

ספירואידים הינם גושים רב תאיים אשר נוצרים כתוצאה מתהליכי התגבשות של תאים, לרוב סרטניים, המגודלים בתנאים המעודדים אותם להתפתח לכלל צבר תאיים כדורי. בהשוואה לצורת הגידול הנפוצה של תאים כמרבד תאים חד שכבתי (monolayer), המודל התלת-ממדי של הספירואידים הוכח כמחקה בצורה טובה יותר את מצבם הפיזיולוגי של הגידול הראשוני המוצק וגרורותיו ואת תגובתם לטיפולים רדיואקטיביים וכימותרפיים. בנוסף, הוכח כי התהליכים הביולוגיים המערבים בתהליכי ההתגבשות של התאים לכלל ספירואידים משקפים תהליכים פיזיולוגיים הקשורים להיווצרות והתפשטות של הגרורות הסרטניות. כתוצאה מכך, בחינת השפעת חומרים שונים על תהליך ההתגבשות נחשבת ככלי מבטיח לפיתוח שיטות חדשניות להתערבות תרופתית אף בשלביים ראשוניים אלו של התפתחות הגידולים הסרטניים. על אף יתרונותיו הברורים, מודל הספירואיד אינו נמצא בשימוש רחב בתעשייה הפרמצבטית מחוסר התאמה של השיטות הנהוגות לגידול ומעקב אחרי הספירואידים למערכות המדידה המצויות בתעשייה זו, ומהיעדר תבחינים פשוטים אשר יאפינו את השפעת התרופות על הספירואידים.

עבודה זו מספקת כלים חדשניים לבחינה של תרופות אנטי סרטניות המתבססים על השפעת התרופות הנבדקות על ספירואידים מתאי סרטן ועל תהליך ההתגבשות שלהם. כלים אלו, מספקים פתרון כולל המורכב מטכנולוגיה ייחודית ליצירת הספירואידים ומעקב אחריהם, ניטור התהליך במערכת מבוססת מיקרוסקופ ללא צורך בסמן חיצוני באמצעות רצף של תמונות אור עובר, ומגוון רחב של שיטות מבוססות עיבוד תמונה להפקת פרמטרים חדים לבחינת יעילות הטיפול התרופתי. הכלים מתוכננים כך שיתאימו לשימוש במערכות האוטומטיות לסריקת תרופות הנהוגות. אופן השימוש בכלים אלו, והבהירות והדיוק של התוצאות המתקבלות בעזרתם מודגמים על מגוון סוגי תאים שונים ומגוון טיפולים תרופתיים. בנוסף, העבודה כוללת פרק תיאורטי משמעותי העוסק באפיון הדינמיקה של תהליך התגבשות התאים לכלל ספירואידים. מסקנות פרק זה מחזקות את הצורך בפיתוח הכלים שיוצגו בעבודה זו.

העבודה מתחלקת לחמישה פרקים.

הפרק הראשון, הינו מבוא המציג בקצרה את אופן השימוש בתבחינים מבוססי תאים לחיפוש תרופות בתעשייה הפרמצבטית, ומדגיש את הצורך הדחוף בפיתוח תבחינים יעילים יותר אשר ינבאו נכונה את הצלחת החומרים הנבדקים בשלב הניסויים הקליניים. מודגשת החשיבות של מודל הספירואיד והפוטנציאל הטמון בו הן לשיפור יכולת הניבוי של הפרמטרים הנמדדים בצורות הגידול המקובלות והן לפיתוח תבחינים חדשניים אשר מתאפשרים רק באמצעותו כגון מדידת השינוי בנפח הגידול הסרטני בעקבות הטיפול הכימותרפי. כמו כן, מודגשת החשיבות במעקב אחר תהליך התגבשות הספירואידים ככלי שעשוי לתרום להבנת תהליכי האינטראקציה הבין-תאיים המערבים בתהליך היווצרות הגרורות הסרטניות. לבסוף, מוצגים האתגרים בעיבוד תמונה של תמונות אור עובר של תאים חיים.

