



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI

**DOTTORATO DI RICERCA**

Biologia e Biochimica dell'Uomo e dell'Ambiente

Bioenergetica del movimento umano

Ciclo XXVIII

**Nuove osservazioni sulla biomeccanica dell'uretere umano**

BIO/09

Presentata da: Francesca Broccia

Coordinatore Dottorato: Emanuele Sanna

Tutor: Romina Vargiu

Esame finale anno accademico 2014 – 2015

## **Abstract**

The function of ureter is to transport the urine from the kidney to the urinary bladder. Ureteral peristalsis, the principal motor event that propels urine along the ureter, is the result of coordinated contractions of longitudinal and circular smooth muscle inside the organ wall. Alterations of static and dynamic biomechanical properties of the ureteral wall lead to pathological states compromising regular urine transportation to bladder. Although knowledge on ureteral motility has advanced considerably, the molecular contractile mechanism of ureteral smooth muscle cells is not fully understood. This study provides information about baseline mechanical properties of the entire muscle and the molecular contractile mechanism in human ureter smooth muscle and proposed to investigate if changes in mechanical motor performance in different regions of isolated human ureter are attributable to differences in myosin crossbridge interactions. Classic mechanical, kinetic and energetic parameters derived from the tension-velocity relationship were studied in ureteral smooth muscle strips oriented longitudinally and circularly from abdominal and pelvic human ureter parts. By applying of Huxley's mathematical model we calculated the total working crossbridge number per  $\text{mm}^2$  ( $\Psi$ ), elementary force per single crossbridge ( $\Pi_0$ ), duration of maximum rate constant of crossbridge attachment  $1/f_1$  and detachment  $1/g_2$  and peak mechanical efficiency ( $\text{Eff.}_{\text{max}}$ ).

Although no substantial differences exist in structural, biochemical and histological characteristics along the human ureter, abdominal longitudinal smooth muscle strips showed a higher maximum isometric tension, greater shortening, faster shortening velocity and higher maximum peak of work and power output than pelvic ones. Contractile differences were associated with significantly higher crossbridge number per  $\text{mm}^2$ . Abdominal longitudinal

muscle strips showed a lower duration of maximum rate constant of crossbridge attachment and detachment and higher peak mechanical efficiency than pelvic ones.

Such data suggest that the abdominal human ureter exhibited better mechanical motor performance than pelvic ureter, mainly related to a higher crossbridge number and crossbridge kinetics differences. We believe that our results will be useful to understand better the physiology and physiopathology of ureteral smooth muscle, as well as improving the evaluation of pharmacological and surgical therapies in particular clinical cases.

<b>Abstract .....</b>	<b>2</b>
<b>1. Introduzione .....</b>	<b>5</b>
1.1 Cenni di anatomia dell'uretere umano .....	5
1.2 Cenni di istologia dell'uretere umano .....	5
1.3 Origine e conduzione dell'impulso elettrico dalla pelvi all'uretere .....	6
1.4 Peristalsi ureterale e sua modulazione nervosa .....	10
1.5 Meccanismo contrattile della fibra muscolare liscia ureterale.....	13
1.6 Premessa allo scopo della ricerca.....	15
1.7 Scopo della ricerca .....	17
<b>2. Materiali e metodi .....</b>	<b>18</b>
2.1 Protocollo Sperimentale .....	18
2.1.1 <i>Fase sperimentale: allestimento delle strisce muscolari e registrazione dei parametri meccanici.</i> .....	18
2.1.2 <i>Elaborazione dei parametri meccanici e la relazione forza-velocità</i> .....	21
2.1.3 <i>Fase teorica: applicazione del modello matematico di Huxley</i> .....	22
2.1.4 <i>Analisi statistica</i> .....	23
<b>3. Risultati.....</b>	<b>24</b>
3.1 Parametri meccanici ed energetici della muscolatura liscia ureterale .....	24
3.2 Meccanica e cinetica dei ponti trasversi .....	27
<b>4. Discussione.....</b>	<b>30</b>
<b>5. Bibliografia .....</b>	<b>35</b>

## **1. Introduzione**

### **1.1 Cenni di anatomia dell'uretere umano**

L'uretere è un organo tubulare la cui funzione è quella di trasportare l'urina prodotta dai reni alla vescica urinaria. Gli ureteri sono organi pari, uno per ogni rene, lunghi tra i 28 ed i 30 cm; essi decorrono, per la maggior parte della loro lunghezza, nella cavità addominale, continuano nella regione pelvica ed il loro ultimo tratto, chiamato uretere intramurale, si inserisce per 1-1.5 cm all'interno dello spessore vescicale ove decorre verso il basso, obliquamente, fino a terminare col meato ureterale. Questo sbocco ha la forma di una fessura lunga 3-5 mm e lateralmente ad esso si trova una ripiegatura della mucosa vescicale nota come valvola uretero-vescicale. L'uretere non ha un andamento rettilineo ma presenta due leggere convessità: una rivolta anteriormente e l'altra posteriormente. Conseguentemente, l'organo nel suo passaggio dalla porzione addominale a quella pelvica, cambia direzione bruscamente, formando la cosiddetta flessura marginale a livello dell'incrocio con i vasi iliaci. A causa della pressione dei visceri addominali, l'uretere ha un lume appiattito antero-posteriormente con un diametro compreso tra i 4 ed i 7 mm. Durante il suo decorso, tuttavia, si possono individuare tre restringimenti fisiologici: la giunzione uretero-pelvica, localizzata ad una distanza di 7-8 cm dall'ilo renale, l'istmo inferiore o restringimento iliaco, a livello della flessura marginale, e la giunzione uretero-vescicale o intramurale, poco prima dello sbocco in vescica.

### **1.2 Cenni di istologia dell'uretere umano**

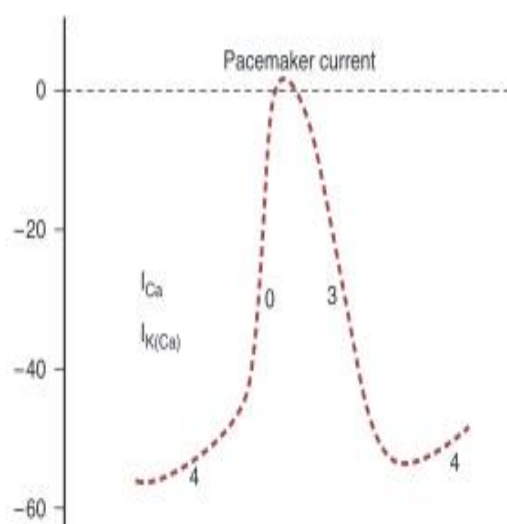
La parete dell'uretere è costituita da una tonaca più interna, la mucosa, da una tonaca muscolare, intermedia, e dall'avventizia. La tonaca mucosa comprende un epitelio di transizione, costituito da 4 a 6 strati cellulari che, oltre a fungere da barriera protettiva contro l'acidità dell'urina, consente cambiamenti conformazionali della parete ureterale durante i processi di distensione e di contrazione, grazie alla presenza di un liquido citoplasmatico estremamente deformabile che favorisce lo scivolamento delle cellule le une sulle altre [1; 2].

L'epitelio di transizione poggia su un sottile strato di sottomucosa di 300-700  $\mu\text{m}$  costituito da un elevato numero di fibre collagene, fibre elastiche e piccoli vasi. Negli strati più superficiali della sottomucosa sono rilevabili numerosi fasci di fibre amieliniche, verosimilmente terminazioni nervose di tipo afferente. La tonaca muscolare ha uno spessore di circa 750-800  $\mu\text{m}$  ed è composta da cellule muscolari lisce, separate da fibre collagene, orientate in modo tale da formare due strati: uno interno longitudinale ed uno esterno circolare. Diversamente dal sistema gastroenterico, l'organizzazione a strati della muscolatura liscia ureterale non è così netta e definita, ma è possibile visualizzare una compenetrazione e migrazione di cellule muscolari tra i due strati. Nell'uretere trasmurale, questo differente orientamento è perduto ed i fasci muscolari orientano prevalentemente il loro asse maggiore in direzione longitudinale. In quest'ultima porzione l'uretere si arricchisce di un ulteriore strato muscolare a prevalente orientamento longitudinale, derivante da fasci del muscolo detrusore della vescica che prendono contatto con l'avventizia dell'organo. L'intero spessore muscolare è disseminato di piccoli vasi, alcuni dei quali in stretto rapporto con terminazioni nervose efferenti di tipo adrenergico. Sono presenti anche fibre nervose libere, non associate ai vasi sanguigni, casualmente distribuite tra le cellule muscolari. La tonaca avventizia è lo strato ureterale più esterno, costituito da tessuto connettivo ricco di fibre collagene e vasi sanguigni con fibrocellule di supporto. L'analisi al microscopio elettronico rivela, inframezzati tra poche fibre nervose mielinizzate, un gran numero di fasci nervosi amielinici, contenenti da trenta a trecento assoni ciascuno, che instaurano contatti intimi con la parete dei vasi, indicando, per analogia con il sistema vascolare presente in altre parti dell'organismo, che si tratti di fibre nervose efferenti di tipo adrenergico.

