקע המזון לריכוז הלימפוציטים הרצוי.

#### 2.1.2 הפרדה נאמצעות *Ficoll-Paque*

מהמחצית השנייה של דוגמת הדם הופרדו הלימפוציטים לפי שיטת  $\text{B}^{\text{ø}}\text{yum}$  (12) שעיקריה הם:

- (א) מוהלים הדם המלא ביחס 1:1 עם PBS (Phosphate Buffered Saline - Bio-Lab., Israel) שחומם לטמפרטורה של  $37^{\circ}\text{C}$ .
- (ב) מכינים מבחנות שבכל אחת מהן 3 מ"ל *Ficoll-Paque* (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden).
- (ג) מניחים בזהירות על גבי החומר 4 מ"ל מהדם המהול.
- (ד) מסרכזים המבחנות במשך 30 דקות בטמפרטורת החדר במהירות של 400 g.
- (ה) על פני הפיקול מתקבלת "טבעת" לבנה של תאים אותה אוספים בזהירות בעזרת פיפטת פסטור; היא מכילה את הלימפוציטים וכן מונוציטים וטסיות דם.
- (ו) את התאים שהופרדו שוטפים פעמיים ב-PBS, כשבכל פעם מסרכזים 10 דקות במהירות של 400 g להרחקת טסיות הדם.
- (ז) מרחיפים התאים בקרקע המזון בריכוז הרצוי.

## 2.2 הכנת הפרפרט למיקרוסקופ האלקטרוניים

הכנת הפרפרט נעשתה כעיקרה לפי Peter Biberfeld<sup>(33)</sup>, כשינויים מסויימים: תאי הרם שהתקבלו בכל אחת משיטות ההפרדה הורחפו בקרקע המזון לריכוז סופי של 1 מיליון לימפוציטים בכל 1 מ"ל של תרחיף. ככל מיקרה שהתאים שהו בתרבית ולא עברו פיקסציה מיידית, הכיל המדיום 15% פלסמה אוטולוגית. התאים חולקו למבחנות פלסטיק (Tissue Culture Tubes, Nunc, Denmark).

כאשר ניתן המיטוגן PHA (Phytohaemagglutinin, Wellcome, England) הוא ניתן במיהול סופי של 1/50 מהחומר המקורי. התאים הודגרו באינקובטור בטמפרטורה של 37°C למשך כל זמן הגידול הרצוי.

בתום תקופת הגידול הוחלף קרקע המזון בקרקע מזון חסר פלסמה ותרחיף התאים הועבר לתוך קפסולות עשויות פוליאתילן, המשמשות להכנת חומר למיקרוסקופ האלקטרוניים. הקפסולות סורכזו במשך 10 דקות ב-400 g בטמפרטורת החדר והתאים נצמרו לקרקעיתן. הפיקסציה נעשתה בתמיסת גלוטרלדהיר 3% (Glutaraldehyde Polysciences, USA), בתוך בופר קודילט 0.1 M, pl<sub>i</sub> 7.2±7.4, (Cacodylic Acid Sodium Salt, Ladd, Research), בטמפרטורת החדר (Industries Inc., USA).

בתחילה נמהל קרקע המזון עם תמיסת הפיקסטיב ביחס של 1:1 והתאים שהו בו 5 דקות בטמפרטורת החדר. אחר כך הוחלף הנוזל בפיקסטיב המלא - למשך 30 דקות. הרחפת הפיקסטיב נעשתה על-ידי שטיפה, מספר פעמים, בבופר קודילט. שלב הפוסטפיקסציה נעשה בתמיסה של אוסמיום טטרוקסיד בתוך בופר קודילט (Osmic Acid, BDH Ltd., England) למשך 60 דקות בחושך בטמפרטורה של 4°C. האוסמיום הורחק על-ידי שטיפה בבופר ואחר-כך עברו הדוגמות שלב של ההידרציה עם ריכוזים עולים של אתנול מ-30% ועד 100%.

בשלב האחרון טופלו התאים בתמיסה רווייה של אורניל אצטט בתוך אתנול 100% למשך 10 דקות בחושך (Uranyl Acetate, Ladd, USA).

בהמשך הועברו התאים לפרופילן אוקסיד (Propylene Oxide) ואחר כך לתערובות של פרופילן אוקסיד וארלדיט כשריכוז הארלדיט עולה בהדרגה עד להחלפה בארלדיט מלא (Araldite 502, Ladd, USA). הארלדיט הוכן לפי מתכונת Luft<sup>(34)</sup>. הקפסולות ובהן

הארלדיט המלא, הוכנסו לתנור בטמפרטורה של  $60^{\circ}\text{C}$  למשך הלילה. לאחר שהארלדיט התקשה הוסרו הקפסולות מעל הכלוקים והבלוקים נחתכו במיקרוטום LKB Ultratome III לחתכים בצבע כסף. החיתוך נעשה בעזרת סכיני זכוכית שחוכנו באמצעות LKB Knife Maker Type 7801 B. הדוגמות נאספו על גרידים מנחושת. הגרידים נצבעו באורניל-אצטט וכעופרת ציטרט (Lead Citrate Polysciences, USA).

ההסתכלות בחומר נעשתה בעזרת שני מיקרוסקופים אלקטרוניים:  
Philips - EM 201; Jeol - JEM 100 B.

### 2.3 קליטת תימידין מסומן בטריטיום לתוך ה-DNA של לימפוציטים בלתי משופעלים

לאחר ההפרדה הורחפו התאים בקרקע מזון, שהכיל 15% פלסמה אוטולוגית, ונזרעו במיני-פלטות (Nunc, Denmark, "U" shape Microculture Plates) בריכוז של  $10^5$  תאים בכל. באר בכפח של 0.1 מ"ל.

הפלטות הודגרו באינקובטור, בטמפרטורה של  $37^{\circ}\text{C}$ . ברווחי זמן קצובים ניתן לדוגמות תימידין מסומן בטריטיום ( $\text{H}^3$ -Thymidine-methyl 1-T 36.5 Ci/mM, NRCN) לכל 2  $\mu\text{Ci}$  באר. התאים הודגרו למשך שעתיים. בתום תקופת ההדרגה נקצרו התאים באמצעות מכשיר אוטומטי (Automatic Cell Harvester-Titertek, Skatron A.S. Lielyen, Norway) תוך שימוש במים מזוקקים ובפילטרים של סיבי זכוכית (glass fiber filters).

הפילטרים יובשו באוויר והושמו לתוך בקבוקי מנייה שהכילו נוזל סינטילציה על בסיס טולואן.

בקבוקי המנייה נמנו במכשיר המנייה  
(Liquid Scintillation Spectrometer- Tri- Carb, Packard Inc, USA).

כל רוגמה נעשתה בשלוש חזרות.

### 2.4 הקרנת לימפוציטים מופרדים בקרינת גמא

לאחר ההפרדה הורחפו התאים לריכוז סופי של 1 מיליון תאים במ"ל בתוך קרקע מזון שהכיל 15% פלסמה אוטולוגית. התאים הוקרנו בקרינת גמא ממקור  $\text{Co}^{60}$  (Gamma Cell 200 - Atomic Energy of Canada Limited). קצב ההקרנה היה 15 ראד לשניה. ההקרנה נעשתה בטמפרטורת החדר. בתום ההקרנה נזרעו התאים כמפורט בסעיף 2.3.

2.5 בדיקת טרנספורמציה של לימפוציטים מוקרבים - בהשפעת מיטוגנים

התאים שנברקה בהם השפעת הקרינה על הטרנספורמציה קיבלו, כעת שנזרעו, לאחר הקרנתם, אחד משלושת המיטוגנים הכאים:

PHA - (Wellcome, England) במיהול סופי של 1/50 מהחומר המקורי.