הפרק השני, כולל מודל תיאורטי החוקר את מידת ההשפעה של הגורמים השונים התורמים לתהליך ההתגבשות הספירואידיים על פני משטחים המצופים בחומר המונע את הידבקות התאים. הפרק בא למלא את הפער הנגרם מהיעדר בסיס תיאורטי שיאפשר הסקת מסקנות מדויקות מתוך ניסויים במערכות אלו כאמצעי לבחינת כוחות הידבקות בין-תאיים. זאת, על אף השימוש המעשי הנרחב בהם למטרה זו. השפעת הגורמים השונים נבחנת באמצעות סימולציית מונטה קרלו המדמה את תנועתיות התאים והכוחות ביניהם ומאפשרת גמישות בהגדרת הפרמטרים המשפיעים על תהליך ההתגבשות.

המודל מגלה כי הצפיפות הראשונית של התאים כמו גם כליאתם של התאים בנפחים מוגבלים אינם משפיעים במידה משמעותית על מספר הגושים הנוצרים ביחידת שטח נתונה. גודלם של התאים, אמנם משפיע על קצב תהליך ההתגבשות אך האפקט משמעותי רק עבור שינויים משמעותיים בגודל התאים. הגורמים העיקריים המשפיעים על קצב תהליך ההתגבשות ועל מספר הגושים הצפוי לאחר זמן נתון הינם מידת התנועתיות של התאים והסיכוי להתמזגות בין התאים בשעת מפגש ביניהם. באשר לגורם האחרון, המודל מגלה כי התלות של קצב תהליך ההתגבשות בסיכוי שמפגש בודד בין תאים יביא להתמזגותם אינה ליניארית. עובדה זו לכך שמדידת קצב תהליך ההתגבשות אינה יכולה לכמת בצורה מדויקת את יכולת ההידבקות של התאים אלא לכל היותר לעמוד באופן איכותי על שינויים משמעותיים ביותר החלים בו. בנוסף, המודל מראה כי בהינתן תיאור קינטי של קצב תהליך ההתגבשות הוא יכול להיות מוסבר באופן שווה הן עבור מצב של תנועתיות גבוהה של התאים אך סיכוי נמוך להתנגשות ביניהם והן עבור המצב ההפוך. עובדה זו מדגישה את חולשתו של הפרמטר הזה באפיון אמיתי של תהליך ההתגבשות המתרחש במערכות הניסויית של המשטח הפתוח המצופה בחומר מונע הידבקות תאים.

בעקבות עבודות קודמות אשר טענו כי כוחות ארוכי טווח הנגרמים מתהליכי כימוטקסיס וניתנים לתיאור באמצעות קיומו של רדיוס השפעה אחיד סביב התאים משפיעים אף הם על קצב תהליך ההתגבשות, המודל בוחן את השפעת כוחות שכאלו על קצב התהליך. ואכן המודל חוזה כי באם קיימים כוחות שכאלו, השפעתם צפויה להיות גדולה ביותר כך שקצב תהליך ההתגבשות ומספר הגושים שייוצרו יהיה מושפע כמעט אך ורק מגודלו של רדיוס ההשפעה סביב התאים ללא תלות בשאר הגורמים שנבחנו בהעדר רדיוס ההשפעה הזה. ממצא זה הוביל אותי לבחון בדקדוק את מאפייניה הבסיסיים של תנועת תאים בהשפעת כימוטקסיס בין-תאי. אף כאן, להפתעתי, לא מצאתי בספרות תיאור מספק של תופעה זו ונאלצתי לבחון אותה בכלים תיאורטיים שפיתחתי לצורך כך.