### **1.3 Origine e conduzione dell'impulso elettrico dalla pelvi all'uretere**

Il principale evento meccanico che garantisce la propulsione dell'urina lungo l'uretere è la peristalsi ureterale. In condizioni normali, la peristalsi ureterale si origina nei calici e nella

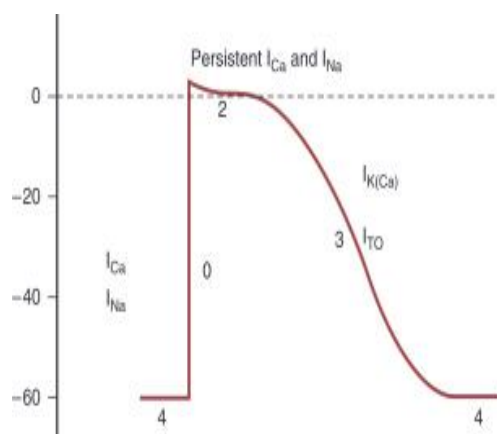
pelvi in seguito all'ingresso di urina che, distendendone le pareti, evoca l'attività elettrica di siti pacemakers ivi localizzati [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10]. L'attività elettrica si propaga, quindi, distalmente verso l'uretere dando luogo all'evento meccanico della peristalsi. Le cellule pacemakers sono state descritte da vari autori come fibroblasti specializzati dotati di autoritmicità ed assimilate alle cellule interstiziali del Cajal dell'apparto gastroenterico [11]. Sono cellule fusiformi con una lunghezza dai 90 ai 230  $\mu\text{m}$ , il loro citoplasma contiene il 40% in meno di miofilamenti contrattili e possiedono meccanocettori sensibili allo stiramento; il loro potenziale di membrana a riposo è  $-55/-40$  mV e non si mantiene stabile, ma subisce una lenta depolarizzazione che, spontaneamente, consente alla membrana di raggiungere il valore soglia, generando il potenziale d'azione (Fig.1.1). L'attività elettrica delle fibre autoritmiche è determinata dall'apertura e lenta chiusura di canali per il calcio di tipo L-voltaggio dipendenti,  $I_{Ca}$ , e da canali per il potassio dipendenti dal calcio,  $I_{K(Ca)}$  che determinano la ripolarizzazione della membrana cellulare.



**Fig. 1.1.** Potenziale d'azione delle cellule pacemakers della pelvi renale. La depolarizzazione è causata dall'apertura e lenta chiusura dei canali al calcio di tipo L- voltaggio dipendenti ( $I_{Ca}$ ). La ripolarizzazione è dovuta all'apertura dei canali al potassio dipendenti dal calcio ( $I_{K(Ca)}$ ).

Nelle specie con un sistema multicaliceale, come nell'uomo, le fibre pacemakers sono localizzate tra i calici e la pelvi [11, 12, 13]. Dai siti pacemakers l'eccitazione si propaga

elettrotonicamente, in direzione distale, raggiungendo le fibrocellule ureterali e trasferendosi di cellula in cellula attraverso punti di contatto presenti tra le membrane. Come rappresentato in figura 1.2, il potenziale di membrana a riposo della cellula muscolare liscia ureterale è di -33/-70 mV ed è determinato principalmente dalla distribuzione degli ioni potassio a cavallo della membrana plasmatica. Tale potenziale rimane stabile fino a quando non viene eccitato da uno stimolo esterno (elettrico, chimico o meccanico) o dalla conduzione di un potenziale d'azione che si propaga da una cellula adiacente attiva. Il potenziale d'azione dell'uretere è caratterizzato da un iniziale spike seguito da una fase di plateau, responsabile della lunga durata dell'attività elettrica ureterale. La depolarizzazione fino allo spike è sostenuta dall'ingresso di calcio attraverso canali rapidi voltaggio dipendenti,  $I_{Ca}$ , da un'iniziale corrente entrante di sodio,  $I_{Na}$ , e da una ridotta permeabilità della membrana al potassio. Durante il plateau si registra un contemporaneo ingresso di calcio e sodio,  $I_{Ca} + I_{Na}$ , attraverso canali più lenti e, successivamente ad esso, la cellula si ripolarizza per un rinnovato incremento della sua permeabilità allo ione potassio.

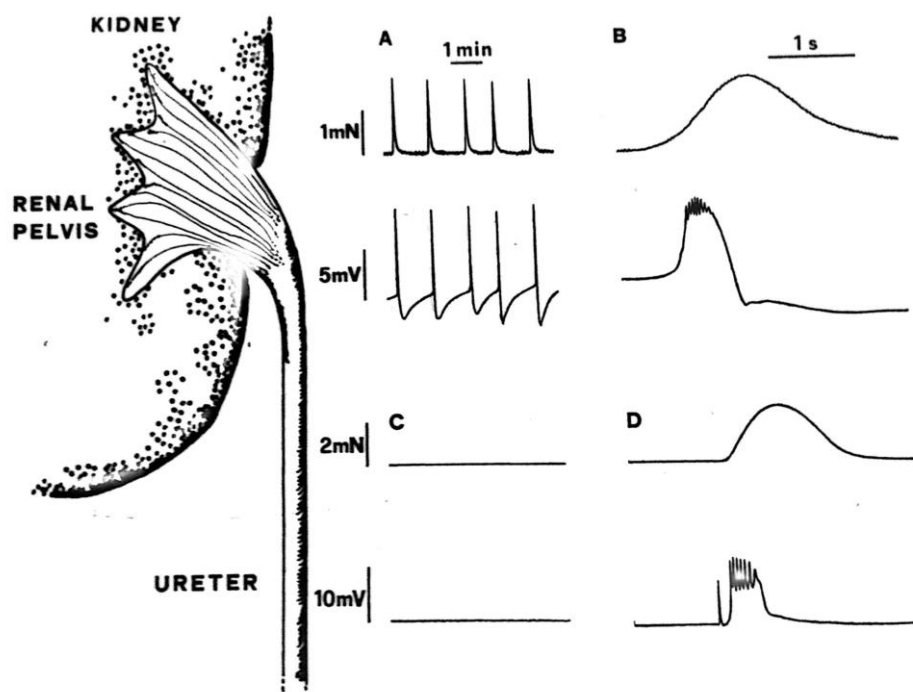


**Fig. 1.2.** Potenziale d'azione delle cellule ureterali. La depolarizzazione è causata dal massiccio ingresso di calcio attraverso canali rapidi voltaggio dipendenti ( $I_{Ca}$ ) e da un'iniziale corrente entrante di sodio ( $I_{Na}$ ). Plateau sostenuto ionicamente da una corrente entrante persistente di calcio e sodio ( $I_{Ca} + I_{Na}$ ). La ripolarizzazione è dovuta alla contemporanea apertura di due tipi di canali al potassio: ( $I_{K(Ca)} + I_{TO}$ ).

Quando lo stimolo depolarizza un'area della superficie cellulare ureterale sufficiente al raggiungimento del potenziale soglia, si genera un potenziale d'azione capace di agire come



stimolo per l'eccitazione delle cellule vicine quiescenti. L'attività elettrica è condotta distalmente da una fibra muscolare all'altra attraverso aree di stretto contatto fra cellule contigue rappresentate da strutture assimilabili a giunzioni intermedie, simili ai nessi individuati in altri organi a muscolatura liscia come l'utero e l'intestino [14]. I nessi rappresentano delle aree a bassa resistenza elettrica che consentono la rapida diffusione dell'eccitazione da una cellula all'altra (2-6 cm/s), garantendo un percorso preferenziale attraverso il quale il potenziale d'azione può propagarsi lungo l'uretere. La conduzione "cell-to-cell", attraverso vie a bassa resistenza, osservata in altri muscoli lisci, ha suggerito, pertanto, anche per l'uretere, un simile meccanismo di conduzione dell'impulso [15]. La presenza di gap junctions, proteine canale di membrana che consentono lo scambio di ioni e di piccole molecole tra cellule limitrofe, gioca un ruolo importante nell'accoppiamento elettromeccanico tra cellule adiacenti [16], suggerendo che l'uretere agisca come un sincizio funzionale (Fig. 1.3).



**Fig. 1.3.** In A, sono rappresentate in alto le onde di forza ed in basso i potenziali d'azione delle cellule pacemakers della pelvi renale, visibili entrambi in dettaglio in B. In C, è rappresentata la quiescenza elettrica e motoria in condizioni di riposo. In D sono rappresentate in alto le onde di forza ed in basso i potenziali d'azione delle cellule ureterali in seguito all'arrivo di uno stimolo.

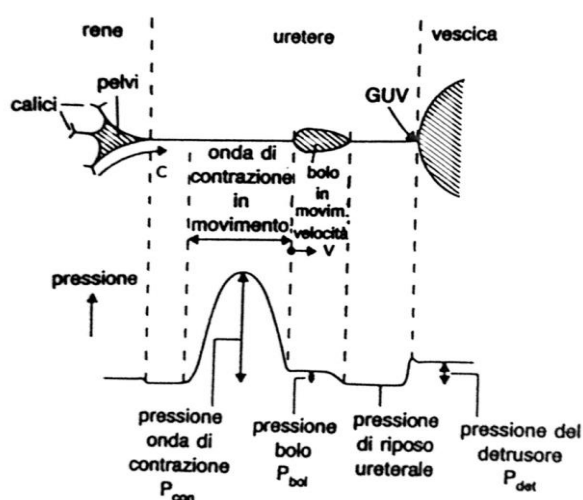
L'attività elettrica spontanea dell'uretere è conservata anche dopo dissezione della pelvi renale, indicando che l'autoritmicità non è prerogativa esclusiva delle cellule del tratto urinario superiore ma è presente anche in regioni più distali dove sono state identificate subunità pacemakers secondarie che si autoeccitano con una frequenza minore. Questo significa che il ritmo delle contrazioni peristaltiche è primariamente dovuto alla frequenza di eccitazione del pacemaker principale, localizzato, come già detto, in regione pelvico-caliceale, e che la forza sviluppata dipende dal grado di sincronizzazione tra i vari pacemakers [17].