PWM - (Pokeweed Mitogen, Grand Island Biological Company, USA) במיהול סופי של 1/25 מהחומר המקורי.

Con A - (Concanavalin A - Pharmacia Fine Chemical, AB Uppsala, Sweden) בריכוז סופי של 5 מיקרוגרם למ"ל.

המיטוגנים נבדקו קודם לכן במספר ריכוזים, כדי למצוא את הריכוז שבו ניתן את

הטרנספורמציה המקסימלית בתנאי הניסוי.

הפלטות הודגרו באינקובטור למשך פרק הזמן הרצוי ובתום התקופה קיבלו תימידין מסומן

בטריטיום ונקצרו כמפורט כסעיף 2.3.

2.6 בדיקת יצירת רוזטות עם כדוריות דם אדומות של כבש

התאים שהתקבלו בשתי שיטות ההפרדה נבדקו לגבי כושרם ליצור רוזטות עם כדוריות דם אדומות של כבש (על פי סימון 53). נבדק כושרם של לימפוציטים מקבוצת ה-T ליצור E רוזטות ושל לימפוציטים מקבוצת תאי ה-B ליצור EAC רוזטות.

### 3 תוצאות

#### 3.1 שינויים מורפולוגיים

##### 3.1.1 המורפולוגיה של הלימפוציט הבלתי משופעל

במיקרוסקופ האלקטרוני נראה הלימפוציט הבלתי משופעל כחא עם גרעין המכיל הטרוכרו-מטין צפוף ובו אזורים פחות צפופים המכילים אוכרומטין. ברוב התאים הגרעין הוא בעל צורה עגולה, אך בכ-20%÷30 מהלימפוציטים רואים שקיעה של הגרעין (invagination). הגרעין מוקף בממברנת הגרעין. הציטופלסמה מכילה אורגנלים האופייניים לתאים אוקריוטיים, אך מרביתם אינם מפותחים. מוצאים מספר מיטוכונדריות והן, בדרך כלל, קטנות ו"כהות". לעיתים מוצאים מיקרוטובולי. יש איזור קטן של גולג'י המכיל וקואולות ואסיקולות וליזוזומים. רואים הרבה ריבוזומים חופשיים ולעיתים רטיקולום אנדופלסמטי מגורגר. הממברנה מראה לעיתים שלוחות (3,8,35).

בציור 1 נראה הלימפוציט האופייני מהדם הפריפרי. דוגמת הדם עברה הפרדה על פיקול והלימפוציטים עברו פיקסציה מיידית לאחר ההפרדה. בציור 2 נראה הלימפוציט האופייני, לאחר שהופרד מן הדם המלא בדרך של שקיעה ועבר פיקסציה מיד לאחר ההפרדה. בתמונות אלה ניתן לראות שאוכלוסיית הלימפוציטים אינה אחידה, אך לא נראה הבדל עקרוני בין התאים שהתקבלו בשתי שיטות ההפרדה, כאשר הפיקסציה נעשית מיד בתום ההפרדה.

##### 3.1.2 השינויים המורפולוגיים החלים בלימפוציטים כתוצאה משיפועל

בציורים 3, 4, 5 נראים הלימפוציטים שגדלו בתרבות עם המיטוגן PHA במשך 72 שעות. התמונות מדגימות את השינויים הבאים החלים בלימפוציטים כתוצאה משיפועל (33, 36, 37, 38, 39):

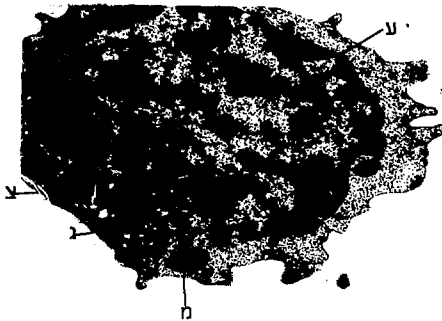
(א) הקטנת איזור ההטרוכרומטין והגדלת הגרעינון (ציור 3);

(ב) ריבוי מספר, הגדלה ושינוי קונפיגורציה של המיטוכונדריות (ציורים 3 ו-4);

(ג) יצירת אזורי מגע בין התאים (ציור 5);

(ד) פולריזציה של הציטופלסמה והתפתחות אורפוד המכיל אורגנלים תאים (ציור 4).

לא בכל התאים שנבדקו נמצאו כל השינויים המורפולוגיים גם יחד, אך בכ-80% מן התאים ניתן היה לראות לפחות את אחד השינויים המורפולוגיים המצביע על שיפועל.



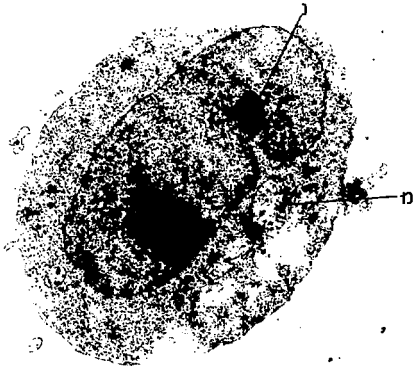
ציור 1 לימפוציט בלתי משופעל שעבר פיקסציה מיידית לאחר הפרדה מן הדם המלא בעזרת פיקול. הגדלה פי 15000.

ע - גרעין; מ - מיטוכונדריה; ג - גולג'י; צ - צנטריול.



ציור 2 לימפוציט בלתי משופעל שעבר פיקסציה מיידית לאחר הפרדה מן הדם המלא בשיתת השקעה. הגדלה פי 15000.

פ - ציטופלסמה; ר - רטיקולום אנדופלסמתי.



ציור 3 לימפוציט משופעל לאחר גידול של 72 שעות בהרכות בנוכחות המיטוגן PHA. הגדלה פי 7000.  
נ - גרעינון.



ציור 5 יצירת איזורי מגע בין תאים משופעלים, כמו בציור 3. הגדלה פי 24000.



ציור 4 יצירת אורופוד בלימפוציט משופעל, כמו בציור 3. הגדלה פי 5400.

### 3.1.3 השפעת שיטות ההפרדה על שיפועל הלימפוציטים כתלות במשך שהייתם בתרבות

על פי קריטריונים מורפולוגיים

לא כל התאים שנברקו הדגימו את כל השינויים המורפולוגיים האופייניים לתא משופעל.

תא הוגדר כמשופעל אם היה בו לפחות אחד השינויים שנמנו בטעיף 3.1.2. התמורות הכאות מדגימות את עיקרי ההבדלים בין התאים שהתקבלו בשתי שיטות ההפרדה כתלות במשך שהייתם בתרבות:

(א) פיקסציה אחרי 24 שעות בתרבות

1. לאחר הפרדה בפיקול

לאחר 24 שעות בתרבות ניתן היה לראות, בתאים שהופררו על פיקול, הקטנת איזור ההטרוכרומטין, הגדלה ושינוי קונפיגורציה של מיטוכונדריות, ויצירת אזורי מגע בין התאים (ציור 6), פולריזציה של הציטופלסמה (ציור 7) ויצירת אורופוד (ציור 8).

2. לאחר הפרדה בשיטת ההשקעה

בציור 9 מודגם התא השכיח ביותר מבין התאים שהתקבלו לאחר ההפרדה בשיטת ההשקעה. תאים אלה הצטיינו במיעוט מיטוכונדריות הנראות בלתי פעילות, ברובן, ובגרעין הטרוכרומטי.

(ב) פיקסציה אחרי 48 שעות בתרבות

1. לאחר הפרדה בפיקול

כדוגמות הלימפוציטים שהופררו בפיקול עלתה שכיחותם של התאים המראים את המורפולוגיה המאפיינת מצב של שיפועל. גרעיני התאים מראים יתר הקטנה של אזורי ההטרוכרומטין, המיטוכונדריות נראות פעילות ויש יצירה של מבנים ממברנליים מיוחדים (ציור 10). מוצאים ריבוי התופעה של יצירת קשרים בין התאים (ציור 11) וכן יצירת אורופוד (ציור 12).

