חידושים בניתוחי שחזור משטח העין: מהשתלת רקמות להשתלת תאים

פרופ' אבי סלומון
מחלקת עיניים, מרכז רפואי הדסה עין כרם, ירושלים

מחלות משטח העין עם פגיעה בתאי האב של הלימבוס נחלקות ל-2 קבוצות:

1. מחלות שבהן הקרנית מצופה באפיתל שמקורו בלחמית, אך שכבת הדמעות עדיין קיימת ומשטח העין רטוב.
2. מחלות שבהן משטח העין יבש לגמרי ומצופה בקרטין.

בקבוצת המחלות הראשונה ניתן לבצע ניתוחים שונים לשחזור משטח העין, ואילו בקבוצת המחלות השנייה ניתן לטפל רק בהשתלת תותבת (קרטופרוטזה). מאמר זה יציג את החידושים האחרונים בניתוחי שחזור משטח העין, ויתמקד במעבר שחל בשנים האחרונות מהשתלת רקמות (השתלות לימבוס אוטולוגי או אלוגני) להשתלת תאים (תאי אפיתל ממקורות שונים המתורבתים במעבדה על גבי מצעים ביולוגיים ומושתלים על משטח העין).

טיפול רב-שלבי (טבלה 1)

הטיפול במחלות משטח העין עם נזק קשה וחסר תאי אב לימבליים הוא טיפול מורכב ורב-שלבי (**טבלה 1**):

שלב ראשון

בשלב זה משפרים את מנגנוני ההגנה של משטח העין, והוא כולל טיפול בחוסר דמעות, בדלקת העפעפיים, דיכוי דלקת כרונית וטיפול בארוזיות חוזרות וכיבים כרוניים בקרנית. רק לאחר פתרון הבעיות הללו, ניתן לגשת לשלב השני.

שלב שני

השלב השני כולל ניתוחי שחזור משטח העין. אלו כוללים ראשית, שחזור פורניקס ותיקון סימבלפרון, וניתוחי עפעפיים לתיקון מנח לא תקין של קצות העפעפיים והריסים. לאחר מכן מגיע החלק העיקרי בניתוחי השחזור – שהוא גם הקשה מכולם. מטרת חלק זה ליצור אפיתל קרנית יציב ותקין ככל האפשר. ניתוחים אלו כוללים השתלת רקמת לימבוס אוטולוגי או אלוגני, או השתלת תאי אפיתל שגודלו על מצע כלשהו במעבדה. על ניתוחים אלו ידובר בהמשך. לאחר השגת משטח אפיתל יציב, השלב הבא יכלול השתלת קרנית, אם הקרנית אינה שקופה.

שלב שלישי

שלב זה כולל שימור מנגנוני ההגנה של משטח העין תוך שימת דגש מתמדת לשכבת הדמעות, בריאות העפעפיים ושלמות האפיתל.

במרכז הטיפול במחלות משטח העין עומד הצורך ליצור משטח אפיתל יציב. שתי גישות עיקריות קיימות היום להשגת מטרה זו (**טבלה 2**). הגישה הראשונה היא השתלת רקמות, ואילו הגישה השנייה, החדשנית יותר, מבוססת על הטיפול התאי (Cell Therapy) וכרוכה בהשתלת תאי אפיתל מתורבתים.

השתלות רקמה (טבלאות 3,2)

השתלת רקמה כוללת השתלת אזור לימבוס, שניתן לקצור מהעין השנייה אם היא בריאה (השתלת לימבוס אוטולוגית) או מתורם חי קרוב משפחה או מתרומת נפטר (השתלת לימבוס אלוגנית). השתלת לימבוס אוטולוגית תוארה לראשונה ע"י Kenyon ו-Tseng (1) (**טבלה 3**), וזוהי קרוב לוודאי הפעולה הניתוחית המוצלחת ביותר בניתוחי שחזור משטח העין. אולם, ניתוח זה אינו מתאים בפגיעה דו-עינית של הלימבוס, ולא ניתן לבצעו בחולים עם פגיעה חד-עינית החוששים מהתערבות ניתוחית בעינם היחידה. הבטיחות והתוצאות הטובות של גישה ניתוחית זו הוצגו במספר רב של עבודות בספרות.

