

השתלת תאי גזע מזנכימיים מלשד עצם בשיטה חדישה זעיר פולשנית בכל תת הרשתית והחללים החוץ וסקולריים בדמית - כטיפול במחלות ניוון רשתית

תקציר:

הקדמה: מיליוני חולים בעולם לוקים במחלות ניוון רשתית חשוכות מרפא. במחקרים קודמים שבהם הושטלו תאי גזע בתת רשתית של חולדות RCS עם ניוון רשתית תורשתית מתקדם, חל שיפור בתפקודי הראייה של החולדות. במחקרים אלו נקטו בשיטת השתלה חודרנית הכוללת היפרדות רשתית יזומה לצורך השתלת התאים. מספר התאים שניתן להשתיל בשיטה זו מוגבלת, התאים המושתלים נשארים בגושים באזור ההשתלה, ושיקום מבנה הרשתית מוגבל לאזורים הסמוכים לאזור ההשתלה.

מטרות: לפתח טיפול המבוסס על השתלת תאי גזע מזנכימיים מלשד עצם של אדם בשיטה חדשנית וזעיר-חודרנית לתת רשתית ולחללים החוץ-וסקולריים בדמית.

שיטות המחקר: פותחה מערכת חדשנית להשתלת תאים הכוללת מזרק בעל מחט קטומה וגמישה ופין שניתן לווסת את אורכו, המאפשר יצירת תעלה משולשת בלובן העין (סקלרה). תאי גזע מזנכימיים מלשד עצם של אדם הושטלו בתת רשתית ובדמית בחולדות RCS ובארנבות NZW בריאות. לא נעשה טיפול בתרופות לדיכוי התגובה החיסונית. מבנה הרשתית נבדק באמצעות טומוגרפיה אופטית (OCT) וניתוחים היסטולוגיים. תפקוד הרשתית נבדק באמצעות אלקטרוטינוגרם.

תוצאות: התאים המושתלים זוהו בשכבה דקה בתת רשתית ובחללים החוץ-וסקולריים בדמית. השתלת התאים בעיני החולדות מנעה התנוונות הפוטורצפטורים ושיפרה את תפקודי הרשתית במשך חמישה חודשים לאחר ההשתלה. תפקוד הרשתית נמצא תקין בארנבות לאחר ההשתלה, ולא זוהו דימומים או היפרדות רשתית.

מסקנות: המזרק החדשני מאפשר השתלת תאי גזע בתת רשתית ובחללים החוץ-וסקולריים בדמית באופן זעיר-חודרני. השתלת התאים עיכבה משמעותית את ניוון הרשתית בחית המודל, ללא סיבוכים של היפרדות רשתית או דימומים.

דיון וסיכום: שיטת ההזרקה החדשנית עשויה לשפר יעילות טיפולים תאיים ותרופתיים אחרים. מחקר זה צפוי להוביל ישירות לניסויים קליניים ראשוניים של השתלה אוטולוגית של תאי גזע מזנכימיים מלשד עצם בחולי ניוון רשתית.

יגאל רוטנשטרייך¹
עדי צמרת^{1*}
ספיר י' קליש^{1*}
מיכאל בלקין¹
עמיליה מאיר²
אברהם טרבס²
ארנון נגלר³
יפעת שר¹

¹מכון גולדשגור לחקר העין, הפקולטה לרפואה סאקלר, אוניברסיטת תל אביב, המרכז לתאי גזע ורפואה רגנרטיבית, המכון לחקר הסרטן,³החטיבה להמטולוגיה, מרכז רפואי שיבא, תל השומר, רמת גן

* המחברים תרמו תרומה זהה למאמר

ניוון מקולרי על רקע גיל; רטיניטיס פיגמנטוזה; תאי גזע מזנכימיים; השתלת תאים; אלקטרוטינוגרם. Retinitis pigmentosa; AMD; Bone marrow mesenchymal stem cells; Electroretinogram; Cell transplantation

מילות מפתח:
KEY WORDS

הקדמה

מחלות ניוון רשתית פוגעות במיליוני חולים ברחבי העולם, וגורמות להחמרה בראייה ולעיוורון. המחלה הנפוצה ביותר היא מחלת ניוון מקולרי על רקע גיל (נמ"ג, Age related Macular Degeneration - AMD), המהווה הגורם השלישי לעיוורון בעולם והגורם הראשון לעיוורון במדינות מתועשות. המחלה נפוצה בקרב אנשים מבוגרים מעל גיל 55 שנים, ובמדינות רבות מעל 20% מהאוכלוסייה לוקים במחלה. עם הזדקנות האוכלוסייה בעולם, הצפי הוא כי מספר החולים יוכפל עד 2050 [1]. בשלב מוקדם של המחלה (השלב ה"יבש") חלה פגיעה באפיתל הרשתית באזור המקולה ומצטברים משקעים המכונים דרוזן (Drusen) בין אפיתל הרשתית והדמית. התפתחות עקה חמצונית, דלקת, ופעילות לא מבוקרת של מערכת