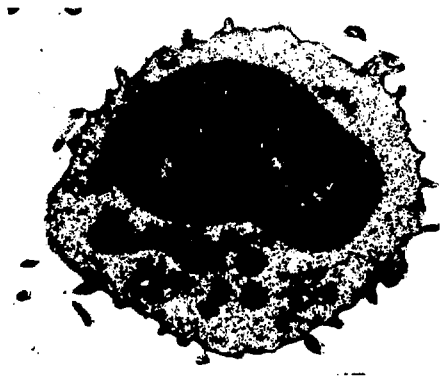
2. לאחר הפרדה בשיטת ההשקעה

במרבית הלימפוציטים שהתקבלו בשיטת ההשקעה, עדיין גדולה השכיחות של תאים שגדעניהם הטרוכרומטיים ויש בהם מעט מיטוכונדריות (ציור 13). לא נראתה התופעה של יצירת קשרים בין התאים (ציור 14) ולא אובחנה התופעה של יצירת אורופוד.





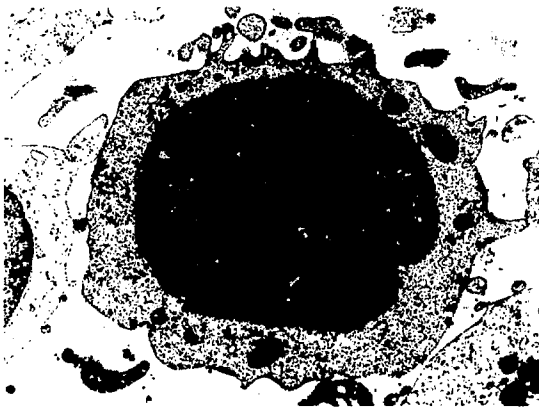
צירור 6 הקטנת איזור ההטרוכרומטין בגרעין זשינוי בקונפיגורציה של המיטוכונדריות. הגרלה פי 12000.



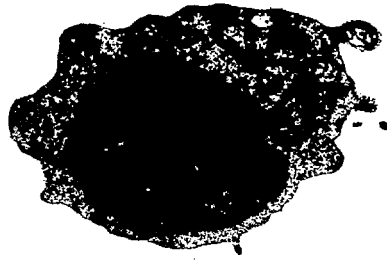
צירור 7 פולריזציה של הציטופלסמה. הגרלה פי 12000.



צילור 8 יצירת אורופוד. הגדלה פי 12000.



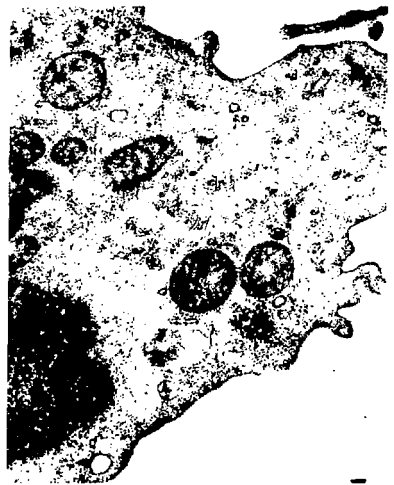
צילור 9 לימפוציט שהופרד מן הדם המלא בשיטת ההשקעה ועבר פיקסציה לאחר שהייה של 24 שעות בתרכות. בתא רואים מעט מיטוכונדריות כלתי פעילות והגרעיין נראה הטרוכרומטי. הגדלה פי 12000.



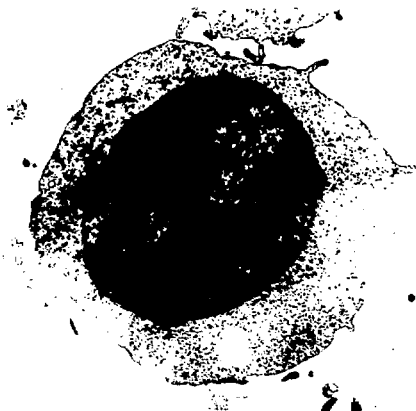
ציור 10 כגרעין התא נראית הקטנה של איזור ההטרוכרומטין והמיטוכונדריות נראות פעילות. הגדלה פי 12000.



בחמונה רואים יציוח קשרים בין התאים. הגדלה פי 42000.



ציור 11 בחמונה נראית יצירה של אורופוד. ציור 12 בחמונה רואים יציוח קשרים הגדלה פי 20000.



ציור 13 גרעין הטרוכרומטי ומיעוט מיטוכונדריות. הגדלה פי 12000.



ציור 14 חוסר יצירת מגע בין התאים. הגדלה פי 18000.

(ג) פיקסציה אחרי 72 שעות בתרבות

1. לאחר הפרדה בפיקול

עלחא שכיחוח התופעה של שינוי בקונפיגורציה של המיטוכונדריות ויצירת קשרים בין התאים (ציור 15), וכן ריבוי האורגנלים, פולריזציה של הציטופלסמה ויצירת אורופוד (ציור 16).

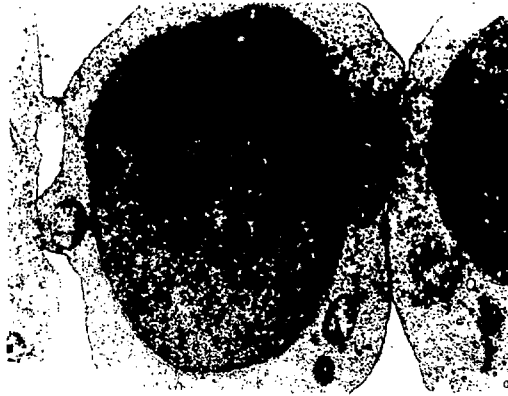
2. לאחר הפרדה בשיטת ההשקעה

התאים שהתקבלו בשיטה זו הצטיינו בחוסר יצירת קשר בין התאים (ציורים 17 ו-18) ובהיעדר מוחלט של חאים בעלי אורופוד.

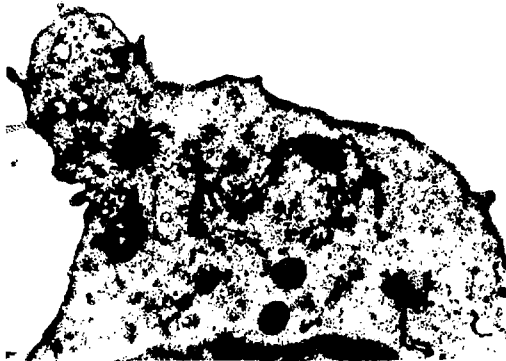
סיכום הממצאים המורפולוגיים מופיע בטבלה 3. תוצאות אלה הן ממוצע של בדיקות שנעשו על 5 חורמים שונים. בבדיקת הדוגמות שהופרדו על פיקול, נספרו בממוצע 40 תאים לכל טיפול. בדוגמות שהופרדו בשיטת ההשקעה נספרו בממוצע 30 תאים לכל טיפול.

