



Potential application of stem cells in urogynecology

Aneta Adamiak, Tomasz Rechberger

II-nd Department of Gynecology Medical University of Lublin, Poland

Summary

Recent advances in stem cells therapy and tissue engineering techniques hold great promise for recovery of external urethral sphincter proper functioning and urinary incontinent patients treatment. Adult stem cells (ASCs) may be derived from striated muscles, fat tissue or as mesenchymal cells from bone marrow. These cells can differentiate in functionally normal smooth or striated muscle cells. ASCs injected to external urethral sphincter or bladder neck cause the increase in urethral closure pressure. Favourable findings of trials in animal models and in vitro encouraged to first trials in humans and hold a promising future for the treatment of urinary incontinence.

(Pol J Endocrinol 2005; 6(56): 994-997)

Key words: stem cells, urinary incontinence



A. Adamiak
II-nd Dept of Gynecology
Medical University of Lublin
ul. Jaczewskiego 8
20-950 Lublin
Poland

Potencjalne możliwości zastosowania komórek macierzystych w uroginekologii

Aneta Adamiak, Tomasz Rechberger

II Katedra i Klinika Ginekologii Akademii Medycznej w Lublinie, Polska

Streszczenie

Ogromny rozwój technik inżynierii tkankowej oraz odkrycie "dojrzałych" komórek macierzystych niesie nadzieję na odzyskanie sprawności funkcjonowania zwieracza zewnętrznego cewki moczowej i wyleczenie wysiłkowego nietrzymania moczu. "Dojrzałe" komórki macierzyste, zwane także tkankowymi udało się już uzyskać z mięśni poprzecznie prążkowanych, z tłuszczu oraz z komórek mezenchymalnych szpiku kostnego. Komórki macierzyste mają zdolność różnicowania się w prawidłowo funkcjonujące komórki mięśniowe gładkie i poprzecznie prążkowane, a podane do mięśnia zwieracza zewnętrznego cewki moczowej, czy szyi pęcherza przyczyniają się do wzrostu ciśnienia zamykającego cewki moczowej. Pomyślne próby na modelach zwierzęcych i in vitro zaowocowały także pierwszymi badaniami na ludziach z wysiłkowym nietrzymaniem moczu. Zachęcające wyniki przyczyniają się do dalszego rozwoju tych badań.

(Endokrynol Pol 2005; 6(56): 994-997)

Słowa kluczowe: komórki macierzyste, nietrzymanie moczu



A. Adamiak
II Katedra i Klinika Ginekologii
SPSK Nr 4
ul. Jaczewskiego 8
20-950 Lublin
adamiak@yahoo.com

Badania nad możliwością zastosowania komórek macierzystych w leczeniu pacjentów dotkniętych przeróżnymi schorzeniami przeżywają w ostatnich latach ogromny rozwój. Z jednej strony jest to podyktowane zmniejszającą się z roku na rok liczbą dawców organów, chociażby ze względu na proces starzenia się większości społeczeństw, z drugiej strony wykryciem w wielu tkankach dorosłych ludzi tzw. "dojrzałych" komórek macierzystych (ang. adult stem cells). Okazało się bowiem, że nie tylko dynamiczne tkanki takie jak skóra, szpik kostny, czy krew posiadają rezerwy regeneracyjne w postaci komórek macierzystych, ale nawet na pozór nie odnawiające się tkanki, takie jak tkanka nerwowa, czy mięsień sercowy pod wpływem stresu komórkowego, czy po ubytkach tkankowych wykazują wrodzony potencjał regeneracyjny [1]. Stwierdzono ponadto, że nie tylko ostre procesy takie jak uszkodzenie tkanek, czy zatrucie aktywują regenerację tkanek poprzez komórki macierzyste. Procesy starzenia się komórek, ich śmierci (apoptoza, czy nekroza) oraz odnawianie się ich odbywają się w sposób ciągły przez całe życie organizmu we wszystkich tkankach.

