

Prostaglandins and Phosphodiesterases in the urinary bladder wall

Citation for published version (APA):

Rahnama'i, M. S. (2013). *Prostaglandins and Phosphodiesterases in the urinary bladder wall*. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20131122mr>

Document status and date:

Published: 01/01/2013

DOI:

[10.26481/dis.20131122mr](https://doi.org/10.26481/dis.20131122mr)

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.

Summary

This thesis is composed of two parts. The first part focuses on the distribution and the role of prostaglandins (PG) in the guinea pig urinary bladder and the second part on the distribution of the phosphodiesterase (PDE) enzymes, in particular the type 5 enzyme (PDE5).

A general introduction presenting the overactive bladder syndrome (OAB) and its impact on the quality of life and economical burden in patients affected, is given in chapter 1. Moreover, the anatomy, physiology and histology of the lower urinary tract are discussed, followed by a brief overview on the possible role of PG and PDE5 in the urinary bladder.

The current literature on the role and distribution of PGE₂ and its receptors in the urinary bladder is discussed in chapter 2. Five primary prostanoids are synthesized by the cyclo oxygenase enzymes, COX-1 and COX-2: the prostaglandins PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂, PGD₂ and thromboxane A₂. In both animal models and in human studies, high levels of these signaling molecules have been implicated, in decreased functional bladder capacity and micturition volume, as well as in increased voiding contraction amplitude. As a consequence, inhibition of prostanoid production or the use of prostanoid receptor antagonists, might be a rational way to treat patients with detrusor overactivity. Similarly, prostanoid receptor agonists, or agents that stimulate their production, might have a function in treating bladder underactivity.

The distribution of the PGE₂ receptors EP1 and EP2 in the urothelium and suburothelium of the guinea pig urinary bladder is presented in chapter 3. In this morphological study of the guinea pig bladder, immunohistochemical stainings with antibodies against EP1, EP2, vimentin and COX1 were applied. EP1 staining was seen in urothelial cells and in the suburothelium. Urothelial EP1 staining was punctuate, weak and detected in all urothelial cell layers, including suburothelial cells. In contrast, strong EP2 staining was seen in the urothelium and in suburothelial cells. COX1 was absent in interstitial cells and umbrella cells and had the highest concentration in the basal cell layer. Vimentin was used to identify interstitial cells. These interstitial cells express both EP1 and EP2, indicating that they can respond to PGE₂. The COX1 enzyme was present in basal urothelial cells, making them a possible site of PGE₂ synthesis. PGE₂ produced by urothelium may target EP1 and EP2 in the urothelium and suburothelium. Therefore, PGE₂ is hypothesized to have a role in signal regulation in the bladder wall.

The distribution of EP₁ in the detrusor muscle layer of the guinea pig is portrayed in chapter 4. Immunohistochemical stainings with antibodies against EP₁, vimentin and COX₁ were used to visualize the EP₁ distribution. EP₁ was identified on smooth muscle cells, vimentin positive surface muscle cells and intramuscular interstitial cells. Muscle staining was less intense than on interstitial cells and had a punctuate appearance. EP₁ expression on interstitial cells was highly localized. Discrete regions of intense staining were noted on interstitial cell long stretched cell bodies, also known as processes. COX₁ was also expressed in muscle interstitial cells. COX₁ positive interstitial cells were more prevalent in the muscle bundles of the inner muscle than in the outer muscle layers. COX₁ staining was noted on discrete regions of the cell or cell processes. Double staining with EP₁ and COX₁ suggested that cell regions expressing the former are different from those expressing the latter. The discovered arrangement of EP₁ and COX₁ may have the potential to facilitate the propagation of signals in the interstitial cell network. Such a signalling system may have a role in coordinating events, as in bladder pathology, facilitating the global coordinated changes associated with bladder wall remodelling.