השתלת לימבוס אלוגנית מבוצעת בחולים עם חוסר לימבלי דו-עיני (2). החסרונות של ניתוח זה הם הצורך במתן תרופות נוגדות דחייה למשך זמן רב, שכיחות גבוהה של דחיית השתל ואובדן הדרגתי של תאים מהרקמה הנתרמת. השכיחות המצטברת של כשל שתלי לימבוס אלוגניים היא כ-50% בתוך 3 שנים (3).

טבלה 1: הגישה הטיפולית במחלות משטח העין עם כשל לימבלי היא רב-שלבית

שלב 1	שיפור מנגנוני ההגנה של משטח העין	1. טיפול בחוסר דמעות 2. טיפול בדלקת העפעפיים 3. דיכוי דלקת כרונית 4. טיפול בארוזיות חוזרות וכיבים כרוניים 5. טיפול במנח עפעפיים וריסים לא תקין
שלב 2	שחזור ניתוחי של משטח העין	1. שחזור הפורניקס ותיקון סימבלפרון; תיקון מנח העפעפיים 2. יצירת משטח אפיתל יציב (השתלות לימבוס; השתלות תאים) 3. השתלת קרנית
שלב 3	שמירת מנגנוני ההגנה של משטח העין	1. טיפול בחוסר דמעות 2. מניעת ארוזיות וכיבים בקרנית

חידושים בניתוחי שחזור משטח העין: מהשתלת רקמות להשתלת תאים

טבלה 2: יצירת משטח אפיתל יציב

השתלות רקמה	1. השתלת לימבוס אוטולוגית
	2. השתלת לימבוס אלוגנית
	א. רקמת קרנית מתרומת נפטר
	ב. מתרומת קרוב משפחה עם תאימות רקמות
השתלות תאים	1. ממקור לימבלי
	א. אוטולוגי
	ב. אלוגני
	1. רקמת קרנית מתרומת נפטר
	2. מתרומת קרוב משפחה עם תאימות רקמות
	2. ממקור אוראלי אוטולוגי

טבלה 3: התפתחות הניתוחים לשחזור משטח העין

השתלת רקמה (Tissue Transplantation)	
1977 Thoft	Conjunctival Autograft
1984 Thoft & Kinoshita	Keratoepithelioplasty (Cadaver)
1989 Kenyon & Tseng	Conjunctival Limbal Autograft
1994 Tsai & Tseng	Keratolimbal Allograft (Cadaver)
1995 Kim & Tseng	Amniotic Membrane Transplantation
1999 Holland	Conjunctival Limbal Allograft (Living-Related)
השתלת תאים (Cell Transplantation)	
2001 Rama et al.	*ex vivo* Expansion of Limbal Stem Cells on Fibrin as a Carrier
2000 Tsai et al.	*ex vivo* Expansion on Intact AM
2000 Schwab et al.	*ex vivo* Expansion on 3T3 and then AM
2003 Kinoshita et al.	*ex vivo* Expansion On Denuded AM with 3T3 on the Plastic Plate
2004 Nishida et al.	*ex vivo* Expansion on 3T3 Using a Temperature-Sensitive Plastic Plate Without a Carrier

השתלות תאים (טבלאות 3,2)

1. השתלות תאים ממקור לימבלי

בגלל החסרונות הכרוכים בהשתלות רקמה נעשה בשנים האחרונות מאמץ ע"י מספר קבוצות בעולם לפתח את כיוון הטיפול התאי (Cell Therapy). גישה זו כרוכה בתירבות תאי אפיתל ממקורות שונים על גבי מצעים שונים, המשמשים בד"כ גם כשכבת נשא לתאי האפיתל לצורך ביצוע ההשתלה. השתלה של תאי אב אפיתליאליים של הלימבוס ממקור אוטולוגי תוארה לראשונה ע"י Tsai בשנת 2000 (4). גישה נוספת תוארה ע"י Rama בשנת 2001 (**טבלה 3**) שבה תאי אפיתל לימבליים גודלו על גבי מצע שעשוי מפיברין (5).