Odkrycie "dojrzałych" komórek macierzystych jest obietnicą na ominięcie politycznych i etycznych kontrowersji wokół terapii komórkami macierzystymi pochodzącymi z zarodków (5-cio dniowych blastocyst) niewykorzystanych w procedurach zapłodnienia pozaustrojowego. Jest to również nadzieja i możliwość prowadzenia badań w tej dziedzinie w Polsce, gdyż należymy do krajów, w których badania na komórkach macierzystych z ludzkich zarodków są prawnie zabronione. „Dojrzałe” komórki macierzyste, zwane też czasami dla lepszego zrozumienia komórkami macierzystymi somatycznymi, czy tkankowymi, a także intensywny rozwój technik inżynierii tkankowej niosą ogromną nadzieję zastosowania ich jako terapię pierwotną, czy uzupełniającą w urologii, np. w leczeniu wysiłkowego nietrzymania moczu.

Dane epidemiologiczne wykazują, że od 9 do 49% populacji kobiet w okresie około – i pomenopauzalnym cierpi z powodu nietrzymania moczu [2, 3]. Dane te przemawiają za tym, że jest to choroba społeczna. Obliczono, że koszt opieki, leczenia, rehabilitacji oraz absencji zawodowej chorych z nietrzymaniem moczu w Stanach Zjednoczonych w roku 2001 osiągnął poziom 16,3 miliarda dolarów [4]. W Wielkiej Brytanii rocznie wydaje się na ten cel około 424 mln funtów [5]. W Szwecji w 1990r wydatki te oceniono na 2% łącznych nakładów na ochronę zdrowia [6]. Z teoretycznych wyliczeń wynika, że gdyby wszyscy chorzy cierpiący na nietrzymanie moczu w USA zgłosili się po pomoc wówczas koszt leczenia i opieki wyniósłby tyle, ile wydaje się na leczenie chorych z niewydolnością krążenia [4]. Biorąc pod uwagę tendencję starzenia

się społeczeństw a także wzrost średniej długości życia w krajach rozwijających problem nietrzymania moczu stale narasta.

Pomimo olbrzymich osiągnięć ostatniego 10-lecia w leczeniu wysiłkowego nietrzymania moczu u kobiet, wprowadzenia minimalnie inwazyjnych technik operacyjnych (slingów załonowych, czy przez otwory zasłonię z zastosowaniem taśm polipropylenowych) nadal opisywanym zjawiskiem jest pojawianie się nawrotu schorzenia, w 3-10% erozji taśmy, jej infekcji oraz powstawania tzw. "sztywnej cewki moczowej". Dlatego też możliwość reperacji defektu dolnego odcinka dróg moczowych z zastosowaniem nowej, normalnie funkcjonującej tkanki gospodarza bez niebezpieczeństwa odnerwienia, czy dewaskularyzacji jawi się jako rozwiązanie niemalże idealne.

Badania Frauscher'a i wsp. [7] oraz Strassera i wsp. [8-10] wykazały, że wzrastająca wraz z wiekiem częstość występowania nietrzymania moczu (NM) jest bezpośrednio związana z apoptozą komórek mięśniowych poprzecznie prążkowanych zwieracza cewki moczowej.