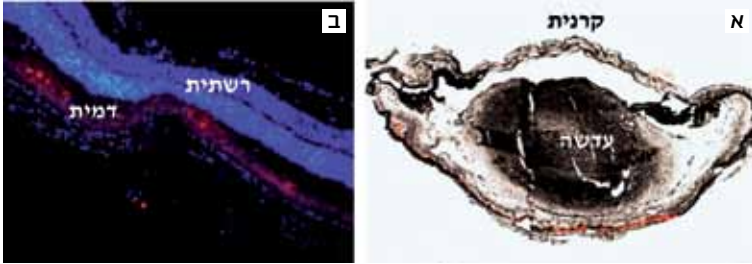
המשלים, מובילות להתקדמות המחלה ולהופעת דלדול אזורי, שבה מתרחש ניוון של הפוטורצפטורים, אפיתל הרשתית והדמית באזורים נרחבים במקולה. בכעשרה אחוזים מהחולים מתקדמת המחלה למצב המכונה נמ"ג "רטוב", שבמהלכו חלה צמיחה של כלי דם מתחת לפוביאה. חדירת כלי דם אלו מהדמית לתוך הרשתית ודימומים מכלי הדם גורמים בתוך זמן קצר לניוון הפוביאה ולאובדן הראייה המרכזית. מחלת הרטיניטיס פיגמנטוזה היא קבוצה של מחלות תורשתית בעלות מופע פנוטיפי דומה של ניוון רשתית, המאופיין בעיוורון לילה, היצרות בשדה הראייה עד לראיית "צינור" וירידה בחדות הראייה [2]. כיום, קיימים טיפולים יעילים לעצירת צמיחת כלי הדם בחולי נמ"ג "רטוב", אולם לא קיים טיפול לניוון הרשתית במצב ה"יבש" של חולי נמ"ג או בחולי רטיניטיס פיגמנטוזה [3].

בשנים האחרונות נבדקה במעבדות מחקר רבות האפשרות להשתיל תאי גזע לריפוי ניוון רשתית. בבחינת היתכנות טיפול כזה ועומדות שתי שאלות מרכזיות - איזה סוג של תאי גזע יאפשר טיפול

¹נמ"ג - ניוון מקולרי על רקע גיל

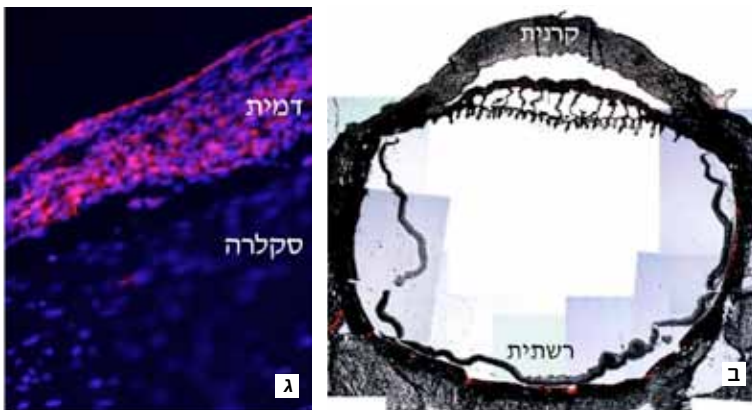
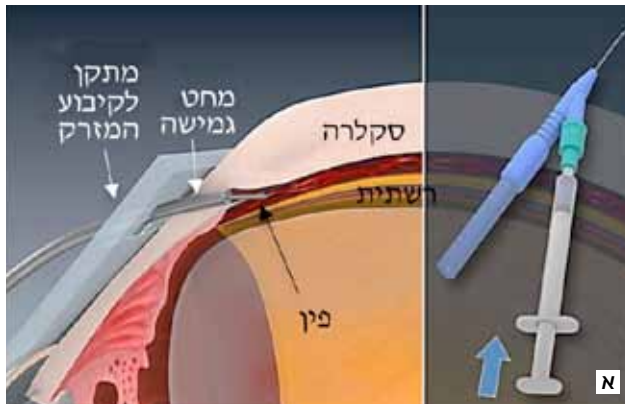
תמונה 1:

השתלת תאי גזע בשיטה הזעיר חודרנית בשכבה דקה בתת רשתית ובחללים החוץ וסקולריים בדמית של חולדות RCS. א. פיזור התאים המושתלים בשכבה דקה בתת רשתית ובחללים החוץ וסקולריים בדמית מודגם בחתך עין שלמה של חולדת RCS שהוצאה שלוש שעות לאחר השתלת תאי גזע המסומנים בחומר פלואורסצנטי Dil (אדום, קנה מידה 1,000 מיקרומטר); ב. הגדלה גדולה של החתך המוצג ב"א" ובו נצבעו כל גרעיני התאים ברקמה בצבע התנגודת DAPI (כחול, קנה מידה 100 מיקרומטר), באדום - תאי הגזע המושתלים המסומנים ב-Dil.