L'evento elettrico che si realizza a livello della pelvi renale determina l'insorgenza di onde peristaltiche che si propagano verso la vescica, garantendo lo spostamento dell'urina in direzione anterograda.

#### **1.4 Peristalsi ureterale e sua modulazione nervosa**

L'attività peristaltica è quell'attività contrattile dell'uretere che consente la progressione unidirezionale del bolo urinario dalla pelvi alla vescica urinaria. L'efficacia della peristalsi ureterale è garantita dalle azioni coordinate degli strati di muscolatura longitudinale e circolare, i quali, in risposta allo stiramento indotto dalla presenza del bolo urinario, si contraggono. La muscolatura longitudinale è responsabile dell'accorciamento dell'organo e, quindi, del movimento del bolo urinario, mentre quella circolare fa collabire le pareti dell'uretere, contribuendo a generare la pressione di spinta. Secondo alcuni autori [18] il maggior contributo allo spostamento dell'urina verso la vescica sarebbe da attribuire all'attività motoria dello strato longitudinale, le cui contrazioni, propagandosi assialmente in direzione distale, determinerebbero la distensione passiva dei segmenti ureterali immediatamente a monte, contribuendo alla formazione di una sorta di "diastole ureterale". La prima fase dell'onda contrattile della muscolatura longitudinale promuoverebbe, quindi, il riarrangiamento del bolo urinario ed il suo spostamento verso il diametro ureterale dilatato,

verso il quale l'urina è indirizzata anche dall'azione congiunta della contrazione dello strato circolare immediatamente a monte del segmento dilatato. I segmenti ureterali longitudinali subito a valle del bolo urinario si troverebbero in questa fase passivamente distesi e questo contribuirebbe ulteriormente al loro riempimento e, quindi, in ultima analisi, alla propagazione dell'urina lungo l'intero organo. La ripetizione di questa sequenza coordinata di eventi meccanici in segmenti successivi di uretere garantisce la propulsione anterograda del bolo urinario ed, infine, la sua iniezione in vescica. In condizioni di flusso urinario nella norma, il riempimento della pelvi determina un incremento pressorio al suo interno che consente all'urina di superare facilmente la pressione vigente a livello della giunzione uretero-pelvica. Come rappresentato schematicamente in figura 1.4, normalmente le pareti ureterali sono collabite e nell'organo è presente una bassa pressione di riposo. La distensione delle pareti dell'organo, dovuta all'ingresso del bolo urinario, incrementa la tensione passiva (o pressione di riposo) e rappresenta lo stimolo meccanico per la genesi dell'onda contrattile responsabile della spinta pressoria necessaria alla propagazione dell'urina in direzione distale. Quando il bolo raggiunge la giunzione uretero-vescicale (in figura: GUV) la sua pressione deve superare quella sviluppata dal muscolo detrusore presente in vescica per consentire l'ingresso dell'urina.



**Fig. 1.4.** Variazioni pressorie lungo l'uretere e movimento anterogrado del bolo urinario

L'entità delle onde peristaltiche dipende dal volume del bolo urinario responsabile del grado di distensione della parete ureterale.

Dal momento che la peristalsi si configura come una proprietà intrinseca del muscolo liscio ureterale, si è ampiamente indagato circa il ruolo fisiologico svolto dall'innervazione afferente ed efferente rinvenuta in questa sede. In tutti gli strati della parete ureterale, con la sola eccezione dell'epitelio di transizione, si osserva, infatti, un'estesa ramificazione di fibre nervose amieliniche, non supportate da strutture gangliari.

L'uretere umano esprime l'intera popolazione recettoriale muscarinica (M1-M5), la cui attivazione comporta un effetto eccitatorio o inibitorio e la cui densità aumenta procedendo dalla giunzione pelvico-ureterale alla vescica urinaria. L'interazione dell'agonista con i recettori M1, M3, M5 determina l'attivazione della fosfolipasi C (PLC), responsabile della sintesi di due secondi messaggeri, il diacilglicerolo (DG) e l'inositolo trifosfato ( $IP_3$ ) che, con meccanismi differenti, inducono un incremento della contrattilità dell'organo. L'interazione degli agonisti colinergici con i recettori M2, M4 causa inibizione dell'attività contrattile ureterale mediante attivazione di una proteinchinasi A (PKA) che determina l'iperpolarizzazione della cellula e, quindi, rilassamento muscolare [19]. Fibre nervose noradrenergiche sono distribuite nell'avventizia, nello strato muscolare e nella tonaca sottomucosa. Il ruolo delle fibre nervose ortosimpatiche sulla muscolatura liscia ureterale è eccitatorio, quando vengono attivati i recettori di tipo  $\alpha$ , ed inibitorio quando ad essere attivati sono i recettori di tipo  $\beta$  [20]. Inoltre, secondo lo schema di distribuzione della rete neurale, appare chiaro che le fibre noradrenergiche rivestono un ruolo anche nella regolazione del flusso ematico ureterale. L'attivazione degli  $\alpha$ -recettori causa un incremento della concentrazione intracellulare di calcio mediato dal DG e dall' $IP_3$ , che si concretizza in un aumento della frequenza, della forza sviluppata dalle onde peristaltiche e del tono basale. L'interazione con i recettori  $\beta$ -adrenergici, invece, porta ad un incremento citoplasmatico dei

livelli di adenosinmonofosfatociclico (AMPC) che, attivando la PKA, determina iperpolarizzazione della cellula e, conseguentemente, rilassamento muscolare.

Accanto alla modulazione autonoma, l'uretere umano manifesta una spiccata sensibilità nei confronti di tutta una serie di altri peptidi e sostanze ad azione neuroregolatrice che si configurano come modulatori locali della sua motilità.

Nelle fibre nervose afferenti presenti negli strati muscolari della pelvi renale e dell'uretere umano, o in stretta associazione con i vasi sanguigni localizzati a livello submucosale, sono state identificate due tachichinine, la sostanza P (SP) e la neurokinina A (NKA), e il calcitonin gene related peptide (CGRP). Le due tachichinine inducono un effetto cronotropo ed inotropo positivo sulla muscolatura liscia pieloureterale [21]. Il CGRP, invece, in modelli animali, sopprime marcatamente l'attività elettrica evocata dell'uretere e quella spontanea della pelvi renale [22, 23, 24, 25].

In specie animali e nell'uomo sono state descritte fibre nervose rilascianti neuropeptide Y (NPY), spesso coesistenti con le fibre noradrenergiche, la cui azione sembrerebbe rafforzare l'incremento della contrattilità ureterale indotta dal sistema simpatico [26]. Nella muscolatura liscia ureterale umana sono ben rappresentate anche fibre nervose afferenti rilascianti vasoactive intestinal peptide (VIP), che ricevono costantemente informazioni sensoriali provenienti da chemocettori e meccanocettori pelvici [27]. La conseguente risposta fisiologica alla stimolazione di queste afferenze sensoriali è un efficace trasporto urinario determinato dall'aumento della contrattilità dell'uretere e della frequenza delle onde peristaltiche.

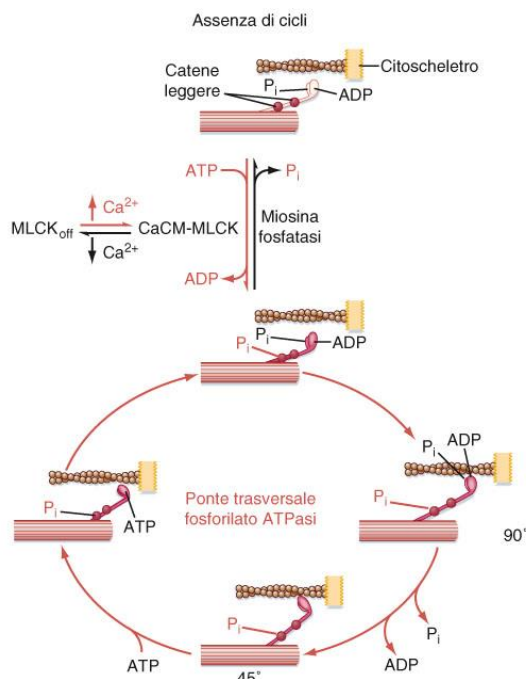
### **1.5 Meccanismo contrattile della fibra muscolare liscia ureterale**

Per tutti i tipi di muscolo, l'evento iniziale della contrazione è l'incremento della concentrazione citoplasmatica di  $Ca^{2+}$  [28, 29; 30].

Nel muscolo liscio il  $Ca^{2+}$  citoplasmatico, legandosi con la calmodulina,  $Ca^{2+}$ -CM, si comporta come l'attivatore della prima tappa di una cascata di reazioni che culmina

nell'attivazione della chinasi per le catene leggere della miosina (MLCK). La fosforilazione delle catene leggere potenzia l'attività ATPasica della miosina, consentendole di interagire con il filamento di actina per la formazione del ponte trasverso. Anche nella cellula muscolare liscia è universalmente accettata la teoria dello slittamento dei miofilamenti l'uno sull'altro durante il processo noto come ciclo dei ponti trasversi, schematicamente rappresentato in figura 1.5. In condizioni di riposo la testa della miosina, orientata a  $45^\circ$  rispetto alla coda, lega una molecola di ATP. In seguito all'attivazione della MLCK, la molecola di ATP viene idrolizzata in fosfato inorganico, Pi, e ADP causando una variazione conformazionale che dispone la testa miosinica a  $90^\circ$ , posizione ideale per la formazione del ponte trasverso actomiosinico. Una volta che il ponte è formato, il distacco di Pi e ADP fornisce alla miosina l'energia necessaria per effettuare il "*power stroke*", cioè il colpo di forza che fa slittare l'actina verso il centro del sarcomero, determinando la contrazione muscolare.

