

Peripheral pharmacological targets to modify bladder contractility

Citation for published version (APA):

Hohnen, R. (2016). *Peripheral pharmacological targets to modify bladder contractility*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20160225rh>

Document status and date:

Published: 01/01/2016

DOI:

[10.26481/dis.20160225rh](https://doi.org/10.26481/dis.20160225rh)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

In the studies presented in this thesis, peripheral pharmacological targets that are able to modify bladder function, are discussed. More specifically, interactions of the prostanoid system, the cholinergic system and the NO/cGMP system have been the focus of interest.

In a general introduction (**chapter 1**), two functional bladder dysfunctions overactive bladder syndrome and detrusor underactivity are described especially with respect to bladder histology, central control and peripheral control mechanisms are described.

In **chapter 2**, the distribution of phosphodiesterase type 2 (PDE2) in the guinea pig urinary bladder is shown. Treatment with anticholinergics, the first line treatment in the overactive bladder syndrome (OAB), is characterized by a poor effect size and high prevalence of side effects, resulting in poor treatment compliance. Therefore, new and alternative therapy modalities for detrusor overactivity (DO) are needed. We focussed on the PDE2 selective inhibitors that might offer an interesting approach and investigated its presence in the guinea pig bladder wall morphologically. PDE2 inhibited cGMP breakdown mostly in urothelial and suburothelial layers as well as on nerve fibres. In the outer muscle layers of the lateral wall, cGMP is mainly expressed by intermuscle interstitial cells and nerve fibres, indicating the presence of PDE2 enzyme activity in these structures. This study is the first to show the distribution of PDE2 in the bladder. Due to its presence in both, neuronal and non-neuronal structures, which are important in regulation of bladder function, it can be hypothesized that PDE2 plays a role in signal transduction throughout the whole bladder wall. To gain more insight into potential treatment modalities using PDE2 inhibitors, physiological experiments are required to study the possible role of PDE2 inhibition in modulating bladder activity.

Another possible target for treatment is the prostanoid system. The expression of two prostaglandin E2 (PGE₂) specific receptors, EP1 and EP2 in the intramural ganglia of guinea pig bladders is presented in **chapter 3**. Intramural ganglia have been shown in the bladder wall of several species including human, pig, and guinea-pig. A network of intramural ganglia in the bladder of these species might be part of a motor-sensory system and receive afferent input. Prostaglandins (PG) have been suggested to play a role in this afferent signalling mechanism. The distribution of EP1 and EP2 in and around intramural ganglia of the guinea pig was investigated morphologically. Immune reactivity for EP1 and EP2 was found in intramural ganglion cells. These cells were observed in between muscle bundles and on, or close to the serosal surface of the bladder. In addition, COX I was present in interstitial cells close to ganglion cells, indicating the possibility of a local synthesis of prostaglandins near the ganglia. The co-staining of EP1 or EP2 with vimentin showed that processes of interstitial cells run through the ganglia, often encircling or ensheathing cells.

Summary

Thus, a close relationship is shown between the intramural ganglia and the network of interstitial cells in the muscular layers of the bladder. As EP1 and EP2 receptors are expressed on the ganglia, it can be suggested that intramural ganglia are involved in (pre)processing afferent information. Therefore, intramural ganglia might function as a connection between neuronal structures containing information from the central nervous system, and non-neuronal regulatory structures within the bladder wall.

The interaction of the prostanoid and the cholinergic system and its potential role in modifying bladder contractions are discussed in **chapter 4** and **chapter 5**. The urothelium releases several substances in response to mechanical and physical stimuli i.e. PGE₂, NO, acetylcholine (ACh) and adenosine triphosphate (ATP). PGE₂ and ACh have been shown to interact in a positive feedback manner on a molecular level. In these functional studies, the role of PGE₂ and two of its receptor, EP1 and EP3, on muscarinic induced contractions was investigated. In addition, the morphological distribution of the EP3 receptor was studied. Adding PGE₂ before muscarinic stimulations induced an amplifying effect on muscarinically induced contractions. After inhibition of the PGE₂ producing enzyme COX-1, a decreased amplitude during the initial phase of the muscarinic response was recorded. Inhibition of EP1 decreased the frequency during the second phase of the arecaidine response. To investigate the role of EP3 in this feedback mechanism, the distribution and function of EP3 in the guinea pig bladder were studied. EP3 immune reactivity had been found to be present in neuronal structures in the urothelial/suburothelial and muscle layer as well as by suburothelial interstitial cells and urothelial cells. Activation of EP3 receptors in the urinary bladder decreased the frequency of muscarinic induced contractions. In summary, both studies provide evidence that the cholinergic and prostanoid systems in the urinary bladder act in a positive feedback loop and that the EP1 and EP3 receptor play a subtle role in this process. Due to the amplifying effect of the cholinergic and the prostanoid system, targets belonging to the prostanoid system are promising when searching for potential new modalities for the treatment bladder dysfunctions. In order to identify new treatment targets, the location of the different steps in the cascade and the targets for modulation of this process need to be determined in the near future.