תמונה 2:

השתלת תאי גזע בגישה זעיר חודרנית אל החללים החוץ וסקולריים בדמית של ארנבות NZW. א. המזרק החדשני שפותח כולל בין שניתן לווסת את אורכו ליצירת תעלה אלכסונית לכיוון הדמית ומחס גמישה להשתלת התאים; ב. פיזור תאי הגזע המושתלים בשכבה דקה בחללים החוץ וסקולריים בדמית מודגם בחתך עין שלמה של ארנבת שהוצאה שלוש שעות לאחר השתלת תאי גזע המסומנים בחומר פלואורסצנטי Dil (אדום); ג. פיזור תאי הגזע בשכבת הדמית שבועיים לאחר ההשתלה. תאי גזע לא מסומנים הושתלו בעין הארנבת. כעבור שבועיים העין הוצאה והוקפאה וחתכים נצבעו עם נוגדן כנגד גרעיני תאי אדם (אדום) וצביעת תנגודת של גרעינים (DAPI, כחול). קנה מידה: 100 מיקרומטר.



בטוח ויעיל לניווט רשתית, ובאיזה אזור בעין מומלץ להשתיל את התאים. במחקרים טרום קליניים שונים נבדק הטיפול במגוון תאי גזע אנושיים, ובכלל זה תאים עובריים ותאי גזע בוגרים מרקמות שונות בחיות מודל של ניוון רשתית. המחקרים הללו הובילו למספר ניסויים קליניים שלב ראשון (Phase I) [5,4]. במחקרים אלו, הושתלו התאים אל חלל הזגוגית או על ידי כניסה דרך הלובן העין והדמית, והשתלת התאים בגושים בתת רשתית. השתלת תאים בזגוגית העין קלה יחסית מבחינה כירורגית, אולם התאים נמהלים בנפח הגדול של הזגוגית ומושתלים במרחק משמעותי מאיבר המטרה.

ההשתלה לתת רשתית בשיטה המקובלת כיום היא ביצוע ניתוח חודרני הגורם להיפרדות רשתית והשתלת גושי תאים תוך יצירת "Blebs" בתת רשתית. מספר התאים שניתן להשתיל בשיטה חודרנית זו מוגבל ביותר (כמה עשרות אלפי תאים בלבד). כמו כן, התאים מתרכזים רק באזור ההשתלה ולכן ההשפעה הטיפולית שלהם מצומצמת לאזור זה [7,6,5]. במחקר הנוכחי פיתחנו שיטה חדשה וזעיר-חודרנית להשתלת תאי גזע בשכבה דקה בחלל התת רשתית ובחללים החוץ וסקולריים בדמית (השכבה המזינה את הרשתית). לבדיקת בטיחות ויעילות השיטה השתמשנו בתאי גזע מזנכימיים מלשד עצם של אדם המפרישים חלבונים נירוטרופיים וציתוקינים אשר יכולים לשקם את תאי הרשתית, למנוע את תמותתם, לעורר תאי גזע רדומים ברשתית ולצמצם את התהליך הדלקתי. תאים אלו בטוחים יותר לשימוש מתאי גזע עובריים ומאפשרים טיפול אוטולוגי אשר אינו מצריך טיפול מלווה לדיכוי התגובה החיסונית [9, 8].

מטרות

לפתח טיפול תאי המבוסס על השתלת תאי גזע מלשד עצם של אדם בשיטה חדשנית וזעיר-חודרנית לתת רשתית והחללים החוץ וסקולריים בדמית.

שיטות מחקר

חיות: חולדות RCS (The Royal College of Surgeons) וארנבות NZW (New Zealand White) גודלו בבית החיות של המרכז הרפואי בתל השומר. כל הניסויים נעשו בהתאם לאישור ועדת האתיקה בניסויי חיות של המרכז הרפואי.

הכנת תאי גזע מזנכימיים מלשד עצם של אדם בוגר: הפקת תאי גזע מזנכימיים נעשתה במרכז הרפואי תל השומר ואושרה ע"י ועדת הלסינקי של המרכז הרפואי ומשרד הבריאות. תאים מזנכימיים טריים נלקחו מלשד עצם של אנשים בריאים בגילם 35-50 שנים. התאים הופרדו וגודלו בתרבית. התאים נבדקו בקביעות להיעדר ביטוי הסמנים ההמטופיזיטיים CD14, CD34, CD45, CD37, CD90, CD105 - כמוסבר במחקרנו הקודם [10].

הזרקת תאי גזע אל שכבת הדמית של החולדות והארנבות: תאי גזע מזנכימיים מתורמיים לשד עצם שונים הושתלו בעין אחת של 69 חולדות בנות 28 יום או 20 ארנבות בגיל חודשיים. העין השנייה של כל חיה שימשה כבקרה. החיות הורדמו באמצעות תערובת של קסילזין וקטמין. להזרקה לחולדות, רבע מיליון תאים הורחפו בתמיסה פיזיולוגית בנפח 5 מיקרוליטר והוזרקו אל התת רשתית בעין אחת. תחילה בוצע חתך בלובן העין 2 מ"מ מהגובלת בזווית של כ-5 מעלות מהדמית באמצעות סכין (BD Beaver-Visitic International) עד להופעת דימום מינימאלי. בנקודה זו הוכנסה מחט 30G דרך השכבה הדמית. התאים הוזרקו דרך תעלת לובן העין (התעלה הסקלרלית) המשולשת שנוצרה תוך שימוש במזרק המילטון 10µl עם מחט שטוחה של 30G. להזרקה לארנבות השתמשנו במזרק שפיתחנו (תמונה 2 א.).