In chapter 5, the distribution of the EP₂ receptor in the detrusor muscle layer is described. EP₂ distribution was studied through immunohistochemical stainings with antibodies against EP₂, vimentin and COX₁. EP₂ receptor immunoreactivity was located on the smooth muscle cells as well as on vimentin positive surface muscle cells and intramuscular interstitial cells. EP₂ expression on interstitial cells was highly localized. Discrete regions of intense staining were observed on the interstitial cell processes. COX₁ expression was shown in the muscle interstitial cells and was found to be located on discrete regions of the cell and cell processes. Double staining with EP₂ and COX₁ suggests that the regions of a cell expressing EP₂ are different from those expressing COX₁. The presence of COX₁, and EP₂ on the network of interstitial cells suggests a role of this network in the propagation of signals. Due to a cAMP coupling of the EP₂ receptor in many other tissues and a lower dissociation constant of EP₂, it is suggested that a rise in PG levels may gradually push the balance from a relaxant EP₂ effect towards a contractile effect. Hence, PG could have a modulatory role on the non-voiding bladder contractions by changing the threshold level for excitability of the interstitial cell network.

The effect of PG depletion by means of COX-inhibition on cholinergic enhanced spontaneous contractions is displayed in chapter 6. In this study, the urethra and bladder of male guinea pigs were placed in an organ bath with Krebs' solution and a transurethral catheter was introduced to measure intravesical pressure. The muscarinic agonist arecaidine, the non-selective COX inhibitor indomethacin, and PGE₂ were subsequently added to the organ bath. The average frequency (F_{ini}) and amplitude (P_{ini}) of spontaneous contractions in the first 2 minutes after arecaidine as well as the average frequency (F_{steady}) and amplitude (P_{steady}) during the 5 minutes before the next wash out, were studied. Application of 1 μ M PGE₂ increased the amplitude of spontaneous contractions without

affecting frequency. Indomethacin (10 μ M) reduced amplitude but not frequency. The addition of indomethacin did not alter F_{ini} after the first application ($p=0.7665$). However, after the second wash, F_{ini} was decreased ($p=0.0005$). F_{steady} , P_{steady} and P_{ini} were not significantly different in any of the conditions. These effects of indomethacin were reversible by PGE_2 addition. Blocking PG synthesis decreased the cholinergically stimulated autonomous contractions in the isolated bladder. These data suggest that PG could modify normal cholinergically evoked responses.

A review of the current knowledge on the role of PDE in the bladder pathophysiology is given in chapter 7. PDE enzymes hydrolyse the cyclic nucleotide monophosphates cAMP and cGMP, which have been suggested to play a role in bladder physiology. The inhibition of PDE, resulting in an increase in cAMP- and cGMP levels, has been shown to relax isolated urinary bladder smooth musculature of different species. Different PDE subtypes are known to be present in animal and human bladders, including PDE5 in the rat, PDE1 to PDE5 in the rabbit and PDE1 to PDE5 and PDE7 to PDE9 in the human urinary bladder. The majority of preclinical functional studies have been conducted in the rat bladder, focussing on selective inhibitors of the PDE4 and PDE5 and inducing a relaxation effect. To date, only the significance of PDE1 and PDE5 has been studied clinically for the management of storage and voiding disorders. PDE1 inhibition has been suggested to improve micturition frequency. However, there are, to date, only limited clinical studies to prove this theory. PDE5 inhibition has been studied widely and shown to improve IPSS in men with lower urinary tract symptoms with or without benign prostate hyperplasia. Furthermore, PDE5 inhibitors in combination with an alpha-adrenoceptor antagonist have been shown to be superior to monotherapy with either of the agents to improve IPSS. The role of PDE5 inhibitors in the treatment of women with detrusor overactivity remains unclear and is an interesting field for future research. The clinical application of other PDE inhibitors, including those of the PDE4 and the recently developed PDE5 inhibitors, in storage and voiding disorders, certainly needs more scientific attention and seems likely to become a challenging new treatment alternative in the future.

The distribution and the site of action of PDE5 in the guinea bladder are discussed in chapter 8. The data of this chapter were obtained through an indirect visualization technique. This was accomplished by visualizing the result of PDE5 inhibition (i.e. cGMP) in the guinea pig bladder tissue that was stimulated with nitric oxide (NO) and pre-incubated with the PDE5 inhibitor Vardenafil. After PDE5 inhibition, cGMP is shown to be present in the urothelium, suburothelial interstitial cells and the endothelium of blood vessels. cGMP is not expressed in nerves positive for CGRP, NF, and SV2 and only in very few efferent nerves positive for PGP9.5 staining. The possible site of action of PDE5 inhibition in the bladder is on urothelium, suburothelial interstitial cells and blood vessels, rather than on bladder nerve fibers.