הדיון התיאורטי בוחן מספר תבניות של הפרשת חומרים כימוטקטים, וחוזה את התלות המרחבית-זמנית של ריכוז החומר המופרש מתאים מפרישים המצויים בסדר מרחבי אקראי. בהתאם, מחושבים מסלוליהם הצפויים של תאי בוחן בשדה הריכוז שמופה עבור כל אחת מתפניות ההפרשה. נמצא כי הערכת כיוון גרדיאנט הריכוזים אשר יחוש תא הנע בהשפעת

כוחות כימוטקטים דורשת חישוב של מיקומו ביחס לכל שאר התאים המפרישים בסביבה של עד מאות מיקרו-מטרים סביבו. בנוסף, נמצא כי תאים אשר מפרישים חומר כימוטקטי אינם צפויים להיות מושפעים מן ההפרשה של תאים שכנים אף אם הפרשתם של התאים השכנים חזקה בהרבה מזו שלהם. מסקנות אלו עומדות בסתירה גמורה להנחה הפשטנית ביחס לקיומו של רדיוס ההשפעה סביב כל אחד מן התאים. מבחינה מעשית, מסקנותיי מובילות להמלצה כי מערכות תאיות בהם קיימים כוחות כימוטקטים חזקים מוטב כי לא ישמשו לבחינת תהליכי התגבשות של ספירואידים.

מסקנתו הסופית של הפרק התיאורטי הינה כי המערכת הניסויית של משטח פתוח המצופה בחומר מונע הידבקות הינה מורכבת מדי ואינה מתאימה לחקר כוחות ההידבקות הבין תאים ויש להחליפה במערכת ניסויית שונה.

הפרק השלישי, מציג את הכלים, החומרים והשיטות אשר שימשו אותי לצורך העבודה הניסויית. באופן מיוחד מוצג מערך ייחודי של מיקרו-באריות המשמש לייצור, גידול ומעקב אחר ספירואידים. תכונות המערך מעודדות התגבשות עצמית של ספירואידים אחידים בגודלם, אחד בכל מיקרו-בארית, כאשר כל תהליך ההתגבשות של כל קבוצת תאים נפרדת לכלל ספירואיד ניתן למעקב מלא. המערך ניתן להתאמה לכל אמצעי מקובל לגידול ובחינת תאים בתעשיית סריקת התרופות. השיטות הייחודיות למעקב אחר ספירואידים המוצגות בעבודה זו, מתבססות על יתרונותיה של מערכת ניסויית זו.

הפרק הרביעי עוסק בניטור וניתוח של תהליך ההתגבשות במערכי המיקרו-באריות באמצעות כלי עיבוד תמונה. מוצגים אלגוריתמים לזיהוי המיקרו-באריות בתמונה, לזיהוי התאים וגושי התאים במיקרו הבאריות, למעקב אחר קצב יצירת הגושים, למעקב אחר התמזגות התאים ולמעקב אחרי תהליכי ההתכדרות של הגושים. תוצאות האלגוריתמים למעקב אחר תהליך ההתגבשות על כל שלביו מתוארים באמצעות פרמטרים חד-ערכיים המאפשרים לגבש מסקנה ברורה על תוצאות ההשפעה של טיפולים שונים על תהליך ההתגבשות. מערכת מודל של טיפול ב-EGTA מדגימה את שימושיות הכלים שפותחו לחקר תהליך ההתגבשות של הספירואידים.

הפרק האחרון עוסק בפיתוח כלי אנליזה, המבוססים על עיבוד תמונה, לבחינת השפעת תרופות על הספירואידים אשר התפתחו במערך המיקרו-באריות. מוצע אלגוריתם לסגמנטציה של ספירואידים המאפשר מדידה מדויקת של נפח הספירואידים. מדידת היחס בין הנפח לפני ואחרי טיפול תרופתי עבור כל ספירואיד ובחינת הפיזור של יחסי נפח אלו באוכלוסיית הספירואידים מוצעים ככלי יעיל למעקב אחר מידת ההצלחה של הטיפול. התוצאות מודגמות על מערכות מודל שבהן נחשפו הספירואידים לתרופות סרטניות וחנקן חמצני.