היסטולוגיה

בנקודות זמן שונות החיות הוקרבו והעיניים עברו תהליך שימור בפורמלין. חתכים של הרשתית נצבעו בהמטוקסילין-אאוזין, על מנת לבדוק את מבנה הרשתית, או בצביעה אימונופלוורוסנטית עם נוגדן ראשוני כנגד גרעיני תאים אנושיים, נוגדן שניוני פלואורסצנטי וצביעת נגודת של גרעיני התאים עם 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) לזיהוי התאים המושלתים. כל הניתוחים (אנליזות) בוצעו בסמיות מלאה.

ניתוח סטטיסטי

לצורך הניתוח הסטטיסטי הסתייענו בתוכנת SPSS (גרסה 20). לניתוח תוצאות האלקטרורטינוגרם וההיסטולוגיה הסתייענו בניתוח ANOVA. נקודות הזמן ומשרעת (אמפליטודת) גירוי האלקטרורטינוגרם הוגדרו כמשתנים תוך נבדקים, ועין בקרה לעומת עין מושלת הוגדרו כמשתנים בין נבדקים. עוצמת תגובת האלקטרורטינוגרם או מספר שכבות הפוטורצפטורים הוגדרו כמשתנה התלוי. הבדלים משמעותיים סטטיסטית הוגדרו כ- $p < 0.05$.

תוצאות

השתלת תאי גזע מזנכימיים מלשד עצם של אדם בשכבה דקה בתת רשתית והחללים החוץ-וסקולריים בדמית, מעכבת את ניוון מבנה הרשתית ותפקודה בחולדות המודל RCS.

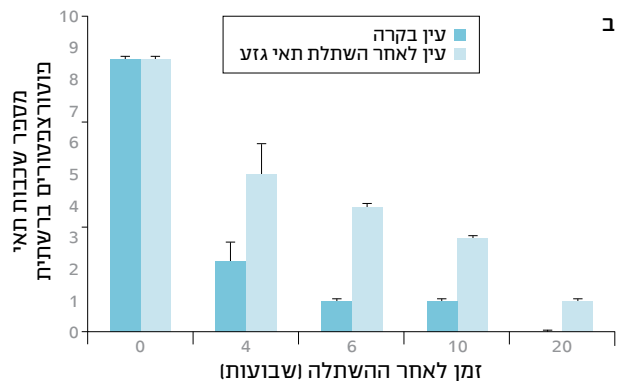
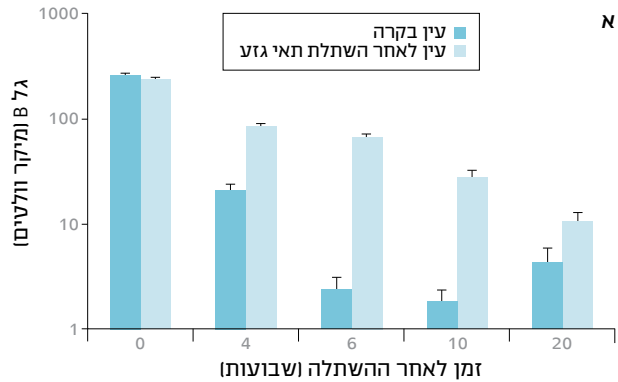
לבדיקת יעילות שיטת ההשתלה החדשנית שפותחה, הושלתו תאי גזע מזנכימיים מלשד עצם של תורמים בריאים בעיני חולדות RCS הנושאות מוטציה בקולטן MERTK. בהיעדר קולטן זה, חלה הצטברות של פסולת תאית בחלל התת רשתית אשר מובילה לפגיעה בתאי האפיתל והפוטורצפטורים, עד לניוון מוחלט של הפוטורצפטורים ועיוורון בגיל שלושה חודשים [11].

לפני ההשתלה סומנו תאי הגזע עם הצבע הפלואורסצנטי 1,1'-Diocetyl-3,3,3',3' Tetramethylindocarbocyanine (DiI'), הנקשר לקרומי התאים, על מנת לאפשר את זיהויים לאחר ההשתלה בעין. כפי שמודגם בתמונה 1, שעה לאחר ההשתלה ניתן היה לזהות בבירור את התאים המושלתים בשכבה דקה בתת רשתית ובחללים החוץ-וסקולריים בדמית. על מנת לבדוק את השפעת התאים על תפקוד הרשתית, החיות נבדקו אחת לשבועיים בבדיקת אלקטרורטינוגרם. זוהי בדיקה אובייקטיבית להערכת תפקוד הרשתית כולה בתגובה לגירוי של הבזקי אור בתנאי אור (מדידת תפקוד המדוכים) ובחושך (מדידת תפקוד הקנים), והיא הבדיקה המקובלת להערכת תפקוד הרשתית בחולים. בעיניים שבהן הושלתו תאי הגזע נמצא שיפור משמעותי ומובהק סטטיסטית ברכיב של גל B עד 20 שבועות לאחר השתלת התאים בכל עוצמות האור שנבדקו (תרשים א' ותוצאות לא מוצגות). גל B הוא הגדול והבולט ברכיבי האלקטרורטינוגרם, והוא משקף את פעילות התאים הבי-פולריים.