יש מספר סוגים של מערכות לגידול תאי אפיתל להשתלה (6). המקור לתאים יכול להיות אוטולגי או אלוגני. מקור התרבית האוטולוגית הוא מביופסיה קטנה הנלקחת מהלימבוס של העין הבריאה של המושתל, ושגודלה 1–2 מ"מ. הדבר מקטין את הסיכון לעין התורמת. זאת בהשוואה להשתלת לימבוס אוטולוגית רגילה שבמהלכה נלקחת מהעין הבריאה רקמה בגודל של 30%–40% מהיקף הלימבוס. מקור התרבית האלוגנית הוא מביופסיה קטנה מהלימבוס של קרוב משפחה, רצוי בעל תאימות רקמות, או מהלימבוס של רקמת קרנית רגילה מתרומת מת.

תוארו מספר מצעים לתירבות תאי האפיתל, שבהם הממברנה האמניוטית, Fibrin Gel, עדשת מגע, פולימר סינתטי הנמס בשינוי הטמפרטורה, ואפילו הקופסית הקדמית של העדשה.

יש יתרונות רבים למערכת תירבות תאי האפיתל. מערכת התרבית שומרת על תכונות התאים מהלימבוס כ"תאי אב", ובאותו הזמן מונעת את חדירתם של מרכיבים אימונוגניים לתרבית (כגון: פיברובלסטים, תאי אנדותל וסקולרי ותאי לנגרהנס). הממברנה האמניוטית, המשמשת כמצע ברוב התרביות הללו, מספקת את תפקיד קרום הבסיס (Basement Membrane) החיוני לצמיחה תקינה של תאי אפיתל והחסר בד"כ במחלות משטח העין. השילוב של תאי אפיתל מתורבתים עם הממברנה האמניוטית יוצר יחידה פיזיולוגית, שמתאימה להשתלה ולשחזור משטח הקרנית. הממברנה האמניוטית היא אמצעי נוח להעברת התאים מהמעבדה לחדר הניתוח, וניתן לקבע אותה בקלות למשטח העין במהלך הניתוח עם תפרים או עם דבק ביולוגי.

2. השתלות תאים ממקור אוראלי

בשנים האחרונות פותח מקור נוסף של תאים במסגרת השתלות התאים לשחזור משטח העין, תאי אפיתל של רירית הפה. מחקרים שבוצעו ע"י קבוצתו של Kinoshita הראו שניתן להשתיל תאי אפיתל אוראלי שתורבתו על גבי הממברנה

האמניוטית במודל חיה של חסר לימבלי מלא. תאים אלו נמצאו דומים בתכונותיהם לתאי אפיתל של הקרנית, ויצרו משטח אפיתל יציב על פני הקרנית (7). בעקבות ההצלחה בניסויי החיה, בוצעה השתלת תאי אפיתל אוראליים אוטולוגיים גם באנשים עם מחלות קשות של משטח העין וחוסר לימבלי דו-עיני מלא (8).

לגישה זו של השתלת תאי אפיתל אוראלי אוטולגי יש מספר יתרונות: המקור האוטולוגי של התאים מונע את הצורך בתרופות נוגדות דחייה, הדרושות בהשתלה אלוגנית. הפוטנציאל של תאי האפיתל האוראלי להתחלק ולגדול הוא רב יותר מזה של אפיתל משטח העין. נוסף על כך, ניתן לחזור על נטילת רקמה מהפה מספר פעמים במקרה של כישלון התרבית במעבדה.