טבלה 3 השפעת שיטות הפרדה על שיפוע הלימפוציטים על פי קריטריונים מורפולוגיים כתלות במשך שהיה בתרבות

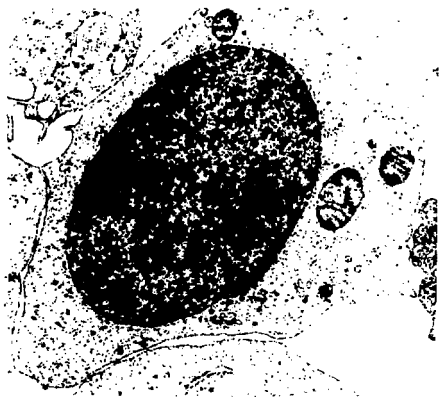
הפרדה בהשקעה			הפרדה בפיקול			התופעה
(אחוז התאים המראים התופעה)			(אחוז התאים המראים התופעה)			
24 שעות	48 שעות	72 שעות	24 שעות	48 שעות	72 שעות	
6	4	-	10	8	4	1. הקטנת איזור ההטרוכדומטיין בגרעין
4	2	2	18	12	10	2. שינוי במיטוכונדריה
-	-	-	15	10	2	3. אזורי מגע בין התאים
-	-	-	10	3	6	4. יצירת אורופוד



ציור 15 הקטנת איזור התרוכרומטין בגרעין, שינוי קונפיגורציה של המיטוכונדריות ויצירת מגע בין התאים. הגדלה פי 12000.



ציור 16 ריבוי אורגנלים, פולריזציה של הציטופלסמה ויצירת האורופור. הגדלה פי 15000



ציור 17 מיעוט מטוכונדריות וחוסר יצירת קשר בין תאים. הגדלה פי 12000.



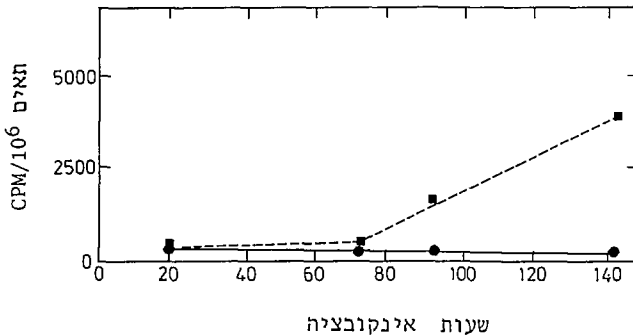
ציור 18 הגדלה של איזור בין תאי. נראה חוסר יצירת קשר בין תאים סמוכים. הגדלה פי 40000.

3.2 השפעת שיטות ההפרדה על מידת השיפוע של לימפוציטים על פי קליטת תימידין

מסומן בטריטיום

בציור 19 מתוארת קליטת התימידין המסומן בטריטיום לתוך לימפוציטים שהופרדו בשתי שיטות ההפרדה, הודגרו בתרכות ללא נוכחות חומר מיטוגני ונקצרו בפרקי זמן שונים של שהייה בתרכות.

בציור נראה, שקליטת התימידין בלימפוציטים שהופרדו על פיקול, עולה בהתמדה והיא ניכרת במיוחד לאחר שהייה של 72 שעות בתרכות. מאירך, אתם תאים שהופרדו בדרך ההשקעה, הדאו שינוי קטן מאד של הקליטה משך כל תקופת המדירה.



ציור 19 קליטת תימידין מסומן בטריטיום לתוך לימפוציטים שהופרדו בשתי שיטות הפרדה. התאים שהו בתרכות ללא נוכחות מיטוגן ונקצרו בתום תקופת הדגרה של 72 שעות.

- תאים שהופרדו על פיקול -
- תאים שהופרדו בשיטת ההשקעה -



### 3.3 עמידות לקרינת גמא של לימפוציטים שהופרדו בשתי שיטות ההפרדה

בציור 20(א) מתוארת קליטת התימידין המסומן בטריטיום, לתוך תאים שהופרדו בשתי שיטות ההפרדה והוקרנו בקרינת גמא לפני שהורגרו בתרבית. התאים שהו בתרבית משך 72 שעות בטרם נקצרו. הערכים מבוטאים באחוזי קליטה מכיקורת בלתי מוקרנת. בשני הטיפולים מבחינים בירידה חדה של קליטת התימידין ער לדוזה של 680 ראד. בדוזות גבוהות יותר הירידה מתמתנת ומתייצבת. התאים שהופרדו על פיקול, מראים ירידה גדולה יותר של הקליטה מאשר התאים שהופרדו בדרך של השקעה.

ההבדל בדוזה הגורמת לירידה של 50% בקליטת התימידין ( $De_{50}$ ) בתאים שהופרדו על פיקול קטנה כדי מחצית מזו הנדרשת ליצירת אותה תופעה בתאים שהופרדו בדרך ההשקעה (טבלה 4).

טבלה 4 דוזה הקרינה בראד הגורמת לירידה של 50% בקליטת התימידין הרדיואקטיבי ( $De_{50}$ ).

שיטת ההפרדה		המיוגן
פיקול (ראד)	השקעה (ראד)	
40	60	נייחים
180	180	PHA
180	180	PWM
135	255	Con A

### 3.4 עמידות לקרינה של תאים נייחים ותאים המשופעלים על-ידי מיטוגנים שונים

התאים הוקרנו וגרלו בתרבית עם שלושת המיטוגנים המופיעים בטבלה 1, משך 72 שעות. נבדקה רגישותם לקרינת גמא על-ידי מדידת כושרם לקלוט תימידין מסומן בטריטיום - במצבם הנייח ולאחר שיפעול.

#### 3.4.1 תאים שהופרדו על פיקול

התאים והופקדו על פיקול הראו רגישות גבוהה לקרינה בהיותם במצב נייד. לאחר השיפוע נראתה הגברת העמידות וזו היתה זהה לגבי האוכלוסיות ששופעלו על-ידי שני המיטוגנים PHA ו-PWM. אוכלוסיית התאים ששופעלה על-ידי Con A, הראתה הגברה של העמידות לקרינה, לעומת תאים בלתי משופעלים; מאידך, עמידותה היתה נמוכה משל האוכלוסיות ששופעלו על-ידי שני המיטוגנים האחרים. הדבר ניכר מהשוואת הדוזה האפקטיבית ( $De_{50}$ ) בטבלה 4. בכל ארבעת הטיפולים, הן בתאים הנייחים והן בתאים המשופעלים על-ידי שלוש המיטוגנים התקבל העקום הטיפוסי המתאר את הירידה בקליטת התימידין בתלות בדוזה ההקרנה<sup>(44,45)</sup>. הירידה היתה חרה ער לדוזה של 680 ראד ואחר כך התמתן קצב הירידה [ציור 20 א)±(ד)]

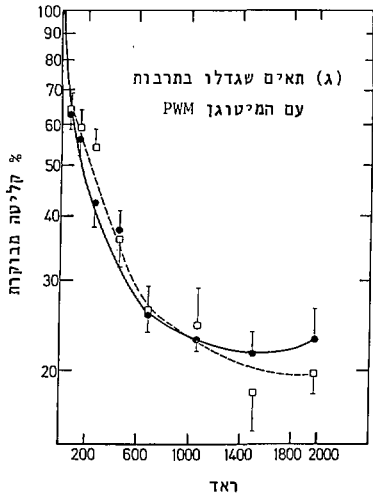
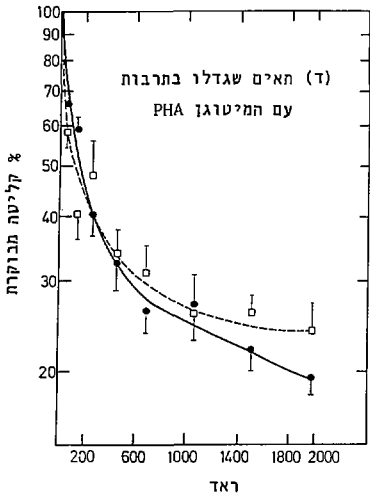
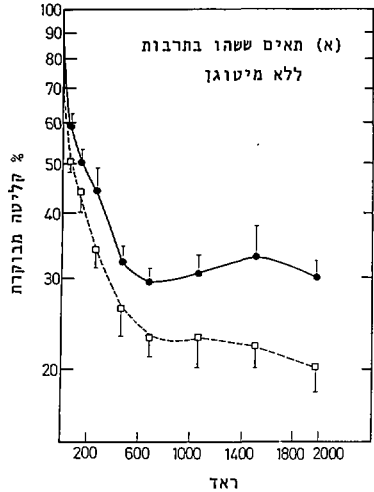
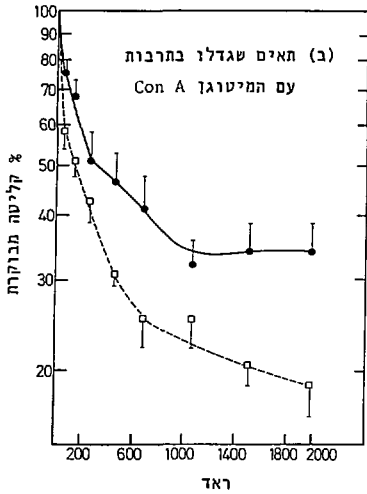
#### 3.4.2 תאים שהופרדו בשיטת ההשקעה