ניתן לראות לדוגמה, כי שישה שבועות לאחר ההשתלה, עוצמת גל B הממוצעת בתגובה לגירוי אור של 23 קנדלה-שניה/מטר² בעיני הביקורת הייתה כ-3 מיקרוולטים, ואילו בעיניים המושלתות העוצמה הממוצעת של גל B היה כ-70 מיקרוולטים. שיפור דומה נמצא גם בתגובות הרשתית בתנאי אקלום לאור, שהיו גבוהות באופן מובהק בעיניים המושלתות יחסית לעיני הבקרה בכל עוצמות האור שנבדקו עד שבוע 20 לאחר ההשתלה (תוצאות לא מוצגות). כמו כן, נמצא שיפור משמעותי בגל A המשקף את סך כל הפעילות החשמלית בתאי הפוטורצפטורים עד 14 שבועות לאחר ההשתלה (תוצאות לא מוצגות).

תרשים 1:

שיפור במבנה ובתפקוד הרשתית לאחר השתלת תאי הגזע אל תת הרשתית והחללים החוץ וסקולריים בדמית של חולדות RCS. א. בדיקת תפקוד הרשתית באמצעות אלקטרורטינוגרם, בתנאי אקלום לחושך בתגובה לגירוי אור בעוצמה של 23.5 קנדלה-שניה/מטר². הממוצע של עוצמת גל B המרבית שנמדדה ב-69 חולדות=שיגאת תקן (SE) מודגמים בתרשים; ב. בדיקת מבנה הרשתית. בתרשים מוצג מספר שכבות הפוטורצפטורים ברשתית. נבדקה כל הרשתית בשלושה חתכים מכל עין של שלוש חולדות בכל נקודת זמן וממוצע=סטיין תקן, ISD.

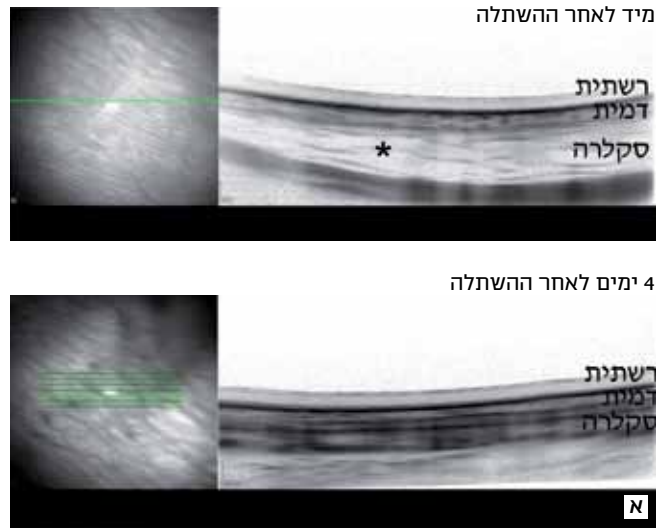
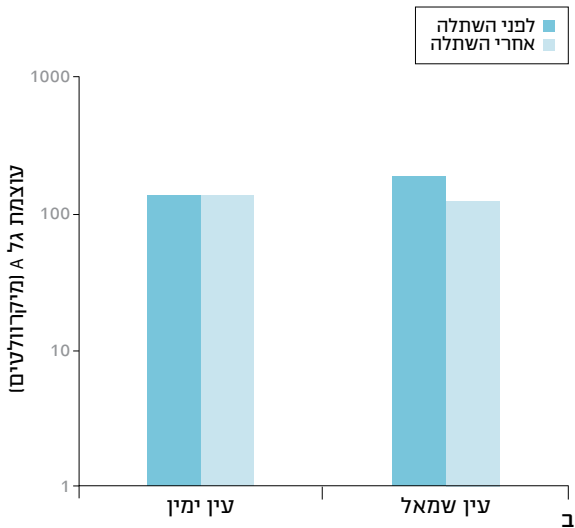


לאחר מדידת עובי הלובן העין בעזרת פכימטר (Accutome), בוצע חתך בלובן העין 5 מ"מ מהגובלת, ברבע הטמפורלי של העין. המזרק הוכנס בזווית של כ-5 מעלות מהדמית והפיץ נשלף לאורך הרצוי, בהתאם למדידת הפכימטר. 15 מיליון תאים ננפח של 500 מיקרוליטר הוזרקו דרך התעלה המשולשת שנוצרה בלובן העין.

אלקטרורטינוגרם (ERG): לפני הבדיקה בוצעה הסתגלות לחושך למשך מינימום של שש שעות עבור החולדות ושעתיים עבור הארנבות. הבדיקה בוצעה כפי שדווח במחקרנו הקודם [10]. בדיקת ה-ERG התבצעה בשתי העיניים בו זמנית, כאשר לכל עין חוברו שתי אלקטרודות: האחת, אלקטרודה הנוגעת בקרנית, והשנייה היא מחט שהוחדרה מתחת לעור בסמוך לפינת העין. בנוסף חוברת הארקה לזנב. תדירות הגירוי נעה בין 0.1-1000 Hz. תחילה בוצעה בדיקה באקלום לחושך, ולאחריה בוצע אקלום לאור במשך 10 דקות שלאחריה בוצעה בדיקה בתנאי אקלום לאור. בכל שלב ניתן גירוי אור בחמש עוצמות (0.023-23.5 קנדלה-שנייה/מטר²). בשלב האקלום לחושך התבצעו הגירויים במרווחי זמן של 1-30 שניות כתלות בעוצמה [10]. בשלב האקלום לתנאי אור בוצעו בכל העוצמות 20 גירויים במרווח של שנייה אחת בין גירוי לגירוי.