שיטת גידול התאים

שיטת גידול התאים והכנתם להשתלה כוללת מספר שלבים:

ביופסיה של רקמת לימבוס או רקמה מרירית הפה (**תמונה 1**); הכנת התרבית כתרבית-רקמה כאשר התאים יוצאים מהרקמה ישירות על פני המצע, או הפרדת התאים מהרקמה בעזרת אנזימים ויצירת תרחיף עם תאים בודדים הנזרעים על פני המצע; הכנת נוזל מתאים לגידול תאי האפיתל; הכנת המצע וקיבועו

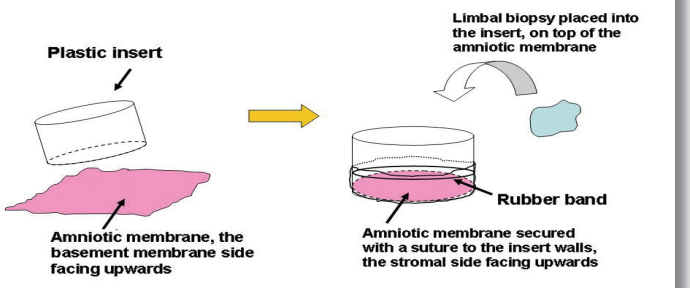


תמונה 1: קצירת רקמה מרירית הפה להשתלת תאי אפיתל אוראלי



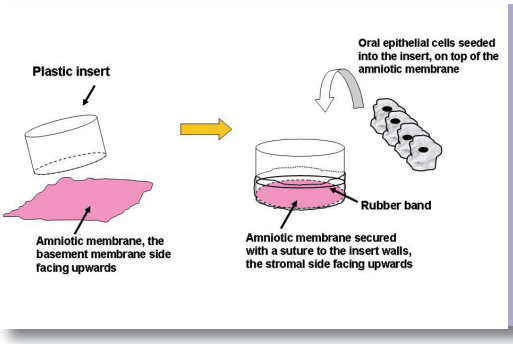
תמונה 2: מערכת התרבית הכוללת טבעות פלסטיק שעליהן מעוגנת ממברנה אמניוטית שעליה נזרעו תאי אפיתל אוראלי

תמונה 3: מערכת תרבית רקמה - רקמת לימבוס קטנה מונחת על גבי הממברנה האמניוטית, וממנה יצמחו התאים על גבי הממברנה



למתקן פלסטי שאותו ניתן יהיה להעביר בקלות לחדר הניתוח (**תמונה 2**); ושיטות נוספות, כגון: שכבת הזנה של תאי 3T3 וחשיפת התאים באופן חלקי לאוויר כדי לעודד רב-שכבתיות של תאי האפיתל.

תרבית הרקמה (Explant Culture) כוללת חתיכה קטנה מרקמת הביופסיה שמניחים על גבי קרום הבסיס של הממברנה האמניוטית (**תמונה 3**). הממברנה האמניוטית משמשת כאן הן כמצע גידול והן כנשא. הממברנה עם הרקמה שעליה טבולות בתוך נוזל גידול המכיל גורמי גידול ותוספים שונים המעודדים את צמיחת תאי האפיתל. כמו כן, מכיל נוזל הגידול סרום שמכינים מדמו של החולה שבו מיועדת ההשתלה. משך התרבית 2-3 שבועות. בשבוע האחרון מבוצעת חשיפה חלקית לאוויר כדי לעודד התמיינות ורב-שכבתיות של התאים. בשיטה השנייה מכינים תרבית של תאים בודדים שמפרידים בעזרת האנזים טריפסין מרקמת הביופסיה, ולאחר מכן זורעים אותם על גבי הממברנה האמניוטית (**תמונה 4**).