הן בתאים הבלתי משופעלים והן בתאים ששופעלו על-ידי שלוש המיטוגנים התקבל העקום הטיפוסי של ירידה בקליטת התימידין כתלות בדוזה הקרינה. [ציור 20 א)±(ד)]. מתוך השוואת הדוזה האפקטיבית ( $De_{50}$ ) בטבלה 4 מתברר שהתאים הנייחים הראו רגישות רבה לקרינה והשיפוע הגביר את עמידותם. אותה רמה של עמידות נראתה הן באוכלוסיית התאים המגיבים עם PHA והן באלה המגיבים עם PWM. מאידך, התאים המגיבים ל-Con A הראו עמידות גבוהה יותר לקרינת גמר.

#### 3.4.3 השוואת העמידות לקרינה כתלות בשיטת ההפרדה

התאים שהופרדו בדרך של השקעה, גילו עמידות גבוהה יותר לקרינה במצבם הבלתי משופעל מאשר תאים שהופרדו על פיקול (טבלה 4). אוכלוסיית התאים המשופעלים על-ידי PHA ו-PWM, הראו עמידות זהה לקרינה בשתי שיטות ההפרדה. אוכלוסיית התאים ששופעלה על-ידי Con A, גילתה עמידות גבוהה כמעט פי שלושה מזו שהראתה אותה אוכלוסייה בדוגמת הרם שהופרדה על פיקול.

התוצאות המובאות בפרק זה הן ממוצע של בדיקות שנעשו בשמונה תורמים שונים. נעשתה בדיקה סטטיסטית של התוצאות (t - test) ונמצא הבדל מובהק בין האוכלוסיות שהתקבלו בשתי שיטות ההפרדה, של הבלתי מוקרנים ושל אלה המשופעלים עם Con A ( $P < 0.01$ ). בין האוכלוסיות של התאים המשופעלים על-ידי PHA ו-PWM לא נמצא הבדל מובהק בין שתי השיטות.



ציור 20 רגישות לקרינת גמא של לימפוציטים שהופררו בשתי שיטות ההפרדה, הוקרנו מיד לאחר ההפרדה וגרלו 72 שעות עם מיטוגנים. - ● - תאים שהופררו בשיטת ההשקעה. - □ - תאים שהופררו על פיקול;

3.5 יצירת רוזטות מטיפוס E ו-EAC כחלות בשיטת ההפרדה

מספר התאים מתת האוכלוסיות T ו-B כפי שנקבע על פי כושרם ליצור רוזטות מסוג E ו-EAC בהתאמה, מסוכם בטבלה 5.

טבלה 5 אחוז תאי B ותאי T כפי שהתקבלו בשתי שיטות ההפרדה

התאים	ההשקעה (%)	פיקול (%)
תאי B	18.12±3.17	15.48±2.03
תאי T	61.02±4.14	52.83±13.10

בטבלה זו מסוכמים ניסויים שנעשו על תשעה תורמים שונים.

#### 4 דיון בתוצאות

הניסיון לאפיין את תת-האוכלוסיות העיקריות של הלימפוציטים, תאי B ותאי T, כאשר לריגישותן לקרינה, הביא למספר רב של עבודות שהתוצאות בהן מנוגדות. ייתכן, שתהליך הפרדת הלימפוציטים מחוך הדם המלא, גורם להם לשינוי שתוצאותיו באות לידי ביטוי בהמשך הבדיקות. השינוי יכול להיות כתאים עצמם או בהרכב היחסי של תת-האוכלוסיות שלהם.

החלטנו לבדוק השפעתן על הלימפוציטים של שתיים משיטות ההפרדה הקיצוניות המקובלות כמעבדות הקליניות:

(א) השקעה של תאי הדם האדומים מתוך הדם המלא בכוח הכובד ללא התערבות גורם זר, ואיסוף הפרקציה של הלימפוציטים שמעליהם;

(ב) שימוש בגרדיינט צפיפיות עם Ficoll-Paque - תהליך הכרוך בסירכוז ממושך ובשימוש בחומר זר העלול להשפיע על התאים. הבדיקה נעשתה כשיטות מורפולוגיות ובשיטות ביוכימיות.

#### 4.1 שינויים מורפולוגיים המופיעים בלימפוציטים כתלות כשיטת ההפרדה

בעזרת מיקרוסקופ האלקטרוני ניתן להבחין בהבדל מורפולוגי בין הלימפוציט הנייח לבין הלימפוציט המשופעל<sup>(33)</sup>.

בבדיקות מורפולוגיות של הלימפוציטים, שהופרדו בשתי שיטות ההפרדה, נמצא, כי בקרב אותם תאים שהופרדו על פיקול, הופיעה אוכלוסיה של תאים שנשאה פנוטיפ מורפולוגי המאפיין תאים משופעלים. הפנוטיפ המשופעל לא הופיע באותן דוגמות שעברו פיקסציה מיד לאחר ההפרדה, אלא רק בהדרגה ובמקביל למשך שהייה של התאים בתרבית. השינויים התבטאו כמבנה הגרעיני שהפך להיות פחות הטרוכרומטי, שינוי במיטוכונדריות שהתבטא בריכוז מספר, הגדלה ושינוי קונפיגורציה וכשתי תופעות נוספות המעידות על שיפועל: יצירת אורופוד<sup>(36)</sup> ויצירת קשרים בין התאים<sup>(37, 38, 39, 42)</sup>.

עד אשר תהליך השיפעול מוצא את ביטוי המורפולוגי נדרש זמן, ומאחר שלא כל התאים עברו שיפעול אלא רק חלק מהאוכלוסיה, יכולנו למצוא הגברה של הביטוי המורפולוגי, ככל שחלף יותר זמן של שהייה בתרבות. השינויים המורפולוגיים שמצאנו הופיעו רק ב-18% מהתאים שבדקנו, אך מצאנו אותם בעיקר בקרב אותם לימפוציטים שהופרדו מן הדם המלא כאמצעות פיקול. כאותם תאים שהופרדו כשיטת ההשקעה לא ראינו תופעות של יצירת אורופוד ושל יצירת קשרים בין התאים - שתי תופעות אלה אופייניות לאוכלוסיות משופעלות של לימפוציטים.

האפשרות שהפיקול גורם לשיפעול של הלימפוציטים העלתה בעבודתו של Motoe Hirata-Hibi<sup>(40)</sup>. חוקר זה בדק לימפוציטים של אדם - שהופרדו מן הדם המלא באמצעות פיקול, הן לאחר הפרדה ראשונית והן לאחר הפרדה נוספת לתת-אוכלוסיות - גם היא בעזרת פיקול. בדיקת התאים שנעשתה בעזרת מיקרוסקופ אור, הראתה יצירה של תאים כלסטואידיים (תאים שעברו שיפעול) כבר לאחר ההפרדה הראשונה. שכחותם של תאים אלה עלתה לאחר ההפרדה הנוספת. כאותן דוגמות שלא הופרדו על פיקול, לא נמצאו תאים כלסטואירים כלל.