תמונה 3:

השתלת התאים בגישה הזעיר חודרנית אל החללים התוך וסקולריים בדמית של ארנבות אינה גורמת נזק לרשתית או לדמית. א. בבדיקת טומוגרפיה אופטית (OCT) ניתן לראות רשתית ודמית תקינות וכן מתיחה של הסקלרה (כוכבית) בזמן השתלת התאים. "המתיחה" נעלמת כעבור ארבעה ימים. ב. בדיקת אלקטרוטרינוגרם העלתה, כי לא חל שינוי בעוצמת גל A בעקבות ההשתלה של תאי הגזע בעין ימין. בתרשים מוצגת עוצמת גל A המרבית בתנאי אקלום לחושך, בתגובה לגירוי אור בעוצמה של 23.5 קנדלה-שניה/מטר² שנמדדה בשתי העיניים לפני השתלת תאי הגזע ושבוועיים לאחר ההשתלה. עין שמאל היוותה בקרה ואליה לא הוזרקו תאים.



אדם סומנו בצבע הפלואורסצנטי DiI והושלתו באמצעות המזרק לעין של ארנבות NZW בריאות. בעת ההזרקה לא נצפו השפעות לוואי בדמית, לא נראו דימומים לרשתית, ולא נצפו בועת היפרדות רשתית, נזק לעצב הראייה, שינויי גוון או כל פגיעה לא רצויה בעין. כמו כן, בתמונת קרקעית העין לא ניתן היה לזהות כל שינוי ברשתית במהלך ההזרקה ולאחריה. כאשר נבדקו חתכים של עיני הארנבות המושתלות במיקרוסקופ פלואורסצנטי, ניתן היה לזהות בבירור את פיזור התאים בשכבה דקה בחללים החוץ וסקולריים בכל הדמית (תמונה 2 ב'). לא נמצא כל סימון אדום בעיני הבקרה שלא עברו השתלה (תוצאות אינן מוצגות). בצביעה עם נוגדן המזהה באופן ספציפי גרעינים של תאי אדם, זוהו תאי הגזע המושתלים בחללים החוץ וסקולריים בכל שכבת הדמית גם שבועיים לאחר ההשתלה (תמונה 2 ג'). צביעה עם נוגדן כנגד סיבי אקטין המתבטא רק בתאי שריר חלק של דופן כלי הדם, זיהתה כי תאי הגזע נמצאים רק בחלל החוץ וסקולרי ולא זהו תאי גזע בתוך כלי הדם (תוצאות לא מוצגות). כפי שמוצג בתמונה 3 א', בבדיקות טומוגרפיה אופטית (OCT) של העין המושתלת מיד לאחר ההשתלה נמצא כי הרשתית ושכבת הדמית תקינות, לא נצפו מימצאים של קרעים ברשתית, היפרדות רשתית או דימומים בשכבת הדמית. בשכבת הלוברן העין נראו סימני "מתיחה" של השכבה, ככל הנראה בשל הלחץ הזמני שנוצר בעין בזמן ההזרקה. בבדיקות טומוגרפיה אופטית שבוצעו ארבעה ימים לאחר השתלת התאים, הלוברן העין נראתה תקינה ללא סימני "מתיחה", ובבדיקות טומוגרפיה אופטית נוספות שבוצעו 16 יום לאחר ההשתלה, נראו שתי העיניים ללא מימצאים חריגים (תוצאות לא מוצגות). בנוסף, בדקנו את תפקוד הרשתית לפני ושבוועיים לאחר השתלת התאים באמצעות אלקטרוטרינוגרם. כפי שניתן לראות בתמונה 3 ב', לא חל שינוי בעוצמת גל A לאחר השתלת התאים בעין המושתלת, ואין הבדל משמעותי בעוצמת גל A שנמדדה בעין המושתלת לעומת עין הבקרה בשתי נקודות הזמן שנבדקו.