תמונה 4: מערכת תרבית תאים בודדים - תאי האפיתל מופרדים אנזימטית מהרקמה, ונזרעים על גבי הממברנה האמניוטית

המצע לתרבית התאים המקובל ביותר במערכות האלו היא הממברנה האמניוטית. הממברנה הזו מעודדת צמיחת אפיתל על צד קרום הבסיס שלה, ושומרת על תכונות תאי האב של תאי

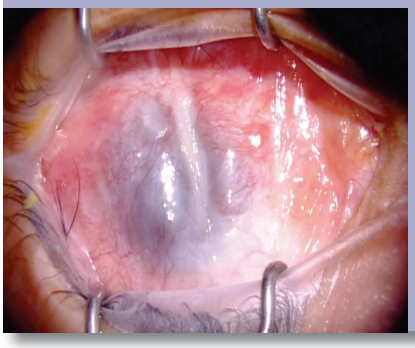
חידושים בניתוחי שחזור משטח העין: מהשתלת רקמות להשתלת תאים

לימבוס הצומחים עליה. יש המסירים את האפיתל האמניוטי, ויש המשמרים אותו בגלל היותו מקור לגורמי גידול רבים. את הממברנה האמניוטית מכינים משליה המתקבלת באופן סטרילי במהלך ניתוח קיסרי, והיא נוחה לשימוש כנשא לתאי אפיתל, ונוחה לקיבוע ולתפירה על גבי משטח העין. תחליף לממברנה האמניוטית תואר ע"י Nishida בשנת 2004, שהשתמש בפולימר סינתטי המשתנה בשינויי הטמפרטורה (9). בטמפרטורה של 37°C גדלים התאים על פני הפולימר בתנאי תרבית. בטמפרטורת החדר נעשים שינויים בהרכבו, ושכבת תאי האפיתל מתנתקת ממנו ומועברת אל פני משטח העין להשתלה.

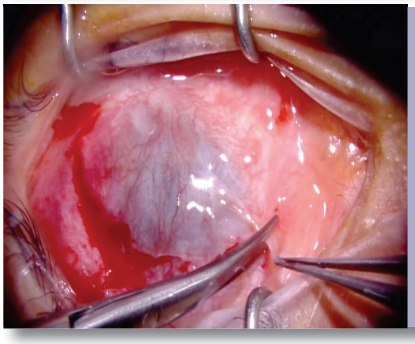
השיטה הניתוחית של השתלת תאי אפיתל

השיטה הנתוחית של השתלת תאי אפיתל כוללת בתחילה את ההסרה הרגילה של רקמת הצלקת מעל פני הקרנית (**תמונות 5א–5ב**), חיתוך שטחי של הקרנית כשרקמת הצלקת מערבת את השכבות השטחיות של הקרנית (**תמונות 5ג–5ד**), הסרת רקמת צלקת תת-לחמיתית בהיקף הלימבוס ועד למרחק של 5–7 מ"מ ממנו (**תמונה 5ה**). לאחר מכן ניתן להשתמש במיטומיצין C בריכוז של 0.02% בספוגיות המוכנסות בין הלחמית לסקלרה למשך 2 דקות (**תמונה 5ו**) ושטיפת החומר לאחר מכן. לאחר חשיפת הקרנית והסקלרה שסביב הלימבוס מרקמת הצלקת, מוסרת הממברנה האמניוטית והתאים שעליה

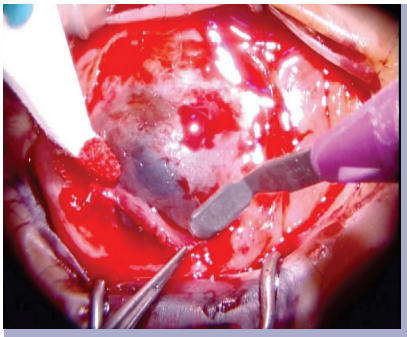
תמונות 5א–5ח: ניתוח שחזור משטח העין והשתלת תאי אפיתל אוראלי אוטולוגי בחולה עם חוסר לימבלי קשה דו-עיני לאחר כוויית בסיס, שבוצע במרכז הרפואי הדסה עין כרם