New potential treatment modalities for detrusor underactivity are reviewed in **chapter 6**. Detrusor underactivity, compared to detrusor overactivity, gained less attention in functional urological research until four years ago. However, there is only limited knowledge on the pathophysiological and molecular background of detrusor underactivity. In this chapter, treatment targets of all levels involved in physiological bladder function are discussed: targets involved in urethral- and bladder sensation, targets involved in afferent signalling, targets

involved in the central processing of afferent information, and targets involved in efferent signalling and local regulatory processes of bladder contractility. At all different levels, new potential therapeutic targets have been identified. Usually, targets which modulate bladder contractility in a direct way would be under focus when searching for new treatment modalities. In this chapter, it is shown that these targets can be found at all different levels: from sensation to contractility.

A general discussion of all findings presented in this thesis can be found in **chapter 7**. If each signalling system of the urinary bladder is examined separately, important information will get lost. It is of utmost importance to investigate interactions and effects on other systems. In this thesis, it has been shown directly that the prostanoid system and the cholinergic system interact on each other. Furthermore, the NO/cGMP system can interact and influence muscarinic induced contractions also. Possible interactions of the different systems of peripheral pharmacological targets presented in this thesis are discussed in this last chapter of the thesis with respect to their involvement in the modulation of bladder function.

In dit proefschrift werden perifere farmacologische aangrijpingspunten onderzocht, die gebruikt kunnen worden om de activiteit van de urineblaas te beïnvloeden. De activiteit van de urineblaas wordt gereguleerd door centrale, de hersenen en ruggenmerg betreffende, en perifere, het eind orgaan de blaas betreffende, mechanismen. Meerdere regelsystemen zijn betrokken bij deze perifere regulatie. In dit proefschrift werd de betrokkenheid onderzocht van het prostaanoïde, het cholinerge en het NO/cGMP regelsysteem naast de interacties tussen deze systemen.

In de algemene inleiding beschreven in hoofdstuk 1, werden de fenomenen overactieve blaas en detrusor onderactiviteit besproken, dit zijn beide functionele blaasdisfuncties. Hierbij werd in het bijzonder ingegaan op de blaas histologie en de controle door de centrale en perifere regelsystemen.

In hoofdstuk 2 werd de aanwezigheid van fosfodiësterase type 2 (PDE2) in de urineblaas van de cavia beschreven. Fosfodiësterases zouden een mogelijk nieuw aangrijpingspunt voor de behandeling van de overactieve blaas kunnen bieden. Momenteel behoort het gebruik van antimuscarinica tot de eerstelijns behandeling van het overactieve blaas syndroom. Deze behandeling gaat echter dikwijls gepaard met hinderlijke bijwerkingen en heeft vaak slechts een matig afzwakkend effect op de klachten. Hetgeen resulteerde in een lage therapietrouw. Daarom zijn andere, meer effectievere therapiemogelijkheden voor patiënten met overactieve blaas van belang. In dit kader vormden PDE2 specifieke inhibitoren een mogelijk interessant aangrijpingspunt voor nieuwe therapieën. Om te onderzoeken of PDE2 inhibitoren een rol kunnen spelen in de behandeling van overactieve blaas, werd de aanwezigheid van het enzym in een morfologische studie van de blaaswand bestudeerd. De aanwezigheid van PDE2 werd aangetoond in zowel zenuwen als andere structuren die van belang zijn bij het reguleren van de blaasfunctie. Deze specifieke aanwezigheid gaf aanleiding tot de hypothese dat PDE2 een rol speelt in de signaalgeleiding van de blaaswand. Om verder inzicht te verkrijgen in eventuele behandelingsopties gebaseerd op PDE2 inhibitoren, zijn in de toekomst fysiologische experimenten rondom de modulatie van blaasactiviteit met PDE2 aangewezen.