A general discussion of all the studies presented in the thesis is written in chapter 9. Functional studies would be a next step to understand the functional meaning of the data described in this thesis. The data presented are a basis for further research on selective modulation of the EP₁ and EP₂ receptor which could be a therapeutic target in functional bladder disorders such as OAB. PDE inhibitors are closer to clinical use, as these drugs have been studied and registered for other indications such as erectile dysfunction in men. Therefore, *in vivo* studies in human subjects can be conducted on short term. However, from a scientific point of view, it is very important to unravel the exact site of action and role of PDE inhibition with *in vitro* and *in vivo* studies as is the case with PG. In this way, a combination of drugs targeting different mechanisms involved in bladder physiology such as PG, cGMP, cAMP, and muscarinic receptors, could reduce side effects and improve efficacy.

Samenvatting

(Summary in Dutch)

In dit proefschrift wordt de verspreiding en de rol van prostaglandinereceptoren en de verdeling van de fosfodiësterase (PDE)-enzymen, in het bijzonder het type 5 (PDE5) in de urineblaas van de cavia besproken.

Het eerste hoofdstuk is een algemene inleiding over het overactieve blaas syndroom (OAB) en de invloed ervan op de kwaliteit van leven met de daarbij behorende economische gevolgen. In het kort wordt de anatomie, fysiologie en histologie van de lage urinewegen besproken, gevolgd door een kort overzicht van de mogelijke rol van prostaglandine (PG) en PDE5 in de urineblaas.

De huidige kennis over de rol en de verspreiding van PGE₂ en de receptoren in de urineblaas wordt besproken in hoofdstuk 2. Er zijn vijf primaire prostanoiden: de prostaglandines PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂, PGD₂ en Thromboxaan A₂. Deze prostanoiden worden gesynthetiseerd door de cyclo oxygenase enzymen, COX1 en COX2. Zowel in diermodellen als in studies bij proefpersonen, zijn deze signaalmoleculen aangetoond in geval van verminderde functionele blaas capaciteit. Op basis hiervan is de gedachte ontstaan dat remming van de prostaïd productie of het gebruik van de prostaïd receptorantagonisten, een potentiële behandeling van patiënten met overactieve blaas syndroom kan zijn. Op dezelfde manier kunnen wellicht prostaïd receptor agonisten of stoffen die de productie van prostanoiden stimuleren een plaats hebben bij de behandeling van blaas onderactiviteit.

In hoofdstuk 3 wordt een studie gepresenteerd naar de verdeling van de PGE₂ receptoren EP1 en EP2 in het urotheel en het suburotheel van de urineblaas van de cavia. In deze morfologische studie worden immunohistochemische technieken met antilichamen tegen EP1, EP2, vimentin en COX1 toegepast. De resultaten tonen een zwak en puntsgewijze EP1 kleuring verdeeld over alle cellagen van het urotheel met inbegrip van de suburotheliale cellen. Daarnaast wordt in het urotheel en het suburotheel een sterke EP2 kleuring waargenomen. Het COX1 enzym was afwezig in interstitiële cellen en paraplu cellen maar had de hoogste concentratie in de basale cellaag van het urotheel. Het antilichaam vimentin werd gebruikt voor de identificatie van interstitiële cellen. Deze cellen kleurden aan voor EP1 en EP2, hetgeen erop wijst dat zij op PGE₂ kunnen reageren. Het COX1 enzym was aanwezig in basale urotheliale cellen. Dit toont aan dat deze laag mogelijk een plaats is van PGE₂ productie. PGE₂ geproduceerd door het urotheel kan zo zijn werking hebben via de EP1 en EP2 receptoren in het urotheel en het suburotheel.