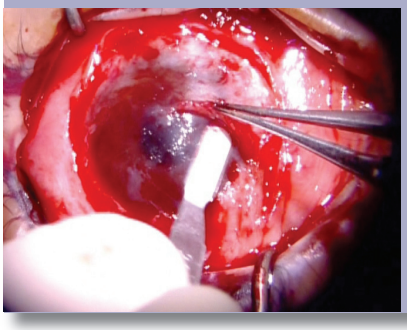


5א: המראה לפני הניתוח. רקמת צלקת נרחבת מכסה את כל משטח העין

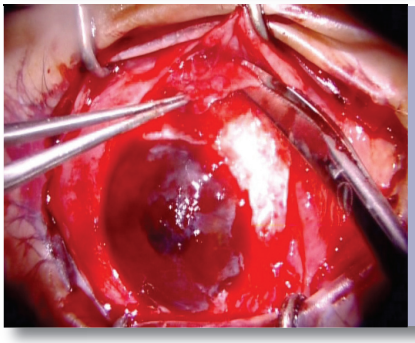


5ב: פתיחת הלחמית באזור הלימבוס וחיתוך סביב הלימבוס למציאת מישור הפרדה בין רקמת הצלקת לקרנית

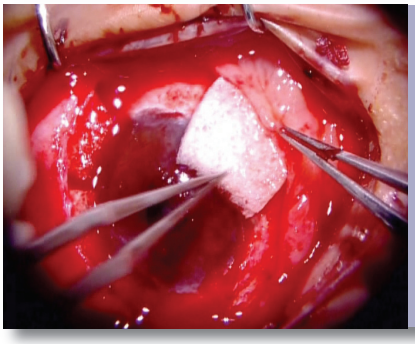




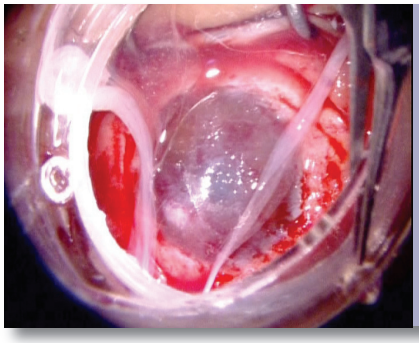
5ג–ד: הסרת רקמת הצלקת והשכבות החיצוניות של הקרנית



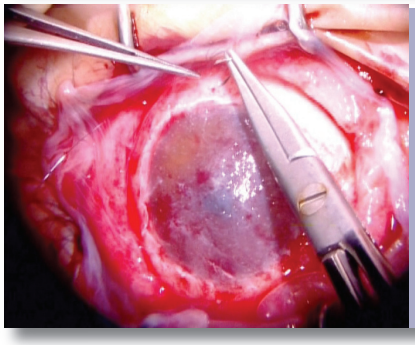
5ה: הסרה נרחבת של רקמת צלקת תת-לחמיתית סביב הלימבוס למרחק של 5–7 מ"מ ממנו, עד לקבלת סקלרה חשופה



5ו: הנחת ספוגיות עם מיטומיצין C בין הלחמית לסקלרה



5ז: הסרת הממברנה האמניוטית והתאים שעליה מטבעת הפלסטיק והנחתה על הקרנית



5ח: תפירת הממברנה האמניוטית לסקלרה סביב הלימבוס עם תפר ניילון 0-10 ממושך, ועיגון נוסף עם תפרים בודדים

מטבעת הפלסטיק, נפרשת על גבי הקרנית (**תמונה 5ז**), ונתפרת לסקלרה בעזרת תפרי ניילון 0-10 (**תמונה 5ח**). בתום הניתוח מבוצעת תפירה זמנית של העפעפיים, וזו נשארת למשך כשבועיים כדי להגן על תאי האפיתל המושתלים, ולאפשר קליטה נאותה של התאים ושל הממברנה האמניוטית על משטח העין. התפרים מוסרים כ-3-4 שבועות לאחר הניתוח, ולאחר שנצפה ציפוי מאפיתל מלא ויציב. במשך תקופה זו ניתן טיפול מקומי עם סטרואידים ואנטיביוטיקה.