Een ander potentieel aangrijpingspunt voor de behandeling van blaasdisfuncties is het prostaanoïde systeem. De aanwezigheid van twee prostaglandine E2 (PGE2) specifieke receptoren, EP1 en EP2 in ganglion cellen in de spierwand werd beschreven in hoofdstuk 3. De aanwezigheid van ganglion cellen in de spierwand (intramurale ganglia) is aangetoond in verschillende diersoorten, varkens en cavia's, en in de mens. Een netwerk van intramurale ganglia in de blaaswand van deze dieren zou deel uit kunnen maken van de koppeling tussen motorische- en sensorische activiteit en in deze rol dan ook de nodige informatie ontvangen

Samenvatting

vanuit de hersenen (zogenaamde afferente informatie). Prostaglandines spelen mogelijkwerwijs een rol in deze afferente signaleringsmechanismen. De aanwezigheid van de twee specifieke receptoren, EP1 en EP2, in en rond de intramurale ganglia van de cavia werd in deze studie morfologisch aangetoond. Immunoreactiviteit voor EP1 en EP2 werd gevonden in de intramurale ganglia. De intramurale ganglion cellen werden gedetecteerd tussen de spierbundels en dichtbij de serosa. Het enzym, dat voor de productie van PGE2 verantwoordelijk is, cyclooxygenase type 1 (COX-1), werd aangetoond in de interstitiële cellen die rondom de ganglion cellen gelokaliseerd waren. Dit duidde op de mogelijkheid van lokale productie van prostaglandines in de directe omgeving van de ganglia. De kleuring van de receptoren EP1 en EP2 samen met een marker voor interstitiële cellen, had laten zien dat uitlopers van deze interstitiële cellen door de ganglia heen passeerden. Vaak werd een groep van ganglia ook helemaal omgeven gezien door deze uitlopers. Hiermee werd een sterk verband aangetoond tussen de intramurale ganglia en het netwerk van interstitiële cellen in de spierlaag van de blaas. Aangezien EP1 en EP2 receptoren aanwezig waren in de ganglia, kon de hypothese gevormd worden dat intramurale ganglia een rol speelden in de (voor)verwerking van afferente informatie. Bovenstaande bevinding wijst erop dat intramurale ganglia de connectie vormen tussen de neuronale structuren, die informatie vanuit het centrale zenuwstelsel ontvangen, en de niet-neuronale, regulerende structuren binnen de blaaswand.

De interactie van het prostanoïde en cholinerge systeem werd besproken in hoofdstuk 4 en 5. In het bijzonder werd ingegaan op de potentiële rol van het prostanoïde systeem bij de modificatie van blaascontracties. Als reactie op mechanische of fysische stimuli geeft het urotheel een groot repertoire aan stoffen af. Deze stoffen zijn onder andere, PGE2, NO, acetylcholine (ACh) en adenosine trifosfaat (ATP). Een eerdere studie liet op moleculair niveau zien, dat PGE2 en ACh elkaar via positieve feedback versterkten. In de studies, die in dit proefschrift beschreven werden, werd het effect van PGE2 en twee van zijn specifieke receptoren, EP1 en EP3, op muscarine geïnduceerde contracties onderzocht. Daarnaast werd morfologisch het voorkomen van de EP3 receptor in de blaas onderzocht. Het werd aangetoond dat PGE2 de muscarine geïnduceerde respons versterkt. Na remming van het COX-1 enzym, dat voor de aanmaak van PGE2 verantwoordelijk was, werd een zwakkere muscarine geïnduceerd respons gemeten. Het kon dus worden vastgesteld, dat PGE2 en ACh elkaar versterkten en dus volgens een soort positief feedback mechanisme elkaar beïnvloedden. Hierna werd de rol van de twee PGE2 specifieke receptoren, EP1 en EP3, in dit versterkingsmechanisme onderzocht. Inhibitie van de EP1 receptor resulteerde in een lagere frequentie van de fasische samentrekkingen tijdens een latere fase van de muscarine geïnduceerde respons op het blaasspierweefsel. Om de rol van EP3 in dit feedback mechanisme te onderzoeken, werd zowel