#### 4.2 מאפיינים ביוכימיים כמדד להשפעת שיטות ההפרדה

בבדיקת הקליטה של תימידין מסומן בטריטיום, לתוך ה-DNA של לימפוציטים בלתי משופעלים כתלות בזמן שהייה שלהם בתרבות, התברר שהתאים שהופרדו על פיקול הראו עלייה איטית של הקליטה עד לזמן של 144 שעות בתרבות. התאים שהופרדו בשיטת ההשקעה הראו קליטה נמוכה ויציבה משך כל זמן המדידה. תוצאות אלה תואמות ממצאיהם של אחרים<sup>(41)</sup>. משני ממצאים אלה, הן הממצא המורפולוגי יהן הממצא הכימי, ניתן להסיק שהפיקול משפעל חלק מן הלימפוציטים תוך כדי תהליך ההפרדה.

#### 4.3 השפעת קרינת גמא על הלימפוציטים המחקבלים כשתי שיטות ההפרדה

מצאנו שלימפוציטים משופעלים עמידים יותר לקרינה (טבלה 4) והרבר הוא ממצאיהם של אחרים (21, 22).

עמידותם של אוכלוסיית הלימפוציטים כולה לקרינה, אמורה לעלות בהתאם לאחוז התאים המשופעלים שבתוכה. מאחר שמצאנו, כי ההפרדה על פיקול גורמת לשיפוע חלק מאוכלוסיית הלימפוציטים, סביר היה להניח שהאוכלוסייה שהופרה על פיקול תגלה עמידות גבוהה יותר לקרינה. בבדיקה שערבנו התקבלה התוצאה והפוכה, [ציור 2(א)].

תוצאה כזאת אפשרית רק אם ההפרדה על פיקול יש השפעה נוספת, חזקה יותר, הגורמת להקטנת העמידות של האוכלוסייה לקרינה. עמידות האוכלוסייה כולה נקבעת על פי נוכחות או היעדרות של תת-אוכלוסיות העמידות לקרינה. כבר נמצא<sup>(43)</sup> כי בשיטות הפרדה שונות מתקבלות תת-אוכלוסיות של הלימפוציטים ביחסים מספריים שונים. קיימת אפשרות כי ההפרדה על פיקול מרחיקה באופן סלקטיבי קבוצת תאים בעלת עמידות גבוהה יותר לקרינה.

מיטוגנים שונים משפיעים באופן ספציפי תת-אוכלוסיות שונות של הלימפוציטים (1, 16). הקרנת הלימפוציטים לפני מתן המיטוגן, משפיעה על כושרם להגיב למיטוגן, לעבור טרנספורמציה ולבצע סינתיזה של DNA. אולם, גם האוכלוסייה המשופעלת על-ידי מיטוגן מסוים, אינה אחידה בעמידותה לקרינה (24, 44±46).

מהתוצאות שקבלנו [ציור 20(ב)±(ד)], נראה כי יש ירידה חזקה ביכולת התאים להגיב למיטוגן עד לדוזה של 680 ראד. בדוזות גבוהות יותר קצב הירידה מתמתן ומתייצב. החלק הראשון של העקום מייצג אוכלוסייה הרגישה יותר לקרינה, ואילו החלק השני את אותו חלק באוכלוסייה שהוא עמיד יותר לקרינה. עקומה זו היא טיפוסית והתקבלה בכל שלושת המיטוגנים.

לא ירועות הסיבות המדייקות הגורמות להבדלים, בתוך אוכלוסייה המגיבה למיטוגן מסוים, ולחלוקה לתת-אוכלוסייה רגישה יותר לקרינה ואחרת עמידה יותר. ייתכן שההבדלים ברגישות לקרינה, בין תאים של אוכלוסייה המשופעלת על-ידי אותו מיטוגן, נובעים ממשך הזמן השונה שהתאים מתקיימים לאחר ההקרנה: תאים רגישים יותר מייצגים תת-אוכלוסייה המתה "מוות של אינטרפזה" מיד לאחר ההקרנה, ואילו האוכלוסייה העמידה מייצגת תאים המתים מאוחר יותר "מוות של מיטוזה".

הסבר נוסף לתופעה זו יכול להיות בכך שיש הבדלים בין תאים כאשר למהירות שבה הם מגיבים עם המיטוגן. התאים המשופעלים מיידיה מסוגלים לחקן טוב יותר את הנזק שנגרם להם על-ידי הקרינה, והם יהיו אח אחר חלק באוכלוסיה המגלה עמידות גבוהה יותר.

בדיקה יכולתן של תת-האוכלוסיות של הלימפוציטים להגיב למיטוגנים השונים, המופיעים בטבלה 1, לאחר לאחר שהוקרנו בקרינת גמא, איפשרה לנו לאמת את ההנחה, ששיטות ההפרדה השונות משנות את היחס המספרי של תת-האוכלוסיות בעלות הרגישות השונה לקרינה. התגובה ל-PHA ול-PWM היתה דומה בלימפוציטים שהתקבלו בשתי שיטות ההפרדה שבדקנו. אולם התגובה ל-Con A היתה שונה בין הדוגמות שהתקבלו בשתי השיטות: אוכלוסיות הלימפוציטים שהופרדה על פיקול הראתה רגישות רבה יותר לקרינה [ציוור 2(ב)]. בעבודתו של A. E. Andersson<sup>(21)</sup> נמסר כי אוכלוסיות תאי ה-T, המגיבה ל-Con A, מצטיינת בעמידות גבוהה יותר לקרינה.

התוצאות שקבלנו, לפיהן מראים הלימפוציטים יתר רגישות לקרינת גמא לאחר הפרדתם מן הדם המלא על פיקול, הן במצבם הכלתי משופעל והן לאחר השיפעול עם Con A, מצביעות על הרחקה סלקטיבית של אוכלוסיה העמידה יותר לקרינה, והמגיבה למיטוגן זה. הדחקה זו ממסכת גם על ההשפעה המשפעת שיש לפיקול על חלק מהתאים.

על התופעה שהפרדה על פיקול גורמת לאיבוד סלקטיבי של תאי T מדוגמת הדם, נמסר בעבודות של אחרים<sup>(43)</sup>, נמצא גם ההסבר לכך: ידועה תופעה של יצירת רוזטות בין הלימפוציטים של אדם לבין תאי הדם האדומים שלו עצמו. רוזטות אלה ידועות בשם "H-רוזטות"<sup>(47)</sup>. מרבית התאים היוצרים רוזטות אלה הם תאי ה-T. נמצא, שבזמן ההפרדה על גרדיינט של פיקול, נכנסים הלימפוציטים, היוצרים את הרוזטות עם תאי הדם האדומים האוטולוגיים, אל תוך הפרקציה של תאי הדם האדומים, וכדרך זו הולכים לאיבוד בתהליך ההפרדה<sup>(48)</sup>. ככל שכמות תאי הדם האדומים גדולה יותר, כך גדל אובדן תאי ה-T מתוך מערכת ההפרדה. לאחרונה פורסמה שיטה להפרדת הלימפוציטים המגיבים עם Con A, המבוססת על כושרם ליצור רוזטות אוטולוגיות<sup>(54)</sup>.