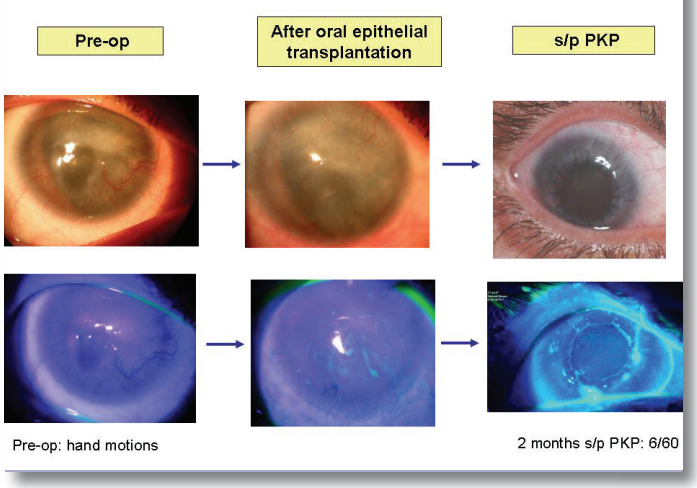
תוצאות ניתוחי השתלות רקמה והשתלות תאים

התוצאות של ניתוחי השתלות הרקמה והשתלות התאים תוארו במספר רב של מאמרים בספרות. אמות המידה להצלחה אינן מוגדרות היטב בספרות, אך בד"כ כוללות יצירת משטח אפיתל יציב על פני הקרנית, היעדר אלמנטים של רקמת הלחמית על פני הקרנית, היעדר חוסרים של אפיתל וכיבים כרוניים בקרנית, ונסיגת כלי הדם מן הקרנית. בהתבסס על מדדים אלו, שיעור ההצלחה הממוצע שדווח בספרות בשנים 1997 עד 2006 בהשתלות לימביליות הוא כ-77%, עם טווח רחב של 33%-100% (6).

התוצאות ארוכות הטווח של השתלות תאים ממקור אוראלי הן טובות. יש לזכור שבשלב מאוחר יותר, לאחר הצלחת השתלת התאים, יש במקרים רבים צורך לבצע השתלת קרנית (10). במרכז הרפואי הדסה עין כרם בוצעו עד כה מספר ניתוחי השתלת תאים ממקור אוראלי, ובחלק מן החולים בוצעה בשלב שני השתלת קרנית (**תמונה 6**). עם זאת, מספר המקרים בספרות הוא עדיין קטן ומשך המעקב מוגבל. צמיחת כלי דם בהיקף הקרנית דווחה בחלק מן המושתלים. כ"כ עדיין לא ברור אם התאים המושתלים שורדים על פני משטח העין, ואם קיימת בתוכם אוכלוסיית תאי אב המסוגלת להחזיק ביציבות את משטח תאי האפיתל על הקרנית. עם זאת, שיטה זו נראית כפתרון מבטיח לחולים עם כשל לימבלי קשה ודו-עיני, המאפשרת הימנעות מהשתלה אלוגנית עם הסיכון הגבוה שבדחייה והצורך בטיפול נוגד דחייה עם תרופות בעלות סיבוכים רבים.