La testa miosinica possiede anche proprietà fosfatasi (MLCP) la cui funzione è quella di inattivare, defosforilandole, le MLC. La riduzione dei livelli citoplasmatici di  $Ca^{2+}$ , dovuta all'attività della pompa  $Ca^{2+}$ -ATPasi presente nella membrana del reticolo sarcoplasmatico, riduce il numero dei complessi  $Ca^{2+}$ -CM, inattivando la MLCK e, conseguentemente, esaltando l'attività della MLCP. La rapida inattivazione dei miofilamenti spessi ad opera della MLCP causa il rilasciamento muscolare. Una peculiarità del muscolo liscio è quella di possedere anche un ciclo dei ponti trasversi "lento", che si realizza quando la MLCP agisce su ponti ancora legati al filamento di actina. La defosforilazione di tali ponti rallenta notevolmente la cinetica della loro fase di stacco, consentendo loro di contribuire ancora allo sviluppo di forza dell'intero sarcomero.



**Fig. 1.5.** Ciclo dei ponti trasversi

## 1.6 Premessa allo scopo della ricerca

Attualmente la conoscenza delle proprietà meccaniche del muscolo liscio del tratto ureterale e del ruolo del sistema nervoso sulla regolazione della sua attività contrattile deriva per la maggior parte da studi condotti su modelli animali [31, 32, 33, 34]. Pochissime sono, invece, le ricerche realizzate nell'uomo ed incentrate sull'analisi e caratterizzazione delle proprietà attive e passive della muscolatura liscia ureterale [35, 36, 37].

Alterazioni a carico delle proprietà biomeccaniche della muscolatura liscia ureterale conducono all'instaurarsi di stati patologici che compromettono il regolare trasporto dell'urina dai reni alla vescica [38].

Megauretere, idronefrosi e reflusso vescico-ureterale rappresentano alcune delle anomalie meccaniche che si possono manifestare in condizioni patologiche.

L'abnorme distensione del diametro dell'uretere umano, malattia conosciuta come megauretere, è caratterizzata da alterazioni delle proprietà statiche e dinamiche della muscolatura liscia, dipendenti da un'incrementata deposizione di collagene nella matrice

extracellulare e da un'alterazione delle giunzioni intercellulari. La deposizione di tessuto fibroso tra lo strato muscolare e la lamina propria di un certo tratto del condotto ureterale implica la perdita progressiva della sua capacità di distendersi. L'uretere, quindi, non è più capace di accogliere grandi flussi urinari, causando un ristagno di liquidi a monte dell'ostruzione e/o del restringimento, cui consegue dilatazione ed ipertrofia del tratto ureterale interessato, con successiva atrofia renale [39, 40]. Le pareti ureterali, quindi, non sono più in grado di collabire e la spinta propulsiva impressa al bolo urinario risulta insufficiente a garantire un'efficace peristalsi [41], inficiando la funzionalità dell'organo. Una simile disfunzione meccanica si osserva, anche, in pazienti che soffrono di idronefrosi idiopatica, una condizione patologica caratterizzata da abbondante deposizione di tessuto fibroso sia nello strato muscolare che nella lamina propria, responsabile dell'irrigidimento dell'intera struttura pelvica e della sua ridotta capacità distensiva in risposta all'aumentato volume urinario. L'attività peristaltica che ne deriva è sufficiente a garantire la propulsione del bolo urinario solo se il flusso è basso, ma l'incapacità di adeguare la velocità delle onde contrattili all'accresciuto volume urinario può portare all'accumulo di urina all'interno della struttura pelvico-caliceale, causandone una modificazione morfologica permanente.

E' noto, inoltre, che la perdita di distensibilità da parte della giunzione uretero-vescicale è un fattore meccanico determinante per l'insorgenza del reflusso vescico-ureterale [42].

Malgrado l'avanzamento delle conoscenze sulla biomeccanica della muscolatura liscia ureterale, osservato nell'ultimo ventennio, le modalità con cui essa si contrae ed il meccanismo molecolare alla base della sua contrazione, non sono stati ancora pienamente compresi. La conoscenza di tali meccanismi fisiologici consentirebbe la comprensione di un'alterata risposta meccanica ureterale in presenza di stati patologici.



## 1.7 Scopo della ricerca

La presente ricerca ha lo scopo non solo di approfondire le conoscenze di base relative alla biomeccanica della muscolatura liscia longitudinale e circolare della regione addominale e pelvica dell'uretere umano, ma anche quello di indagare per la prima volta attraverso un innovativo approccio modellistico, sulle proprietà meccaniche e cinetiche dei motori molecolari miosinici operanti nelle due regioni dell'uretere umano, al fine di capire se variazioni nell'attività contrattile, eventualmente osservate nei due strati di muscolatura liscia isolati da entrambe le regioni ureterali, fossero attribuibili a differenze nelle interazioni tra i miofilamenti contrattili.

Considerato che non esistono differenze sostanziali nelle caratteristiche dei ponti actomiosinici fra muscolo liscio e scheletrico [43], si può assumere che l'interazione fra i miofilamenti nella muscolatura liscia si realizzi con modalità analoghe a quelle proposte originariamente per il muscolo scheletrico [44]. Il meccanismo molecolare della contrazione muscolare dell'uretere umano può, quindi, essere indagato mediante l'applicazione del formalismo matematico di Huxley [44] adattato al muscolo liscio [43, 45]. L'applicazione di tale modello matematico consente di studiare le proprietà meccaniche e cinetiche della muscolatura liscia dell'uretere umano quali, forza, velocità e produzione di calore, e di correlarle con le proprietà biochimiche e strutturali dei nanomotori actomiosinici. È possibile, quindi, calcolare il numero dei ponti trasversi, la forza sviluppata da ciascun ponte, le costanti temporali di attacco e stacco delle teste miosiniche dal filamento actinico e la durata dell'intero ciclo.

## 2. Materiali e metodi

Il presente lavoro nasce in collaborazione con la Sezione di Urologia del Dipartimento di Scienze Chirurgiche dell'Università degli Studi di Cagliari ed ha ottenuto, come richiesto dalla Dichiarazione di Helsinki dell'Associazione Medica Mondiale, l'approvazione da parte del Comitato Etico della stessa Università.

Gli esperimenti sono stati condotti con tecnica *in vitro* su strisce di muscolatura liscia ureterale. Le proprietà meccaniche di una striscia di tessuto muscolare sono pressoché simili a quelle dell'organo *in toto* da cui sono state prelevate, per cui il modello sperimentale per lo studio di tessuti isolati costituisce un formidabile e peculiare strumento di indagine.

### 2.1 Protocollo Sperimentale

#### *2.1.1 Fase sperimentale: allestimento delle strisce muscolari e registrazione dei parametri meccanici.*

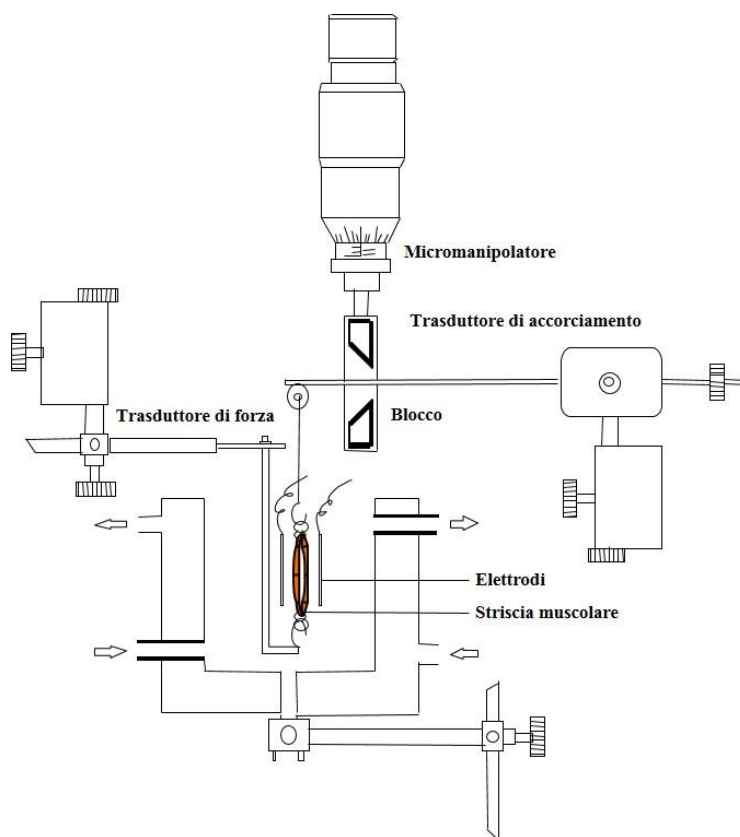
Il protocollo sperimentale prevedeva una fase sperimentale ed una fase teorica.