De verdeling van de EP₁ receptoren in de spierlaag van de caviablaas (de detrusor) wordt weergegeven in hoofdstuk 4. Immunohistochemische technieken met antilichamen tegen EP₁, vimentin en COX₁ werden gebruikt om EP₁ te visualiseren. EP₁ werd gezien op de gladde spiercellen, vimentin positieve oppervlakte interstitiële cellen en de intramusculaire interstitiële cellen. De kleuring van de gladde spiercellen was minder intens dan die op interstitiële cellen. EP₁ expressie op interstitiële cellen was steeds op een klein stuk van de cel gelokaliseerd. Daarnaast werd het COX₁ enzym op de interstitiële cellen in de spierlaag aangetoond. COX₁ positieve interstitiële cellen werden vaker in de spierbundels van de binnenste spierlaag gevonden dan in de buitenste spier lagen. Uit de ontdekte rangschikking van EP₁ en COX₁ kan worden geconcludeerd dat de PG signalen via het netwerk van interstitiële cellen door de spierlagen van de blaas verspreid zou kunnen worden. Dit systeem kan dan een rol vervullen in de coördinatie van verschillende processen in de blaas.

In hoofdstuk 5, wordt de verspreiding van de EP₂ receptor in de spierlaag beschreven. De verspreiding van de EP₂ receptoren werd bestudeerd door middel van immunohistochemische technieken met antilichamen tegen EP₂, vimentin en COX₁. EP₂ receptoren werden gezien op gladde spiercellen, op vimentin positieve oppervlakte interstitiële cellen en intramusculaire interstitiële cellen. EP₂ expressie op interstitiële cellen was steeds op een klein gedeelte van de cel gelokaliseerd. Op de uitlopers van de interstitiële cellen werd afzonderlijke regio's van intense EP₂ kleuring waargenomen. Het COX₁ enzym werd in de interstitiële cellen gelokaliseerd. Dit enzym was op afzonderlijke regio's van de cel en de cel uitlopers gelokaliseerd. Dubbel kleuringen met EP₂ en COX₁ wijzen erop dat de expressie plaats van EP₂ een andere is dan die van COX₁. De aanwezigheid van COX₁ en EP₂ op het netwerk van interstitiële cellen kan erop wijzen dat het netwerk van interstitiële cellen een rol heeft in de verspreiding van PG signalen.

Op basis van een lagere dissociatieconstante van EP₂, wordt voorgesteld dat een stijging van PG niveaus geleidelijk het evenwicht van een relaxerend EP₂ effect naar een contractiele EP₁ effect kan doen doorslaan. PG kan derhalve een rol hebben in het regelmechanisme van de blaas middels verandering van de drempelwaarde voor de prikkelbaarheid van het netwerk.

Het effect van PG concentratieverlaging middels COX-remming op cholinerg geïnduceerde spontane contracties wordt uiteengezet in hoofdstuk 6. In deze studie, werd een katheter door de urinebuis geplaatst om de intravesicale druk van geïsoleerde cavia blazen te meten. De blazen werden geplaatst in een orgaanbad met Krebs oplossing. Een cholinerge, muscarinerge agonist (Arecaidine), een niet-selectieve COX-remmer (indomethacin) en PGE₂ werden opeenvolgend toegevoegd aan het orgaanbad. De gemiddelde frequentie (F_{ini}) en de amplitude (P_{ini}) van spontane contracties in de eerste 2 minuten na arecaidine werden bestudeerd, evenals de gemiddelde frequentie (F_{steady}) en de amplitude (P_{steady}) tijdens de 5 minuten voordat de volgende wasstap gebeurde. Toevoeging van 1 μ M PGE₂ verhoogde de amplitude van spontane contracties zonder een effect te hebben op de frequentie.

COX-remming middels indomethacin ($10 \mu\text{M}$) verminderde de amplitude maar niet de frequentie. De toevoeging van indomethacin had geen effect op F_{ini} na de eerste stimulatie ($p = 0.7665$). Echter, na de tweede wasstap, was F_{ini} verlaagd ($p = 0.0005$). F_{steady} , P_{steady} en P_{ini} veranderen niet significant. Door PGE_2 toevoeging werd de omkeerbaarheid van deze effecten van indomethacin gecontroleerd en aangetoond. De frequentie van muscarinerg gestimuleerde autonome contracties in de geïsoleerde blaas daalt door het blokkeren van de PG synthese. Deze gegevens duiden erop dat PG nodig is voor de normale muscarinerg geïnduceerde contractie.