Yiou i wsp. [11] wykazali, że komórki mięśniowe poprzecznie prążkowane zwieracza cewki moczowej u myszy regenerują poprzez wewnętrzne komórki satelitarne. Jest to interesujące odkrycie, gdyż wiadomo, że komórki satelitarne mogą posiadać mięśnie poprzecznie prążkowane szkieletowe tworzące się we wczesnych etapach embriogenezy z somitów [12]. Natomiast komórki mięśniowe zwieracza zewnętrznego cewki moczowej (ang. EUS – External Urethral Sphincter) powstają poprzez transdiferencjację z gładkich komórek mięśniowych cewki moczowej [13] i dlatego też normalnie nie powinny tworzyć myogennych komórek satelitarnych. Ostatecznie pochodzenie tych komórek w EUS nie zostało wyjaśnione, aczkolwiek ich istnienie in vivo jest bezsporne [11]. Ze względu na zmniejszającą się zdolność regeneracji EUS wraz z wiekiem, przy słabym odżywianiu, czy wraz z ograniczeniem ćwiczeń fizycznych, powstała idea przynajmniej częściowej kompensacji tego zjawiska poprzez implantację heterotopowych, autologicznych komórek satelitarnych. Możliwość wprowadzenia takiej terapii została sprawdzona na modelach zwierzęcych (na szczurach przez Chancellor'a i Cannona [14], na myszach przez Yokoyamę [15], na świniach przez Strasser'a [16]). Eksperymenty z zastosowaniem komórek satelitarnych transfekowanych znakowaną fluorescencyjnie beta-galaktozydazą pozwoliły uwidocznienie obecności tych komórek w EUS in vivo po 4 tyg od wstrzyknięcia, a także ich różnicowanie się w myotubule, czyli komórki postmitotyczne o większej zdolności przeżycia. Zgodnie jednak z bieżącym dogmatem "dojrzałe" komórki macierzyste mogą przekształcać się tylko w jeden typ dojrzałych komórek, np. komórki satelitarne mogą różnicować się tylko

w myoblasty i myotubule. Ta ograniczona plastyczność z jednej strony może zmniejszać fascynację tymi komórkami, ale z drugiej strony zwiększa bezpieczeństwo ich klinicznego zastosowania. Jak dotąd nie ma danych opisujących niekontrolowane różnicowanie się *in vivo* implantowanych autologicznych myoblastów, tworzenie ziarniniaków, powstawanie przewlekłego zapalenia, czy guzów.

Pierwsze doniesienia na temat nowej terapii niewydolności mięśnia zwieracza zewnętrznego cewki moczowej opublikowali Chancellor i wsp. [17] oraz Yokoyama i wsp. [15] w 2001 roku a następnie Cannon i wsp w 2003 roku [14] - obydwaj badacze współpracujący z Chancellorem. Autorzy ci wykazali na gryzoniach, że możliwe jest przezcewkowe wstrzyknięcie allogenicznych myoblastów uzyskanych z komórek macierzystych pochodzących z mięśni szkieletowych poprzecznie prążkowanych (MDSC – ang. Muscle Derived Stem Cells) do EUS oraz, że komórki te przyczyniają się do regeneracji zwieracza. Chancellor i Cannon implantowali allogeniczne myoblasty (MDSC) a nie autologiczne, podkreślając ich immunologiczną akceptację przez organizm gospodarza oraz wykazując ich przeżycie [17, 14]. Wyszuli oni nawet przypuszczenie, że zwieracz zewnętrzny cewki moczowej jest "immunologicznie uprzywilejowanym miejscem". Takie obserwacje dają nadzieję, że allogeniczne MDSCs mogłyby być bezpiecznie wykorzystywane w terapii wysiłkowego nieotrzymania moczu u ludzi. Pierwsze eksperymenty Strassera i wsp. [16] na świniach wykazywały, że komórki te po 10 tygodniach były nadal żywe w EUS, tworzyły włókna mięśniowe lub integrowały się z myofibrillami gospodarza a ciśnienie zamykające cewki moczowej zwiększało się. Badania Berjukow'a i wsp sprawdziły także, czy funkcjonalnie MDSCs wykazują podobieństwo do komórek EUS oraz czy występują różnice między gatunkowe, tzn. między funkcjonowaniem ludzkich i świńskich takich komórek [18]. W monoklonalnych hodowlach komórkowych MDSCs i komórek mięśniowych EUS odpowiednio świńskich i ludzkich oznaczono zdolność do łączenia się komórek (indeksy fuzji) a także sprawdzono ekspresję kanałów sodowych i wapniowych. Porównanie prądów płynących przez kanały sodowe i wapniowe wykazało istnienie dużych podobieństw wewnątrzgatunkowych. Porównanie ekspresji tych kanałów oraz indeksów fuzji między hodowlami komórek z EUS oraz z mięśni szkieletowych (MDSCs) potwierdziło ich kompatybilność.