Gli esperimenti sono stati effettuati su strisce muscolari di uretere umano, provenienti da 15 pazienti, 11 uomini e 4 donne di età media pari a  $58.4 \pm 14$  anni, sottoposti a nefrourectomia per carcinoma renale, previa sottoscrizione di un consenso informato. Segmenti ureterali contigui a quelli destinati alle prove sperimentali, venivano sottoposti ad esame istologico per escludere la presenza di infiltrazione tumorale o di un qualsiasi processo flogistico. Subito dopo la resezione chirurgica, i segmenti ureterali, conservati in un contenitore ermetico contenente 100 ml di soluzione salina, 0.9 % di NaCl, venivano rapidamente trasportati nel laboratorio di "Indagini sperimentali di fisiologia e fisiopatologia del muscolo in modelli animali e nell'uomo" del Dipartimento di Scienze Biomediche e successivamente immersi in soluzione fisiologica di Krebs (composizione in mM, NaCl 118, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 2.52, MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 1.64, NaHCO<sub>3</sub> 24.88, glucosio 5.55). Sono stati utilizzati segmenti ureterali

provenienti dalla regione addominale, localizzata tra il rene ed il limite inferiore dell'osso pelvico, e dalla regione pelvica, situata tra la restante porzione ureterale e la vescica urinaria. Da entrambe le regioni sono state isolate strisce muscolari orientate circolarmente (3-4 mm di larghezza) e longitudinalmente (8-10 mm di lunghezza).

Le strisce muscolari venivano poste all'interno di un bagno per organi isolati contenente 15 ml di soluzione fisiologica di Krebs continuamente aerata con una miscela di gas contenente il 95% di O<sub>2</sub> ed il 5% di CO<sub>2</sub> e mantenuta a 37 °C e pH 7.4. Le due estremità dei preparati venivano collegate a due trasduttori tramite due piccoli anellini metallici, per cui essi risultavano sospesi verticalmente. Come rappresentato in figura 2.1, un'estremità del preparato veniva collegata ad un trasduttore di forza (Mod.Wp1 Fort 10, 2200  $\mu \times V \times V^{-1} \times g^{-1}$ , ADInstrument, Australia), mentre l'altra veniva collegata ad un trasduttore di spostamento lineare (momento di inerzia 35  $g \times cm^{-2}$ , coppia di spunto <0.1  $g \times cm^{-1}$ , Basile Comerio, Italia). La presenza di un blocco, applicabile al trasduttore di spostamento, consentiva di passare rapidamente, durante l'esperimento, dalla condizione isometrica a quella isotonica, o viceversa.

Il preparato muscolare così montato veniva sottoposto inizialmente ad un precarico di 20 mN per un periodo di circa 1 h, necessario per il raggiungimento di una tensione di riposo stabile.



**Fig. 2.1.** Rappresentazione schematica del sistema sperimentale.

Parallelamente alla striscia muscolare, erano posti due elettrodi di platino, attraverso i quali il preparato veniva stimolato elettricamente mediante stimolatore (Multiplexing Pulse Booster, Basile, Comerio, Italia). I parametri di stimolazione applicati sperimentalmente erano i seguenti: frequenza 30 Hz, durata dei treni di impulsi 300 ms, durata del singolo impulso 6 ms ed intensità 80-200 mA.

Durante la fase sperimentale, le risposte contrattili delle strisce ureterali, evocate dallo stimolo elettrico, venivano registrate sia in condizioni isometriche che isotoniche. Il preparato, posto in condizioni isometriche, rispondeva sviluppando una tensione contrattile registrata sotto forma di onde di forza mentre, posto in condizioni isotoniche, rispondeva allo stimolo elettrico con onde di accorciamento (software LabChart V7, ADInstruments, Australia).

Determinazione della relazione tensione-lunghezza. In condizioni isometriche il preparato veniva allungato progressivamente per step di 100  $\mu\text{m}$ , mediante un micromanipolatore collegato all'estremità superiore della striscia muscolare. Ad ogni step di allungamento esso

veniva stimolato elettricamente per la registrazione delle onde di contrazione isometriche. La conseguente curva tensione-lunghezza così ottenuta, consentiva di stabilire la lunghezza ottimale del preparato ( $L_{\max}$ , in mm), definita come la lunghezza alla quale il muscolo sviluppa la sua massima forza isometrica ( $P_0$ , in mN).

Tutte le successive prove in condizioni isotoniche venivano effettuate ad  $L_{\max}$ .

Determinazione della relazione forza-accorciamento. Al fine di registrare l'entità delle onde di accorciamento ( $\Delta L$ , in mm) a vari post-carichi, al preparato muscolare venivano applicati progressivamente, mediante l'utilizzo di un sistema di cremagliera e pignone associato al trasduttore di spostamento, da 1 a 10 carichi cumulativi, di entità pari al 10% della  $P_0$ , fino al raggiungimento dell'isometria. Il sistema sperimentale permetteva di registrare per ogni onda contrattile di accorciamento la corrispondente onda di forza.

Per rendere i dati sperimentali comparabili tra di loro, questi sono stati normalizzati per l'area del preparato ( $\text{mm}^2$ ) e/o per unità di lunghezza ( $L_{\max}$ ).

### ***2.1.2 Elaborazione dei parametri meccanici e la relazione forza-velocità***

I dati ottenuti sperimentalmente consentivano di calcolare la velocità di accorciamento ai vari post-carichi applicati e di costruire la curva forza-velocità per ciascun preparato muscolare. Dal punto di vista sperimentale, la massima velocità di accorciamento che è stato possibile calcolare è quella del preparato in condizioni di precarico ( $V_{c_{\max}}$ , in  $L_{\max} \times s^{-1}$ ). L'inserimento dei dati sperimentali nell'equazione iperbolica di Hill, permetteva, invece, la determinazione della massima velocità di accorciamento a carico nullo ( $V_{\max}$ , in  $L_{\max} \times s^{-1}$ ) secondo la seguente relazione:

$$(P + a)(V + b) = (P_0 + a)b$$

dove  $P$  rappresentava la forza sviluppata per ciascun post-carico applicato,  $V$  la velocità di accorciamento per quel dato carico,  $P_0$  la massima forza isometrica,  $a$  e  $b$  i due asintoti dell'iperbole [46].

Il valore di curvatura  $G$  [46, 47, 48] dell'iperbole di Hill veniva calcolato dal rapporto  $P_0/a$  e rifletteva l'economia miotermica dell'evento contrattile. L'efficienza massima,  $Eff_{max}$ , definita come il rapporto tra il lavoro svolto dal muscolo e l'energia totale spesa per la contrazione, veniva calcolata secondo la seguente formula [48]:

$$[G/(G+2)]^2$$

La conoscenza dell'entità e della velocità di accorciamento rendeva possibile calcolare il lavoro svolto e la potenza erogata per ogni post-carico applicato. Il lavoro era definito come il prodotto dell'accorciamento per la forza sviluppata ( $W_{max}$ , in  $\mu J \times mm^{-2} \times L_{max}^{-1}$ ) e la potenza erogata come il prodotto della velocità di accorciamento per la forza sviluppata ( $P_{output}$ , in  $\mu W \times mm^{-2} \times L_{max}^{-1}$ ).

### ***2.1.3 Fase teorica: applicazione del modello matematico di Huxley***

La forza di contrazione e la velocità di accorciamento muscolare dipendono dalle interazioni cicliche, attacco-slittamento-stacco, fra i miofilamenti contrattili, in un processo alimentato dall'ATP.

Le equazioni di Huxley rappresentano il modello matematico universalmente accettato per la determinazione delle caratteristiche meccaniche del muscolo striato e recentemente è stato adattato anche al muscolo liscio [43, 44, 45]. Questo modello matematico correla alcune proprietà macroscopiche del muscolo quali forza, velocità e produzione di calore, con le sue caratteristiche strutturali e biochimiche e fornisce informazioni relative all'intero macchinario contrattile cellulare.

I parametri meccanici ottenuti sperimentalmente,  $P_0$  e  $V_{max}$ , rappresentano i dati in ingresso nel formalismo matematico di Huxley, secondo il quale la forza totale sviluppata da un muscolo dipende sia dalla forza unitaria del singolo ponte trasverso sia dal numero di ponti che si formano all'interno di ciascun sarcomero. Il modello matematico consente di calcolare il numero di ponti trasversi ( $\Psi$ ) formati per  $mm^2$ , la forza unitaria di ciascun ponte ( $\Pi_0$ , in pN)

e le costanti cinetiche ( $1/g_2$  e  $1/f_1$ ) del ciclo dei ponti trasversi in funzione della velocità massima.