ספירת אחוז תאי B- ותאי ה-T שהתקבלו באוכלוסיות הלימפוציטים שהופרדו מתוך הדם המלא בשתי שיטות ההפרדה, כפי שנקבע על-ידי כושרם ליצור רוזטות עם כדוריות דם אדומות של כבש (טבלה 5), לא הראה הבדל מובהק בין האוכלוסיות. בתאים שהופרדו בשיטת ההשקעה נתקבל יתרון מספרי לאוכלוסיית תאי ה-T, לעומת ההפרדה על פיקול במספר נבדקים, אך בממוצע על תשעה נבדקים לא נראה הבדל מובהק בין האוכלוסיות. מאחר שאוכלוסיית תאי ה-T היוצרת רוזטות עם כדוריות דם אדומות של כבש, היא כשלעצמה הטרוגנית, הרי שאי-קיומו של שוני מספרי אין בו כדי לשלול אפשרות קיומו של שוני איכותי. נראה, איפוא, שאכן חסרים במערכת המופרדת על פיקול תאים המגיבים עם Con A והידועים כבעלי עמידות גבוהה יותר לקרינה. האפשרות, שההפרדה על פיקול גורמת לשינוי בהרכב אוכלוסיית הלימפוציטים, יכולה להסביר הן את התוצאות שקבלנו אנו והן את התוצאות הסותרות המתקבלות בעבודות של אחרים, המבקשים לבדוק את רגישותן היחסית של תת-אוכלוסיות של הלימפוציטים לקרינה.

יש לנהוג זהירות רבה בבחירת שיטת ההפרדה של לימפוציטים ולהיות מודעים לשינוי שזו עלולה לגרום לתאים עצמם, להרכב היחסי של תת-אוכלוסיות שלהם או לתפקודים שלהם<sup>(51,50)</sup>. מאחר שהתגובה האימונולוגית הלווייה בשיתוף פעולה בין התאים השונים של המערכת<sup>(4)</sup>, עלול שינוי הרכבם היחסי לתת תוצאה שלא תייצג נאמנה את המתחולל למעשה בתוך הגוף, שאת תפקודיו מכקשים ללמוד.

## 5 סיכום

בעבודה זו בדקנו, האם שחיים מהשיטות המקובלות להפרדת הלימפוציטים מתוך הרם המלא, נותנות אוכלוסיות השונות מבחינה מורפולוגית ומבחינת רגישותן לקרינה. השיטות שנברקו הן:

(א) הפרדה על גרדיינט צפיפיות באמצעות Ficoll-Paque;

(ב) הפרדה בשיטת ההשקעה.

מתוך אוכלוסיות התאים שהופרדה על פיקול, כ-18% מהתאים הראו פנוטיפ מורפולוגי האופייני לתאים משופעלים. הבדיקה המורפולוגית נעשה באמצעות מיקרוסקופ אלקטרונים. ממצא זה קיבל את אישורו גם בבדיקה בשיטה ביוכימית: תאים שהופרדו על פיקול הראו קליטה מוגברת של תימדין מסומן בטריטיום ועלייה בקליטה, כחלואה במשך השהייה שלהם בתרבות.

בבדיקת השפעת קרינת גמא על אוכלוסיה של תאים נייחים ושל תאים ששופעלו על-ידי שלושה מיטוגנים, נמצא, כי תאים בלתי משופעלים שהופרדו על פיקול, הראו רגישות יתר לקרינה. מבין התאים המשופעלים - אותה אוכלוסיה ששופעלה על-ידי המיטוגן Con A הראתה רגישות גבוהה יותר לקרינה כדוגמת הדם שהופרדה על פיקול.

מתוך התוצאות עולה, שהשימוש בפיקול עלול להשפיע על אוכלוסיות התאים המופררת באמצעותו מתוך הרם המלא. ההשפעות האפשריות הן שתיים:

(א) שיפעול חלק מן הלימפוציטים;

(ב) אפשרות של הרחקה סלקטיבית של תת-אוכלוסיה מסוימת.

השפעות אלה עלולות לגרום לתוצאות הסותרות המתקבלות בבדיקת תת-האוכלוסיות של הלימפוציטים, הן לגבי רגישותן לקרינה והן לגבי תופעות אחרות.

הכעת תורה

תודתי לד"ר מיכאל פרידלנדר ולד"ר עמנואל ריקליס על כל אשר לימדוני.

לד"ר רינה רוה על עזרתה בבחיבה ובעריכה.

לפרופ' איליה גלזר על העזרה בעבודה במיקרוסקופ האלקטרוני.

לגרעון רזיאל תודה מייוחדת על עזרה לכל אורך הדרך ועל הדפסת החמוניות.

לרחל מרקו על עזרתה בעבודת המעבדה.

לאריה סובל על שרטוט הציורים.

תודה מעומק הלב לדוד מקבת על העזרה בעריכה הסופית של העבודה

ול-לידיה זיסק על ההדפסה.

References

סימוכין

1. Fundenberg H. H., Stites D. P., Caldwell I. L. and Wells J. V., *Basic and Clinical Immunology*, 3rd Edition, Lange Medical Publications, California, U.S.A., p. 96-128, 1978.
2. Douglas S. D., Human Lymphocyte Growth in vitro: Morphologic, Biochemical and Immunological Significance, *International Review of Experimental Pathology* 10, 41-114, 1971.
3. Besis M., *Living Blood Cells and their Ultrastructure*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 413-463, 1973.
4. Miller J.F.A.P., *Cellular Interactions in Immune Responses*, Seminars in Hematology 16 (4), 283-292, 1979.
5. Kasahara T., Kin K., Itoh Y., Kawai T., Morita M. and Shioiri-Nakano K., Cellular Cooperation in Lymphocyte Activation, *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 58, 260-273, 1979.
6. Kasahara T., Kin K., Itoh Y., Kawai T., Morita M. and Shioiri-Nakano K., Cellular Cooperation in Lymphocyte Activation, *Cellular Immunology*, 49, 142-153, 1980.
7. Cawley and Hayhoe, *Ultrastructure of Haemic Cells*, W. B. Saunders Company Ltd. p. 36-43, 1973.
8. Tanaka Y. and Goodman J. R., *Electron Microscopy of Human Blood Cells*, Harper and Row Publishers Inc. New York, U.S.A. p. 213-253, 1972.
9. Roberts N. J., Variability of Results of Lymphocytes Transformation Assays in Normal Human Volunteers, *American Journal of Clinical Pathology*, 73 (2), 160-164, 1980.
10. Corrigan A., O'Kennedy R. and Smyth H., Lymphocyte Membrane Alterations Caused by Nylon Wool Colum Separation, *Journal of Immunological Methods*, 31, 177-182, 1979.
11. Bøyum A., Separation of White Blood Cells, *Nature*, 204, 793-794, 1964.
12. Bøyum A., Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes from Human Blood, *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigations*, 21, (Supp. 97), 77-89, 1968.

13. Nowell P. C., Phytohemagglutinin: an Initiator of Mitosis in cultures of Normal Human Leucocytes, *Cancer Research*, 20, 462, 1960.
14. Holian A., Deutsch C. J., Holian S. K., Daniele R. P. and Wilson D. F., Lymphocyte Response to Phytohemagglutinin: Intracellular Volume and Intracellular ( $K^+$ ), *Journal of Cellular Physiology*, 98, 137-144, 1979.
15. Freedman M. H., Early Biochemical Events in Lymphocytes Activation, *Cellular Immunology*, 44, 290-313, 1979.
16. Schechter B., *Lymphocyte Stimulation - Differential Sensitivity to Radiation - Biochemical and Immunological Processes*, Edited by Amleto Castellani, Plenum Press, New York and London Lymphocytes Stimulation by Non Specific Mitogens p. 1-14, 1980.
17. Peters J. H. and Hausen P., Effect of Phytohemagglutinin on Lymphocyte Membrane Transport, *European Journal of Biochemistry*, 19, 502-508, 1971.
18. Kiefer H., Blume A. J. and Kaback H. R., Membrane Potential Changes During Mitogenic Stimulation of Mouse Spleen Lymphocytes, *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 77 (4), 2200-2204, 1980.
19. Ahern T. and Kay J. E., Protein Synthesis and Ribosome Activation During the Early Stages of Phytohemagglutinin Lymphocyte Stimulation, *Experimental Cell Research*, 92, 513-515, 1975.
20. Dalrymple G. V., Gaulden M. E., Kollmorgen G. M. and Vogel H. H., *Medical Radiation Biology*, W. B. Saunders Company U.S.A. p. 198-202, 1973.
21. Anderson R. E. and Warner N. L., Ionizing Radiation and the Immune Response, *Advances in Immunology*, 24, 215-335, 1976.
22. Schrek R. and Stefani S., Radioresistance of Phytohemagglutinin Treated Normal and Leukemic Lymphocytes, *Journal of the National Cancer Institute*, 32, 507-521, 1964.
23. Lavin M. F. and Kidson C., Repair of Ionizing Radiation Induced DNA Damage in Human Lymphocytes, *Nucleic Acides Research*, 4 (11), 4015-4022, 1977.
24. Baral E., Blomgren H. and Juhlin I., The Effect of in vitro Irradiation on Mitogenic Responsiveness of Peripheral Blood Lymphocytes from Untreated Patients with Hodgkin's Disease, *Cancer*, 44, 1241-1246, 1979.