ההליך ניוון הרשתית בחולדות ה-RCS מאופיין בניוון והעלמות שכבת תאי הפוטורצפטורים ברשתית, בדומה לנמ"ג בש [12]. על מנת לבדוק את השפעת השתלת תאי הגזע על התנוונות הפוטורצפטורים, בוצע ניתוח היסטולוגי של עיני החולדות (שלוש חולדות לכל נקודת זמן), והשווה מספר שכבות תאי הפוטורצפטורים בכל חיה בין עין הבקרה והעין שאליה הושלתו התאים. ניתן לראות בבירור בתרשים 1 ב', כי מספר שכבות תאי הפוטורצפטורים ברשתיות של עיניים לאחר השתלה היה גבוה משמעותית לעומת עיני הבקרה. כצפוי, ניתן לראות התאמה גבוהה בין מספר שכבות תאי הפוטורצפטורים לבין תפקוד הרשתית כפי שנמדד באלקטרוטרינוגרם. כך, כאשר החולדות מגיעות לגיל 70 יום (נקודת זמן של 6 שבועות לאחר ההשתלה), שכבת הפוטורצפטורים מתנוונת לכדי שכבה חד תאית ותגובת הרשתית הופכת לנמוכה ביותר (כ-3 מיקרוולטים בממוצע). בבדיקות ההיסטולוגיות לא נמצאו עדויות לדלקות או נזקים בעין המושתלת או בעין הביקורת, וכן באיברים מרכזיים (כבד, לב, ראות, טחול, כליות ומעינים). באיברים אלו (מלבד העין) לא נמצאו סימנים לנוכחות תאי הגזע האנושיים (תוצאות לא מוצגות). השתלת תאי גזע מזנכימיים מלשד עצם של אדם בשכבה דקה בתת רשתית ובחללים החוץ-וסקולריים בדמית של ארנבות, מבוצעת באמצעות מזרק המאפשר השתלה זעיר-חודרנית. לאור הצלחת הטיפול בתאי הגזע בחולדות, ולקראת ניסויים קליניים בבני אדם, ביקשנו לבדוק את בטיחות השתלת התאים בעין של חיה גדולה המדמה טוב יותר עין אנושית. להשתלת התאים בעיניים גדולות פיתחנו מזרק ייחודי הכולל מחט גמישה של 30G להזרקה התאים, ופיו נשלף שניתן לכוון את אורכו ובאמצעותו ניתן ליצור תעלה אלכסונית משולשת לתוך הדמית לכיוון אפיתל הרשתית (תמונה 2 א'). בבדיקת בטיחות ויעילות המזרק הושלתו תאי הגזע בארנבות, אשר עיניהן דומות יותר לעיני אדם מבחינת גודל ויחס נפחי זוגית/קרנית מאשר עיני חולדות. תאי גזע מזנכימיים מלשד עצם של

מסקנות

השתל לרקמת המטרה. פיזור התאים על שטח כה רחב של התת רשתית איפשר להדגים איכותית וכמותית את ההתאמה בין שינויים תפקודיים ומבניים ברשתית לאחר הטיפול בתאי גזע.

בשיטות ההשתלה שפורסמו עד כה, התאים המושתלים נמצאו מרוכזים בסמוך לנקודת ההזרקה. לכן, לא ניתן לבצע השתלה באזור מרכז הראייה; לחלופין, כדי להגיע למרכז הראייה, נדרשת מחט גמישה המושחלת בין הדמית ללובן העין ומוחדרת עד למרכז הראייה, עם השפעות לוואי מרובות. השפעות הלוואי היחידה שנצפתה היא "מתחה" בלובן העין, שנוצרה מיד לאחר הזרקת התאים ונעלמה כעבור מספר ימים. בארנבות הלובן העין דקה ואלסטית יותר מאשר באדם, וייתכן שבהשתלה בעין אדם לא תתרחש תופעה זו. אחת הבעיות האפשריות בהשתלת תאים לעין היא התפתחות צורה מיוחדת של דלקת הענבייה (Sympathetic Ophthalmia) שבה, בעקבות טראומה לעין אחת, נגרמת לאחר מספר שבועות פגיעה דלקתית על רקע חיסוני בעין השנייה.

במחקרנו, למרות שבוצעה השתלה קסנוגרפית של תאי אדם לחיה, לא ניצפו כל דלקות או נזקים בעין הלא מושתלת – אף חמישה חודשים לאחר ההשתלה – ועובדה זו מעידה על בטיחות הטיפול. עם זאת, ניוון הרשתית בחולדות חמישה חודשים מיום ההשתלה מעיד על כך שתאי הגזע האנושיים שהושתלו איבדו את יכולת הריפוי שלהם או שנדחו מהעין. אחד היתרונות של טיפול בתאי גזע מלשד עצם הוא היכולת לבצע השתלות אוטולוגיות, ואנו צופים כי בהשתלה אוטולוגית בחולים, השתלת תאי הגזע תהיה יעילה (אפקטיבית) לזמן רב יותר. שיטת ההשתלה החדשה שפותחה עשויה לשפר גם טיפולים אחרים קיימים, כגון טיפולים גנטיים למחלות ניוון רשתית תורשתית; הזרקת חומרים הנוגדים צמיחת כלי דם חדשים ישירות לדמית לחולי נמ"ג "רטוב"; כימותרפיה לסרטן גרורתי לעין; ותרופות לטיפול בדלקת בדמית (כורואידיטיס).

בהמשך ישיר לעבודה זו, אנו מתכננים לבצע ניסויים בעיני חזירים, הדומים ביותר לעיני אדם מבחינת גודל ומבנה, ולבדוק את בטיחות ההשתלה ופיזור התאים המושתלים. אנו צופים כי ניסויים אלו יובילו ישירות לניסויים קליניים ראשונים בחולים בעתיד הקרוב.