Attribuendo alla distanza  $h$  tra i ponti trasversi il valore di 11 nm, alla quota energetica  $e$  richiesta per idrolizzare una molecola di ATP il valore di  $5.1 \times 10^{-20}$  J, alla distanza  $l$  tra due filamenti actinici il valore di 36 nm ed al massimo lavoro meccanico  $w$  svolto da ciascun ponte il valore di  $3.8 \times 10^{-20}$  J, è possibile calcolare le costanti della massima velocità di attacco dei ponti actomiosinici  $g_1$  e  $g_2$  (in  $s^{-1}$ ) e della massima velocità di stacco  $f_1$  (in  $s^{-1}$ ).

$$g_2 = 2V_{\max}/h$$

$$g_1 = 2wb/ehG$$

$$f_1 = (-g_1 + \sqrt{(g_1^2 + 4g_1g_2)})/2$$

Di conseguenza  $1/g_2$  and  $1/f_1$  rappresentano, rispettivamente, la durata dello stacco e dell'attacco dei ponti trasversi (in s). Un siffatto approccio matematico consente di stimare in corrispondenza del picco di tensione la forza unitaria del singolo ponte,  $\Pi_0$ , il numero di ponti formati,  $\Psi$  ( $10^9 \times \text{mm}^2$ ) e la durata complessiva dell'intero ciclo ( $T_c$ , in ms).

$$\Pi_0 = w/l \times f_1/f_1 + g_1$$

$$\Psi = ab/e(h/2l \times f_1g_1/f_1 + g_1)$$

$$T_c = 1/(h/2c \times f_1g_1/f_1 + g_1)$$

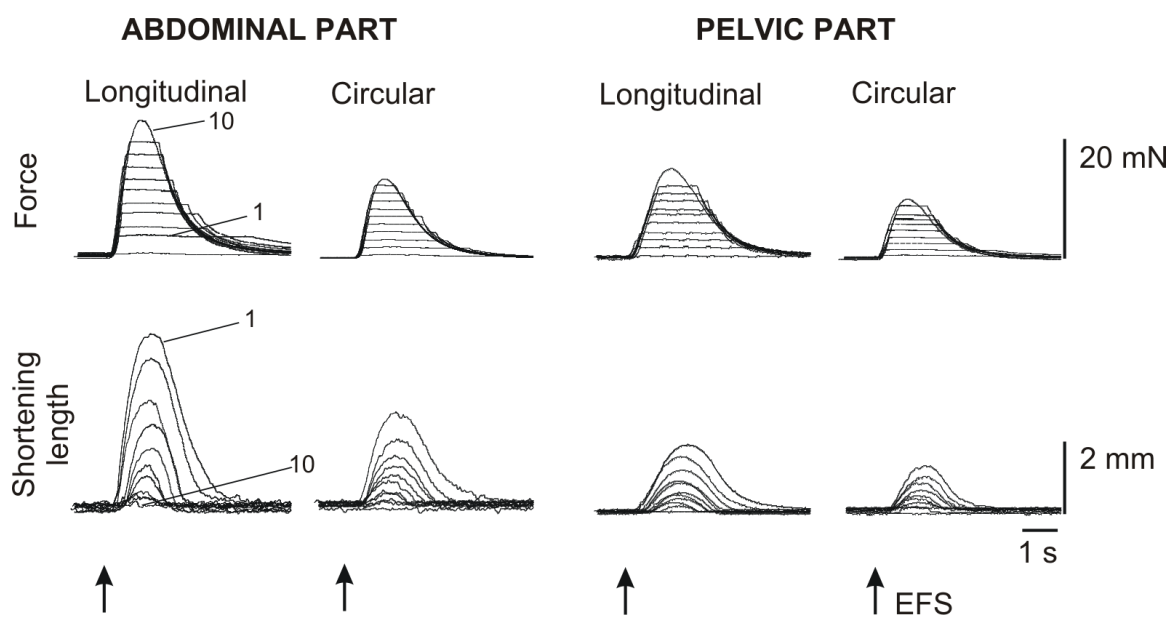
#### **2.1.4 Analisi statistica**

I dati sono stati presentati come valori medi  $\pm$  D.S. La significatività statistica è stata stabilita in base all'Analisi della Varianza (ANOVA). Il valore di  $p < 0.05$  indicava il raggiungimento di significatività statistica. La Regressione Lineare è stata effettuata sulla base del Metodo dei Minimi Quadrati.

### 3. Risultati

#### 3.1 Parametri meccanici ed energetici della muscolatura liscia ureterale

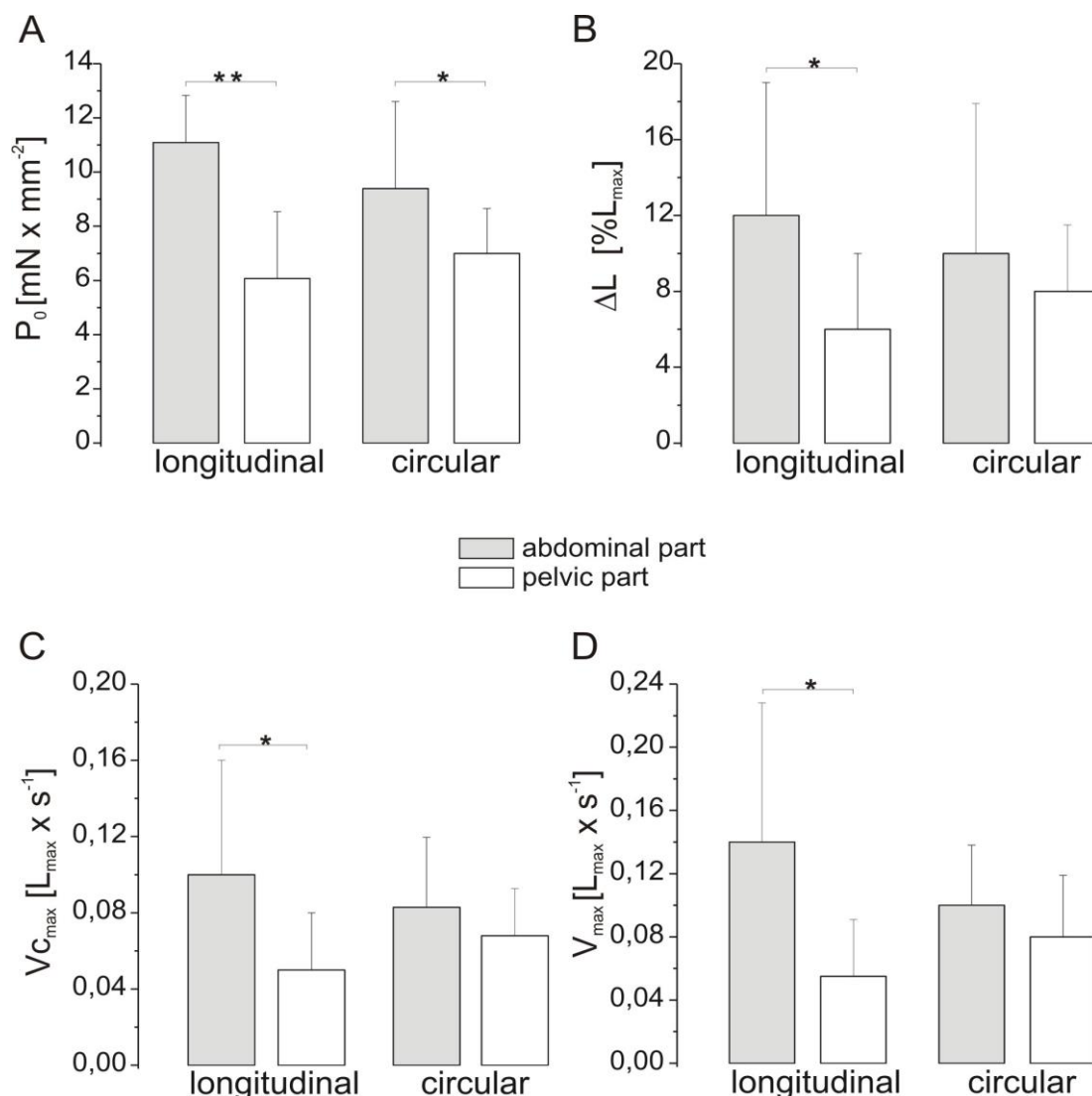
La figura 3.1 riporta rappresentativi tracciati sperimentali, relativi alle onde di forza e di accorciamento di strisce muscolari, longitudinali e circolari, isolate dalla regione addominale e pelvica dell'uretere umano, registrate a vari post-carichi applicati.



**Fig. 3.1.** Registrazioni sperimentali rappresentative. In alto i tracciati delle onde contrattili di forza, in basso i tracciati delle onde contrattili di accorciamento, di strisce longitudinali e circolari della regione addominale e pelvica. Le risposte contrattili, evocate dallo stimolo elettrico, EFS, sono state ottenute a vari post-carichi applicati (1-10) fino al raggiungimento della condizione di isometria.



La figura 3.2 riporta i diagrammi relativi ai parametri meccanici,  $P_0$ ,  $\Delta L$ ,  $V_{c_{max}}$  e  $V_{max}$  di strisce muscolari, longitudinali e circolari, isolate dalla regione addominale e pelvica dell'uretere umano.



**Fig. 3.2.** Parametri meccanici ed energetici di strisce di muscolatura longitudinale e circolare provenienti dalla regione addominale e pelvica dell'uretere umano ottenuti alla  $L_{max}$ . (A): Forza isometrica massima ( $P_0$ ). (B): Accorciamento massimo ( $\Delta L$ ). (C): Massima velocità di accorciamento calcolata a precarico ( $V_{c_{max}}$ ). (D): Massima velocità di accorciamento a carico nullo ( $V_{max}$ ).