25. Hoppe R. T., Fuks Z. Y., Strober S. and Kaplan H. S., The Long Term Effects of Irradiation on T and B Lymphocytes in the Peripheral Blood After Regional Irradiation, *Cancer*, 40, 2071-2078, 1977.
26. Indeström K., Petrini B., Blomgren H., Wasserman J., Wallgren A. and Baral E., Changes of the Peripheral Lymphocyte Population Following Radiation Therapy to Extended and Limited Fields, *International Journal of Radiation, Oncology, Biology and Physics* 5, 1761-1766, 1979.
27. Bolla M., Lymphopenia and Variations in T and B Lymphocytes Appearing Immediately After Irradiation, *Journal of Radiology*, 60, 695, 1979.
28. Ben Smit, Sternsward J., Dowdle E., Sealy G. R., Wilson E., Bealty D., Jacobs P. and Bennett M. B., The Lymphocyte: Monocyte Ratio: B and T Cells Ratio After Radiotherapy, Chemotherapy and Surgery, *International Journal of Radiation, Oncology, Biology and Physics* 5, 1841-1847, 1979.
29. Baral E. and Blomgren H., Response of Human Lymphocytes to Mitogenic Stimuli After Irradiation in vitro, *Acta Radiologica Therapy Physics Biology*, 15, 149-161, 1976.
30. Sprent J., Anderson R. E. and Miller J.F.A.P., Radiosensitivity of T and B Lymphocytes, *European Journal of Immunology*, 4, 204-210, 1974.
31. Prosser J. S., Survival of Human T and B Lymphocytes After X-Irradiation, *International Journal of Radiation Biology*, 30, 459-465, 1976.
32. Facchini A., Maraldi N. M. Barloli S., Farulla A. and Manzoli F. A., Changes in Membrane Receptors of B and T Lymphocytes Exposed to <sup>60</sup>Co Gamma Rays, *Radiation Research*, 68, 339-348, 1976.
33. Biberfeld P., Morphogenesis in Blood Lymphocytes Stimulated with Phytohaemagglutinin (PHA). A Light and Electron Microscopic Study, *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section A. Suppl.* 223 4-70, 1971.
34. Luft I. H., Improvements in Epoxy Resin Embedding Methods, *Journal of Biophys. and Biochemical Cytology*, 9, 409-414, 1961.
35. Zucker-Franklin D., The Ultrastructure of Lymphocytes, *Seminars in Hematology*, 6, (1), 4-27, 1969.
36. Biberfeld P., Uropod Formation in Phytohaemagglutinin Stimulated Lymphocytes, *Experimental Cell Research*, 66, 433-445, 1971.

37. McFarland W. and Schechter G. P., The Lymphocyte in Immunological Reactions in vitro. Ultrastructural Studies, Blood, 35, 683-688, 1970.
38. Gazin J. F., Oliveira-Castro G. M., Machado R. D., and Barcinski M. A., Structure and Permeability of Junctions in PHA Stimulated Human Lymphocytes, *Experientia*, 15, 172-174, 1975.
39. Oliveira-Castro G. M., Barcinski M. A. and Cukierman S., Intercellular Communication in Stimulated Human Lymphocytes, *The Journal of Immunology*, 111, 1616-1619, 1973.
40. Hirata-Hibi M., Watanabe N., Tachibana T., Takeda M. and Kohsaka M., Lymphocyte Transformation During T and B Cell Separation, *Cell Structure and Function*, 3, 357-360, 1978.
41. Kasakura S. (Div. of Haematology, Royal Victoria Hospital, Canada) *Effect of Ficoll-Hypaque on Lymphocyte Transformation* (in preparation).
42. Hülser D. F. and Peters J. H., Contact Cooperation in Stimulated Lymphocytes, *Experimental Cell Research*, 74, 319-326, 1972.
43. Wilson A. B., Kanski A. and Coombs R.R.A., Artefactual Variations in the B and T Subpopulations of Rabbit Blood Lymphocytes Depending on Method of Isolation and Blocking of C<sub>3</sub> Receptors Due to in vitro Activation of Complement, *Journal of Immunological Methods*, 24, 201-221, 1978.
44. Haywaid A. R., Layward L., Lydyard P. M., Moretta L., Dagg M. and Lawton A. R., Fc-Receptor Heterogeneity of Human Suppressor T Cells, *The Journal of Immunology*, 121, 1, 1978.
45. Baral E., Blomgren H., Einhorn N. and Lax I., Effect of Radiation Therapy on the Mitogenic Response of in vitro Irradiated Human Lymphocytes to Phytohaemagglutinin, *Acta Radiologica Therapy Physics Biology*, 16, 266-271, 1977.
46. Anderson R. E. and Lefkovits I., In vitro Evaluation of Radiation Induced Augmentation of the Immune Response, *The American Journal of Pathology*, 97, (3), 456, 1972.
47. Gallinger L. A., Press H. F. and Bainers M. G., Human Lymphocytes/Human Erythrocytes Rosettes, Blood "H" Rosettes are High-Affinity E-Rosette-Forming T Lymphocytes Occuring in High Frequency, *International Journal of Cancer*, 26, 139-150, 1980.

48. Hokland P., The Isopaque-Ficoll re-Evaluated: Selective Loss of Autologous Rosette-Forming Lymphocytes During Isolation of Mononuclear Cells from Human Peripheral Blood, *Scandinavian Journal of Immunology*, 11 (2), 353-356, 1980.
49. Hokland P. and Heron J., Analysis of the Lymphocytes Distribution During Isopaque-Ficoll Isolation of Mononuclear Cells from Human Peripheral Blood, *Journal of Immunological Methods*, 32, 31-39, 1980.
50. Berger C. L. and Edelson R. L., Comparison of Lymphocytes Function After Isolation by Ficoll-Hypaque Flotation or Elutriation, *The Journal of Investigative Dermatology*, 73, 231-235, 1979.
51. Patrick C. C., Graber C. D. and Loadholt C. B., Evaluation of Four Methods for Separation of Lymphocytes from Normal Individuals and Patients with Cancer and Tuberculosis, *Journal of Immunological Methods*, 11, 321-332, 1976.
52. Jondal M., Holm C. and Wigzell H., Surface Markers of Human T and B Lymphocytes, *Journal of Experimental Medicine*, 136, 207, 1972.
53. Sakane T., Honda M., Taniguchi Y. and Kotani H., Separation of Concanavalin - A Induced Human Suppressor and Helper T Cells by Autologous Erythrocyte Rosette Technique, *The Journal of Clinical Investigation*, 68, (2), 447, 1981.