de aanwezigheid als ook de functie van EP3 in de caviablaas bestudeerd. EP3 immuunreactiviteit werd in neuronale structuren gelegen in het urotheel, het suburotheel en de spierlaag gevonden. Daarnaast was EP3 ook in sub-urotheliale interstitiële cellen en urotheelcellen aanwezig. Activatie van de EP3 receptoren in de blaas verlaagde de frequentie van muscarine geïnduceerde contracties. Samenvattend kan worden gezegd, dat beide studies een positieve feedback tussen het prostanoiden en het muscarine systeem in de urineblaas hebben laten zien. Verder werd aangetoond, dat zowel de EP1 als de EP3 receptor betrokken zijn in dit verband. Terwijl activatie van EP3 in een zwakkere muscarine geïnduceerde respons resulteerde, moest EP1 geïnhibeerd worden om hetzelfde effect te laten zien. Door het versterkende effect van het prostanoiden op het cholinerge systeem, kunnen receptoren of enzymen van het prostanoiden systeem als interessante, potentiële nieuwe aangrijpingspunten voor de behandeling van blaasdisfunctie worden gezien. Om specifieke nieuwe aangrijpingspunten te identificeren, moet de rol van de verschillende stappen in de signaalcascade en de locatie van de potentiële spelers die betrokken zijn bij de regulatie van deze processen, in de toekomst bepaald worden.

Potentiële nieuwe behandelingsmogelijkheden voor detrusor onderactiviteit werden besproken in hoofdstuk 6. Detrusor onderactiviteit – in vergelijking met detrusor overactiviteit – kreeg lange tijd minder aandacht binnen het functioneel georiënteerde urologisch onderzoek, maar dit is een aantal jaren geleden veranderd. Er was slechts beperkte kennis beschikbaar over de pathofysiologische en moleculaire achtergrond van detrusor onderactiviteit. In dit hoofdstuk werden nieuwe aangrijpingspunten voor de behandeling op alle niveaus besproken die een rol speelden in fysiologische controle van de urineblaas: aangrijpingspunten die een rol speelden in urethrale- en blaassensaties, aangrijpingspunten die een rol speelden in afferente signalering, aangrijpingspunten die betrokken waren in de centrale verwerking van de afferente informatie, aangrijpingspunten welke een rol speelden in efferente signalering en aangrijpingspunten die geassocieerd waren met lokale regulerende processen van blaascontractiliteit. In dit hoofdstuk lieten wij zien dat aangrijpingspunten voor de behandeling van detrusor onderactiviteit op alle verschillende niveaus van regulatie aanwezig zijn: van sensatie tot contractiliteit.

In de algemene discussie (hoofdstuk 7) werden alle bevindingen besproken die beschreven staan in dit proefschrift. Als ieder signaalsysteem apart onderzocht werd, zou belangrijke informatie verloren gaan. Het was daarom uitermate belangrijk om de interacties tussen verschillende systemen die een rol spelen in de controle van de urineblaas te onderzoeken. In dit proefschrift werden onderzoeken beschreven, waarin direct een interactie tussen het prostanoiden en het cholinerge systeem aangetoond werd. Daarnaast is het mogelijk dat het

Samenvatting

NO/cGMP systeem muscarine geïnduceerde contractiest. Mogelijke interacties tussen de verschillende systemen en hun perifere farmacologische aangrijpingspunten, die in dit proefschrift behandeld zijn, zijn besproken in dit laatste hoofdstuk met betrekking tot hun rol in de modulatie van blaasfunctie.

In dit proefschrift werden een aantal onderzoeken beschreven, die aantonen dat nieuwe aangrijpingspunten voor de behandeling van functionele blaasdysfuncties mogelijkere gevonden kunnen worden in de interactie van verschillende signaalsystemen. Vooral het prostanoïde systeem, maar ook het NO/cGMP systeem blijken hiervoor interessante kandidaten. Verder onderzoek is noodzakelijk om specifieke aangrijpingspunten te identificeren en nieuwe, hierop gebaseerde therapieën, te ontwikkelen.