$L_{max}$ : lunghezza ottimale del muscolo. I valori sono riportati come medie  $\pm$  D.S. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.001$

La massima forza isometrica delle strisce longitudinali e circolari della regione addominale era significativamente maggiore di quella sviluppata dalle stesse strisce isolate dalla regione pelvica (Fig. 3.2 A). I valori di tale parametro relativi alle strisce longitudinali erano  $11.09 \pm 1.74$  mN x mm<sup>-2</sup> vs  $6.07 \pm 2.47$  mN x mm<sup>-2</sup> ( $n=14$ ,  $p<0.001$ ), rispettivamente per la regione addominale e pelvica, mentre i valori relativi alla muscolatura circolare erano  $9.39 \pm 3.21$  mN

$\times \text{mm}^{-2}$  vs  $7.00 \pm 1.65 \text{ mN} \times \text{mm}^{-2}$  ( $n=14$ ,  $p<0.05$ ), rispettivamente per la regione addominale e pelvica. La muscolatura longitudinale addominale era capace di compiere un accorciamento pari al doppio della muscolatura longitudinale ( $p<0.05$ ), come evidenziato in figura 3.2 B. Il diagramma in figura 3.2 C mostrava, inoltre, come la muscolatura longitudinale addominale si accorciasse con una velocità massima a precarico,  $V_{c_{\max}}$ , superiore del 117% circa ( $p<0.05$ ) rispetto a quella calcolata per la regione pelvica. Questo dato trovava riscontro anche nei risultati relativi alla  $V_{\max}$ , riportati in figura 3.2 D. Le strisce di muscolatura liscia longitudinale provenienti dalla regione addominale dell'uretere umano mostravano una velocità massima di accorciamento a carico nullo significativamente più elevata rispetto a quella calcolata per le strisce muscolari pelviche ( $\sim 154\%$ ,  $p<0.05$ ).

La tabella 3.1 riporta i valori di  $a$  e  $b$ , asintoti dell'iperbole di Hill, di curvatura  $G$ , del massimo lavoro svolto e della massima potenza erogata ad  $L_{\max}$  della regione addominale e pelvica dell'uretere umano.

**Tabella 3.1.** Parametri meccanici ed energetici di strisce di muscolatura longitudinale e circolare della regione addominale e pelvica dell'uretere umano.

	longitudinal		circular	
	<i>abdominal</i>	<i>pelvic</i>	<i>abdominal</i>	<i>pelvic</i>
$a$ ( $\text{mN} \times \text{mm}^{-2}$ )	$4,83 \pm 1,42$	$4,45 \pm 1,11$	$4,04 \pm 0,83$	$4,18 \pm 1,09$
$b$ ( $L_{\max} \times \text{s}^{-1}$ )	$0,08 \pm 0,035$	$0,11 \pm 0,037^*$	$0,11 \pm 0,039$	$0,16 \pm 0,21^*$
$G$	$2,94 \pm 1,39$	$1,23 \pm 0,65^*$	$2,04 \pm 0,69$	$1,19 \pm 0,56^*$
$W_{\max}$ ( $\text{mJ} \times \text{mm}^{-2} \times L_{\max}^{-1}$ )	$0,21 \pm 0,14$	$0,07 \pm 0,06^*$	$0,16 \pm 0,12$	$0,09 \pm 0,03^*$
$P_{\text{output}}$ ( $\text{mW} \times \text{mm}^{-2} \times L_{\max}^{-1}$ )	$0,17 \pm 0,11$	$0,05 \pm 0,04^*$	$0,13 \pm 0,07$	$0,07 \pm 0,02^*$

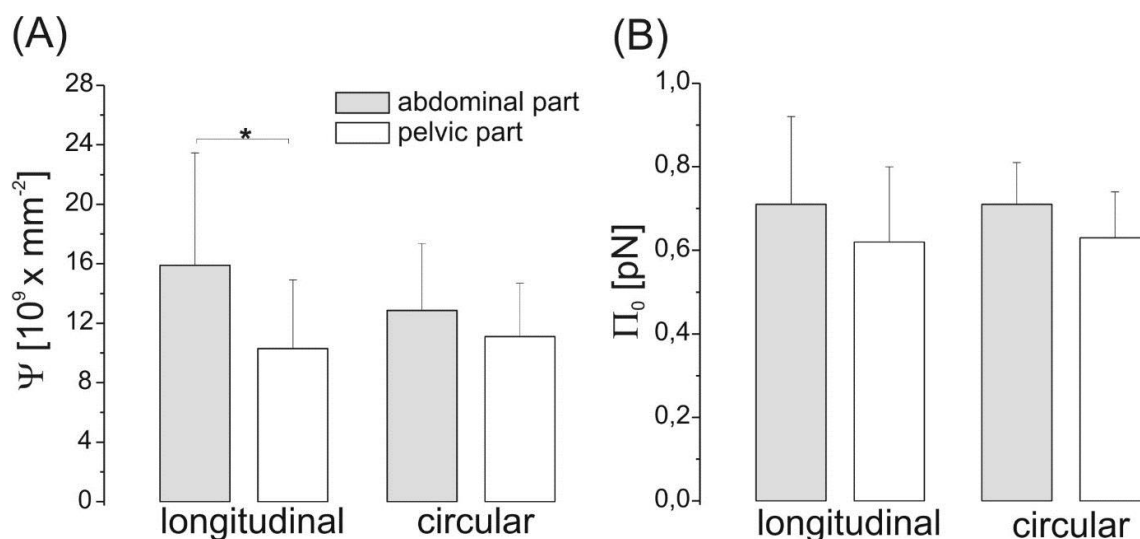
I dati sono presentati come media  $\pm$  D.S.  $a$  e  $b$ : asintoti dell'iperbole di Hill;  $G$ : valore della curvatura dell'iperbole;  $W_{\max}$ : massimo lavoro meccanico ad  $L_{\max}$ ;  $P_{\text{output}}$ : massima potenza ad  $L_{\max}$ . \*;  $p<0.05$

La costante  $b$  di Hill, che ha le dimensioni di una velocità ed è una stima, appunto, della velocità con la quale viene liberata l'energia necessaria all'accorciamento, era minore nella

regione addominale, in entrambi i tipi di strisce muscolari ( $p < 0.05$ ). Il parametro  $G$ , associato alla curvatura dell'iperbole, era maggiore in entrambi i preparati muscolari prelevati dalla regione addominale dell'uretere umano rispetto a quelli isolati dalla regione pelvica ( $p < 0.05$ ). L'intera regione addominale svolgeva, inoltre, un lavoro massimo,  $W_{\max}$ , significativamente maggiore rispetto all'intera regione pelvica, erogando nel contempo anche una potenza massima,  $P_{\text{output}}$ , significativamente più alta.

### 3.2 Meccanica e cinetica dei ponti trasversi

Come si può osservare in figura 3.3 A, le strisce longitudinali della regione addominale, in condizioni di sviluppo di massima forza isometrica, formavano un numero di ponti trasversi per  $\text{mm}^2$  ( $\Psi$ ) significativamente maggiore rispetto alle strisce longitudinali della regione pelvica ( $p < 0.05$ ).

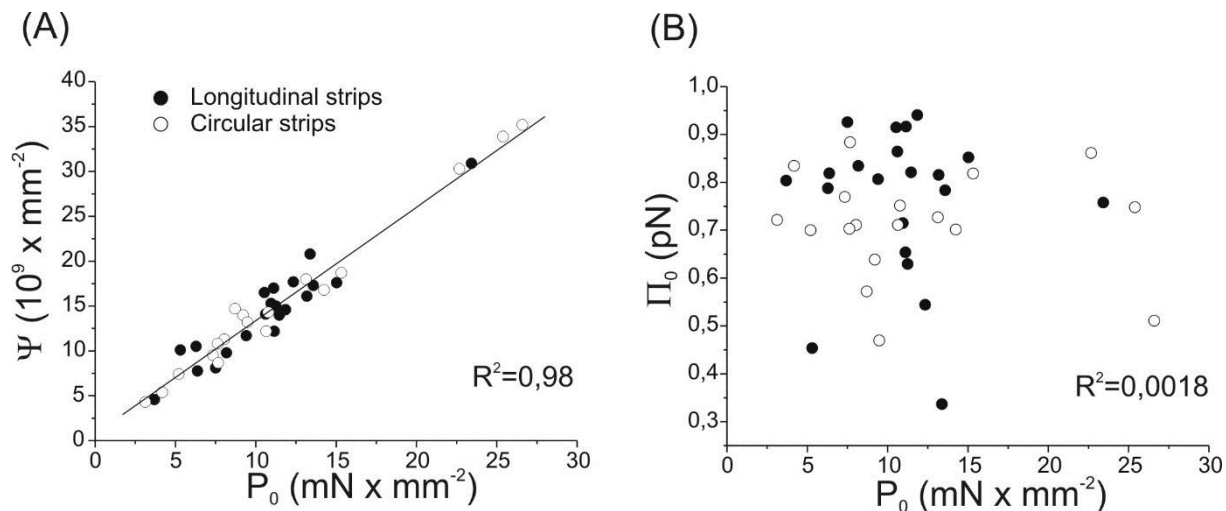


**Fig. 3.3.** (A): numero totale di ponti trasversi ( $\Psi$ ) per  $\text{mm}^2$  al picco di tensione; (B): forza unitaria del singolo ponte trasverso ( $\Pi_0$ ) calcolati nelle strisce longitudinali e circolari della regione addominale e pelvica dell'uretere umano. I valori sono riportati come medie  $\pm$  D.S. \*:  $p < 0.05$

Non si sono, invece, osservate differenze regionali per quanto concerneva la forza elementare sviluppata dal singolo ponte actomiosinico ( $\Pi_0$ ), come si evince dalla figura 3.3 B.