לסיכום, שחזור משטח העין במחלות שבהן יש פגיעה לימבלית קשה הוא אחד התחומים המאתגרים ביותר ברפואת עיניים. הוא כרוך בגישה רב-שלבית המותאמת אישית לכל חולה על פי מאפייני מחלתו, ובצורך בניתוחים רבים ומורכבים. בשנים האחרונות קיימת נטייה לעבור להשתלות המבוססות על תאים במקום על רקמות, דבר המקטין את הצורך בקצירת רקמת לימבוס מתורמים חיים או מהעין השנייה של אותו חולה. האפיתל הלימבלי הוא מקור טוב להשתלות תאים, ובשנים האחרונות

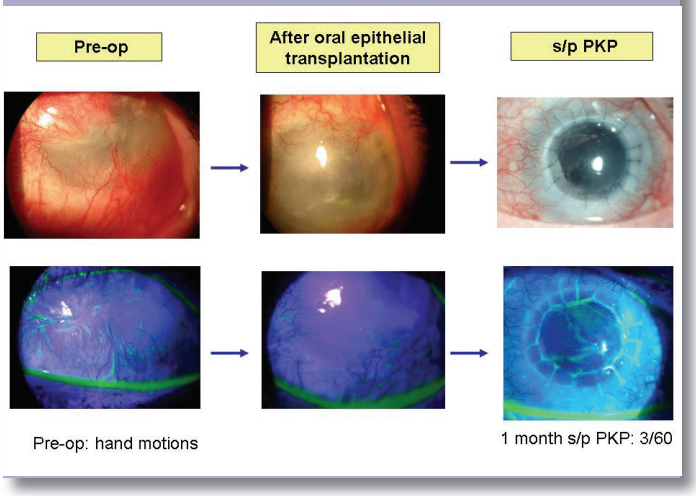
תמונה 6: חולה עם Aniridia וחסר לימבלי דו-עיני שנותח במרכז הרפואי הדסה עין כרם. מצד שמאל - המראה לפני הניתוח; במרכז - המראה לאחר השתלת תאים אוראליים אוטולוגיים; מימין - לאחר השתלת קרנית



חידושים בניתוחי שחזור משטח העין: מהשתלת רקמות להשתלת תאים

האפיתל האוראלי נתגלה כמקור אוטולוגי יעיל לשחזור משטח העין במקום תאי אפיתל ממקור לימבלי. יש לזכור, עם זאת, שגישות אלו מחייבות שימוש במעבדה ייעודית, המותאמת להכנת תאים להשתלה. כמו כן, ההצלחה ארוכת הטווח של השתלת התאים האוראליים עדיין אינה ברורה.

תמונה 7: חולה עם כווייה כימית דו-עינית שנותח במרכז הרפואי הדסה עין כרם. מצד שמאל – המראה לפני הניתוח; במרכז – המראה לאחר השתלת תאים אוראליים אוטולוגיים; מימין – לאחר השתלת קרנית



References

1. Kenyon KR, Tseng SCG. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. Ophthalmology 1989;96:709-723
2. Tsai RJF, Tseng SCG. Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstruction. Cornea 1994;13:389-400
3. Solomon A, Ellies P, Anderson DF, *et al*. Long-term outcome of keratolimbal allograft with or without penetrating keratoplasty for total limbal stem cell deficiency. Ophthalmology 2002;109:1159-1166
4. Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. NEJM 2000;343:86-93
5. Rama P, Bonini S, Lambiase A, *et al*. Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. Transplantation 2001;72:1478-1485
6. Shortt AJ, Secker GA, Notara MD, *et al*. Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results. Surv Ophthalmol 2007;52:483-502
7. Nakamura T, Endo K, Cooper LJ, *et al*. The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. Invest Ophthalmol Vis Sci 2003;44:106-116
8. Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, *et al*. Midterm results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. Am J Ophthalmol 2006;141:267-275
9. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, *et al*. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. NEJM 2004;351:1187-1196
10. Inatomi T, Nakamura T, Kojyo M, *et al*. Ocular surface reconstruction with combination of cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation and penetrating keratoplasty. Am J Ophthalmol 2006;142:757-764