Een overzicht van de huidige kennis over de rol van PDE in de blaas pathofysiologie wordt in hoofdstuk 7 geven. PDE enzymen hydrolyseren de cyclische nucleotide monophosphates cAMP en cGMP die een rol spelen in de blaas fysiologie. De remming van PDE, resulterend in een verhoging in cAMP- en cGMP niveaus, heeft een ontspannende werking in geïsoleerde urineblaas gladde spieren cellen van verschillende diersoorten. Er zijn verschillende PDE subtypen aangetoond in de dierlijke en menselijke blaas waaronder PDE5 in rat, PDE1 en PDE5 in konijn en PDE1 - PDE5 en PDE7 -PDE9 in de menselijke urineblaas. De meerderheid van de preklinische functionele studies zijn uitgevoerd in de rattenblaas en zijn toegespitst op selectieve inhibitoren van de PDE4 en PDE5. Tot op heden is alleen de betekenis van PDE1 en PDE5 klinisch bestudeerd. Van PDE1 inhibitie is gesuggereerd dat het de plasfrequentie verlaagt. Er zijn echter, tot nu toe, alleen beperkte klinische studies beschikbaar om deze suggestie te onderbouwen. PDE5 inhibitie is uitgebreid bestudeerd en daarvan is aangetoond dat het een verbetering geeft op de scorelijst van plasklachten (IPSS) bij mannen met lage urineweg symptomen met of zonder goedaardige prostaatvergroting. Bovendien, is bekend dat PDE5-remmers in combinatie met een alpha-adrenoceptor antagonist superieur zijn aan monotherapie met een van de twee genoemde medicijnen als het gaat om de verbetering van IPSS. De rol van PDE5-remmers bij de behandeling van vrouwen met detrusor overactiviteit blijft onduidelijk en is een interessant gebied voor toekomstig onderzoek. De klinische toepassing van andere PDE-remmers, waaronder PDE4 en de onlangs ontwikkelde PDE5-remmers, verdienen zeker meer wetenschappelijke aandacht en kunnen in de toekomst een uitdagend therapeutisch alternatief worden.

De verdeling en de lokatie van effect van het PDE5 enzym in de caviablaas wordt besproken in hoofdstuk 8. De gegevens van dit hoofdstuk zijn verkregen door middel van een indirecte visualisatie techniek. Hierbij werd het product van PDE5 inhibitie (d.w.z. cGMP) bestudeerd in blaas weefsels welke na voorbereiding met de PDE5-remmer vardenafil met stikstofmonoxide (NO) waren gestimuleerd. Na PDE5 remming, wordt cGMP aangetoond in het urotheel, de suburotheliale interstitiële cellen en het endotheel van bloedvaten. cGMP is niet aanwezig in zenuwen die aankleurden met een CGRP, NF of SV2 kleuring. In slechts enkele efferente zenuwen was er een cGMP kleuring te zien na PDE5 inhibitie. De mogelijke werkingsplaats van PDE5 inhibitoren is daarom het urotheel, de suburotheliale interstitiële cellen en de bloedvaten, en niet de eerder gesuggereerde zenuwvezels.

Een algemene discussie van alle studies gepresenteerd in dit proefschrift volgt in hoofdstuk 9. Functionele studies zijn de volgende stap om de betekenis van de gegevens die in dit proefschrift worden beschreven beter te begrijpen. De gepresenteerde gegevens vormen een basis voor verder onderzoek naar selectieve modulatie van de EP1 en EP2 receptoren. Deze kunnen een potentieel therapeutisch middel zijn in de behandeling van functionele blaas aandoeningen zoals OAB. PDE-remmers, zijn dichterbij klinisch gebruik, daar deze middelen reeds zijn bestudeerd en geregistreerd voor andere indicaties zoals erectie stoornissen bij mannen. Klinisch onderzoek bij proefpersonen kan daarom op korte termijn worden uitgevoerd. Echter, vanuit een wetenschappelijke visie is het belangrijk de exacte werkingsplaats van PDE remming met *in vitro* en *in vivo* studies te ontrafelen. Op deze manier kan wellicht een combinatie van middelen worden gevonden waarvan elk gericht is op een bepaald mechanisme van de blaas fysiologie bijvoorbeeld PG, cGMP, cAMP en muscarinerge receptoren. Hierdoor kunnen hopelijk de bijwerkingen van de behandeling verminderd, en de werkzaamheid, verhoogd worden.