Pierwsze kliniczne próby zastosowania MDSCs u ludzi zostały przeprowadzone przez Strassera i wsp [19] w 2002 roku. Pięć kobiet cierpiących z powodu wysiłkowego nieotrzymania moczu zostało włączonych do badania. Pacjentki były w wieku od 36-78 lat. Od każdej pobrano biopsje mięśni szkieletowych z lewego ramienia w celu uzyskania hodowli autologicznych myoblastów

i fibroblastów. Myoblasty podawano bezpośrednio pod kontrolą ultrasonografu przezcewkowo do mięśnia zwieracza cewki moczowej, a fibroblasty mieszano z kolagenem (2,5 ml) i wstrzykiwano w warstwę podśluzówkową cewki moczowej. Badacze podają, że w przeciągu tygodnia od operacji wszystkie pacjentki odzyskały zdolność prawidłowego utrzymywania moczu. Efekt tego zabiegu został oceniony po roku. Wszystkie kobiety były wyleczone. Na podstawie badania ultrasonograficznego stwierdzono także zwiększenie grubości oraz kurczliwości zwieracza zewnętrznego cewki moczowej w porównaniu do stanu wyjściowego.

Na 35-tym spotkaniu International Continence Society (ICS) w Montrealu w 2005 roku opublikowano dane dotyczące zastosowania komórek macierzystych mezenchymalnych pozyskiwanych ze szpiku kostnego szczurów w leczeniu nietrzymania moczu. Okazało się, że komórki te mają zdolność różnicowania się *in vitro* zarówno w komórki mięśniowe gładkie jak i poprzecznie prążkowane [20], a po wstrzyknięciu do szyi pęcherza moczowego szczurów przetrwały tam przynajmniej 45 dni. Na konferencji pojawiły się także doniesienia o możliwości odróżnicowania dojrzałych ludzkich komórek tłuszczowych w preadipocyty a następnie do ich różnicowania się w komórki mięśniowe gładkie zarówno *in vitro* jak i *in vivo* (w ścianie uszkodzonego pęcherza u myszy) [21]. Pochodzące z tkanki tłuszczowej komórki macierzyste (ang. ADSCs - adiposed derived stem cells) mogą być również „wysiewane” na przestrzennych rusztowaniach w celu uzyskania tkanki zbudowanej z komórek mięśniowych gładkich np. do przeszczepu jako ściana pęcherza moczowego, czy cewki moczowej [22]. Z nieopublikowanych danych wiadomo również, że istnieją ośrodki w Polsce, które rozpoczęły eksperymenty dotyczące „wysiewania” komórek macierzystych na materiałach ulegających biodegradacji, stosowanych w chirurgicznym leczeniu wysiłkowego nietrzymania moczu u kobiet.

Piśmiennictwo

1. Hanashima C, Li SC, Shen L, Lai E, Fishell G. Foxg1 suppresses early cortical cell fate. *Science*, 2004, 303, 56-59
2. Burgio KL, Matthews KA, Engel BT. Prevalence, incidence and correlates of urinary incontinence in healthy, middle aged women. *J Urol*, 1991, 146, 1255-1259
3. Diokno AC, Brock BM, Brown MD. Prevalence of urinary incontinence and other urologic symptoms in the non-institutionalized elderly. *J Urol* 1986, 136, 1022-1025
4. Wilson L, Brown JS, Shin GP, Luc KO, Subak LL. Annual direct cost of urinary incontinence. *Obstet Gynecol*. 2001, 98, 398-406
5. Continence Foundation. Making the case for investment in an integral continence service: a source book for continence service. London, CF, 2000
6. Milsom I. The prevalence of urinary incontinence. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2000, 79, 1056-1059
7. Frauscher F, Helwag G, Strasser H, Enna B, Klauser A,