מחבר מכתוב: יגאל רוטשטריך

מכון גולדשלגר לחקר העין, חדר 220

מרכז רפואי שיבא, תל השומר

טלפון: 03-5302880, פקס: 03-5351577

דוא"ר: Ygal.Rotenstreich@sheba.health.gov.il

לראשונה הודגמה השתלת תאי גזע מזנכימיים מלשד עצם של אדם בשכבה דקה בתת רשתית ובחללים החוץ-וסקולריים בדמית של חולדות וארנבות, באמצעות שיטת השתלה חדשנית וזעיר-חודרנית שפותחה במעבדתנו, ללא היפרדות רשתית או דימומים. שיטה זו קלה יחסית לביצוע ואפשרה טיפול יעיל בקבוצת הניסוי (חיות) הגדולה ביותר שתוארה עד כה. ניתוח היסטולוגי אישש את נוכחות התאים המושתלים בתת רשתית ובחללים החוץ-וסקולריים בדמית לפחות שבועיים לאחר ההשתלה בחולדות ובארנבות. השתלת תאי הגזע שיפרה באופן משמעותי את תפקודי הרשתית בחולדות המודל של ניוון הרשתית, ועיכבה משמעותית את תהליך התנוונות ותמותת תאי הפוטורצפטורים למשך כחמישה חודשים לאחר ההשתלה. ההשתלה לא גרמה לדלקת או נזק בעיניים המושתלות או באברים מרכזיים. בדיקות האלקטרורטינוגרם והטומוגרפיה האופטית מעידות על כך שלא נגרם כל נזק לעין המושתלת או לעין הבקרה בעקבות ההשתלה.

דיון וסיכום

תוצאות עבודה זו מדגימות, כי השתלת תאי גזע מזנכימיים מלשד עצם של אדם בחלל התת רשתית ובחללים החוץ-וסקולריים בדמית, עשויה להוות טיפול בטוח ויעיל לחולי ניוון מקולרי וניוון רשתית. השיטה החדשה שפותחה היא זעיר-חודרנית ומאפשרת להשתל תאים על פני רוב שטח התת רשתית, בכניסה בנקודה אחת לעין הרחק מהמקולה, כלומר ניתן יהיה להשתל תאים לאזור מרכז הראיה בחולי נמ"ג ללא חדירה לאזור.

לערכתנו, יעילות הטיפול הגבוהה בחיות נבעה משיטת ההזרקה. השתלת התאים בקרבת הפוטורצפטורים, בחלל התת רשתית ובחללים החוץ-וסקולריים של הדמית המזינה באופן טבעי את הרשתית, איפשרה ככל הנראה מעבר יעיל של חלבונים נירוטרופיים וציטוקינים שהופרו מתאי הגזע אל תאי הרשתית ומנעה את תמותת תאי הפוטורצפטורים. ההזרקה לחללים החוץ-וסקולריים בסמוך לתאי אפיתל הרשתית מביאה את החומר הטיפולי לקרבת הרשתית ללא היפרדות רשתית. כמו כן, התאים הושתלו בשכבה דקה יחסית ומפושטת, ולא כגושים המכילים מספר תאים גדול המרוכזים במקום אחד; כך גדל משמעותית שטח הפנים של השתל וייתכן שהדבר אינטראקציה טובה יותר בין

ביבליוגרפיה

<p>1. Friedman DS, O'Colmain BJ, Munoz B & al, Prevalence of age-related macular degeneration in the united states. Arch Ophthalmol, 2004;122:564-572.</p> <p>2. Hartong DT, Berson EL & Dryja TP, Retinitis pigmentosa. Lancet, 2006;368:1795-809.</p> <p>3. Lim LS, Mitchell P, Seddon JM & al, Age-related macular degeneration. The Lancet, 2012;379:1728-1738.</p> <p>4. Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G & al, Embryonic stem cell trials for macular degeneration: A preliminary</p>	<p>report. Lancet, 2012;379:713-720.</p> <p>5. Ramsden CM, Pownner MB, Carr AJ & al, Stem cells in retinal regeneration: Past, present and future. Development, 2013;140:2576-2585.</p> <p>6. Lu B, Wang S, Girman S, McGill T & al, Human adult bone marrow-derived somatic cells rescue vision in a rodent model of retinal degeneration. Exp Eye Res, 2010;91:449-455.</p> <p>7. Idelson M, Alper R, Obolensky A & al, Directed differentiation of human</p>	<p>embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells. Cell Stem Cell, 2009;5:396-408.</p> <p>8. Oh JY, Kim MK, Shin MS & al, The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. Stem Cells, 2008;26:1047-1055.</p> <p>9. Caplan AI & Dennis JE, Mesenchymal stem cells as trophic mediators. J Cell Biochem, 2006;98:1076-1084.</p> <p>10. Tzameret A, Sher I, Belkin M & al, Transplantation</p>	<p>of human bone marrow mesenchymal stem cells as a thin subretinal layer ameliorates retinal degeneration in a rat model of retinal dystrophy. Exp Eye Res, 2014;118:135-144.</p> <p>11. D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J & al, Mutation of the receptor tyrosine kinase gene mertk in the retinal dystrophic RCS rat. Hum Mol Genet, 2000;9:645-651.</p> <p>12. Bourne MC, Campbell DA & Tansley K, Hereditary degeneration of the rat retina. Br J Ophthalmol, 1938;22:613-623.</p>
--	---	---	---