- Knapp R, Colleselli K, Bartsch G, zur Nedden D. Intaurethral ultrasound: diagnostic evaluation of the striated urethral sphincter in incontinent females. *Eur Radiol*, 1998, 8, 50-53
8. Strasser H, Tiefenthaler M, Steinlechner M, Bartsch G, Konwalinka G. Urinary incontinence in the elderly and age-dependent apoptosis of rhabdosphincter cells. *Lancet*, 1999, 354, 918-919.
 9. Strasser H, Ninkovic M, Hess M, Bartsch G, Stenzl A. Anatomic and functional studies of the male and female urethral sphincter. *World J Urol*, 2000, 18, 324-329
 10. Strasser H, Tiefenthaler M, Steinlechner M, Eder I, Bartsch G, Konwalinka G. Age dependent apoptosis and loss of rhabdosphincter cells. *J Urol*, 2000, 164, 1781-1787
 11. Yiu R, Lefaucheur JP, Atala A. The regeneration process of the striated urethral sphincter involves activation of intrinsic satellite cells. *Anat Embryol*, 2003, 206, 429-435
 12. Perry RL, Rudnicki MA. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front Biosci*, 2000, 5, D750-D767
 13. Borirakchanyavat S, Baskin LS, Kogan BA, Cunha GR. Smooth and striated muscle development in the intrinsic urethral sphincter. *J Urol*, 1997, 158, 1119-1122
 14. Chancellor MB, Yoshimura N, Pruchnic R, Huard J. gene therapy strategies for urological dysfunction. *Trends Mol Med*, 2001, 7, 301-306
 15. Yokoyama T, Pruchnic R, Lee JY, Chuang YC, Jumon H, Yoshimura N, de Groat WC, Huard J, Chancellor MB. Autologous primary muscle-derived cells transfer into the lower urinary tract. *Tissue Engin*, 2001, 7, 395-404
 16. Strasser H, Marksteiner R, Margreiter E, Berjukow S, Klima G, Fritsch H, Pinggera GM, Readler C, Bartsch G, Hering S. Transurethral ultrasound guided injection of clonally cultured autologous myoblasts and fibroblasts: experimental results. *J Urol*, 2003, 169,39
 17. Cannon TW, Lee JY, Somogyi G, Pruchnic R, Smith CP, Huard J, Chancellor MB. Improved sphincter contractility after allogenic muscle-derived progenitor cell injection into the denervated rat urethra. *Urology*, 2003, 62, 958-963
 18. Berjukow S, Margreiter E, Marksteiner R, Strasser H, Bartsch G, Hering S. Membrane properties of single muscle cells of the rhabdosphincter of the male urethra. *Prostate*, 2004, 58, 238-247
 19. Strasser H, Marksteiner R, Margreiter E, Frauscher F, Bartsch G, Hering S. Stem cell therapy in treatment of urinary incontinence: first clinical results. *J Urol*, 2004, 171(suppl), 130
 20. Feil G, Zimmermann R, Maurer S, Boehmler AM, Krug J, Wanke I, Bock C, Moehle R, Seitz G, Stenzl A, Sievert K. Mesenchymal stem cells for functional treatment of urinary incontinence in a rat model. *Neurol Urodyn*, 2005, 24, 410-411
 21. Sakuma T, Matsumoto T, Sato K, Igarashi T, Sugimoto S, Kano K, Fukuda N, Yoshida T, Takimoto Y, Mugishima H. Dedifferentiated fat (DFAT) cells can differentiate into bladder smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Neurol Urodyn*, 2005, 24, 411-412
 22. Rodriguez L, Jack G, Zhang R, Turner A, Almeida F, Alfonso Z, Zuk P, Wu B. Adipose derived stem cells for the tissue engineering of the lower urinary tract. Implications for the treatment of stress urinary incontinence and bladder reconstruction. *Neurol Urodyn*, 2005, 24, 414-415