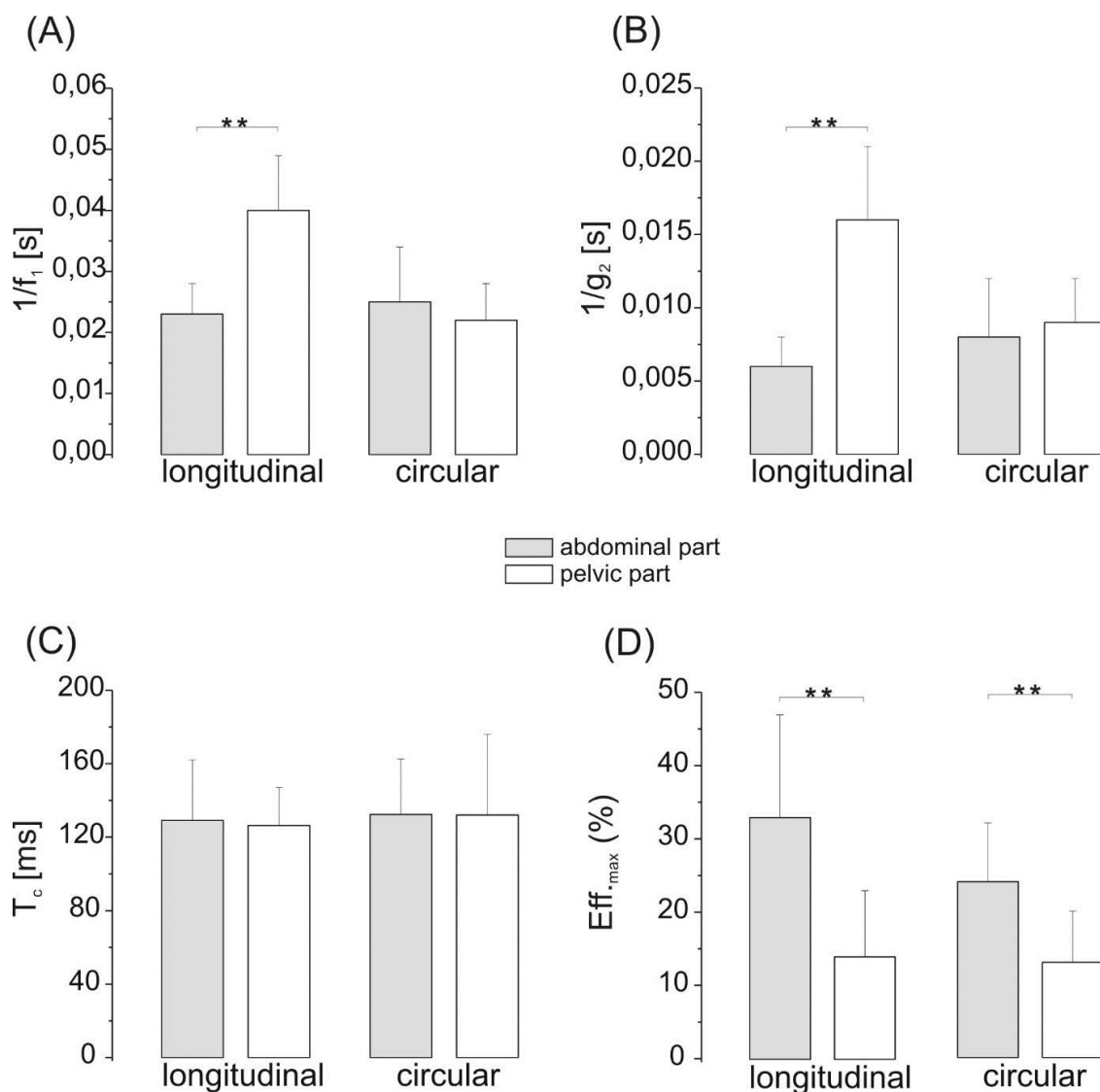
Lo studio di correlazione, rappresentato graficamente in figura 3.4, ha evidenziato che tra la massima forza isometrica sviluppata dal muscolo,  $P_0$ , ed il numero di ponti actomiosinici

formati per  $\text{mm}^2$  di tessuto attivo,  $\Psi$ , esisteva una forte relazione lineare ( $R^2 = 0.98$ ,  $p < 0.001$ ; Fig. 3.4 A), mentre non ha rilevato alcuna correlazione tra  $P_0$  e la forza unitaria del singolo ponte,  $\Pi_0$ , ( $R^2 = 0.0018$ ; Fig. 3.4 B).



**Fig. 3.4.** (A): Studio di correlazione tra la massima forza isometrica ( $P_0$ ) ed il numero di ponti trasversi ( $\Psi \times 10^9$ ) di strisce longitudinali e circolari di uretere umano; (B): Studio di correlazione tra la massima forza isometrica ( $P_0$ ) e la forza unitaria del singolo ponte ( $\Pi_0$ ) di strisce longitudinali e circolari di uretere umano.

La figura 3.5 riporta la durata delle fasi di attacco,  $1/f_1$ , e di stacco,  $1/g_2$ , delle teste miosiniche dal filamento actinico, la durata totale del ciclo dei ponti trasversi,  $T_c$ , nonché l'efficienza massima,  $\text{Eff.}_{\text{max}}$ , dell'evento contrattile. Come si osserva dai diagrammi, le strisce longitudinali della regione addominale mostravano una cinetica significativamente maggiore di quelle isolate dalla regione pelvica; infatti, i valori di  $1/f_1$  (Fig. 3.5 A) e di  $1/g_2$  (Fig. 3.5 B) erano rispettivamente:  $0.023 \pm 0.005$  s vs  $0.04 \pm 0.009$  s ( $p < 0.001$ ) e  $0.006 \pm 0.003$  s vs  $0.016 \pm 0.005$  s ( $p < 0.001$ ). La durata totale dell'intero ciclo,  $T_c$ , era simile in entrambe le regioni ureterali (Fig. 3.5 C). Come mostrato in figura 3.5 D, l'efficienza massima,  $\text{Eff.}_{\text{max}}$ , risultava significativamente maggiore ( $p < 0.001$ ) nella regione addominale rispetto alla regione pelvica, sia per quanto riguardava le strisce longitudinali che quelle circolari.



**Fig. 3.5** (A): durata dell'attacco dei ponti trasversi ( $1/f_1$ ); (B): durata dello stacco dei ponti trasversi ( $1/g_2$ ); (C): durata totale dell'intero ciclo dei ponti trasversi ( $T_c$ ); (D): massima efficienza meccanica ( $Eff_{max}$ , in %). Parametri calcolati nelle strisce longitudinali e circolari della regione addominale e pelvica dell'uretere umano. I valori sono riportati come medie  $\pm$  D.S. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.001$

#### **4. Discussione**

Il regolare trasporto dell'urina dai reni alla vescica risulta compromesso dall'instaurarsi di stati patologici responsabili di modificazioni funzionali legate alle proprietà attive e passive della muscolatura liscia costituente la parete dell'uretere umano. La conoscenza degli aspetti fisiologici riguardanti la biomeccanica della muscolatura liscia ureterale rappresenta, quindi, il presupposto necessario per garantire in ambito clinico l'effettuazione di scelte terapeutiche sempre più specifiche e mirate.

Se è vero che in soggetti sani l'origine e la modulazione dell'attività peristaltica ureterale, in termini di frequenza ed ampiezza delle onde di contrazione, dipende dall'entità dello stiramento rilevato a livello della pelvi, è facilmente comprensibile come un'alterata percezione di questo stimolo possa tradursi in un'anomala risposta meccanica dell'intero organo e, quindi, in una diuresi inefficace.

Il nostro studio ha rappresentato un tentativo di ottenere un quadro completo delle caratteristiche biomeccaniche dell'uretere umano, sia a livello dell'intero organo che a livello dell'apparato contrattile subcellulare.

Sebbene non siano rilevabili lungo tutto l'uretere umano differenze sostanziali di tipo strutturale, istologico e biochimico [49, 50, 51], i risultati della presente ricerca hanno messo in evidenza che, dal punto vista biomeccanico, la regione addominale presentava, rispetto a quella pelvica, una massima forza isometrica più elevata, un accorciamento ed una velocità di accorciamento a precarico maggiori, nonché una velocità di accorciamento a carico nullo anch'essa più elevata. Tali evidenze, meccaniche e cinetiche, si traducevano in un lavoro meccanico superiore ed in una maggiore erogazione di potenza. In condizioni fisiologiche queste peculiari caratteristiche biomeccaniche della parete ureterale assicurano, sempre, la rapida progressione del bolo urinario fino in vescica. Questi dati sono in accordo con quanto riportato da altri autori, sul ruolo principale della muscolatura longitudinale nella genesi della

peristalsi ureterale [52, 53]. Inoltre, anche nel cane è stato osservato che la porzione prossimale dell'uretere sviluppava una forza contrattile maggiore rispetto a quella distale [54]. La migliore prestazione contrattile della regione addominale era confermata, nel nostro studio, anche dal più alto valore della costante  $b$  di Hill, che restituisce una stima della velocità con cui viene liberata l'energia durante l'accorciamento. D'altra parte il valore di  $G$ , che esprime l'economia con cui si realizza l'accorciamento muscolare, suggeriva che l'attività contrattile della regione addominale si verificasse con un minore dispendio energetico, dal momento che, più elevato è il valore di  $G$ , maggiore è l'economicità della contrazione. Tale risultato era rafforzato dall' $\text{Eff.}_{\max}$  che risultava maggiore nella regione addominale. In conclusione, appariva che la muscolatura liscia ureterale addominale fosse più pronta nel rispondere allo stimolo e lo facesse con un ridotto dispendio di energia rispetto alla regione pelvica.

Per valutare se le differenze riscontrate nell'attività contrattile delle due regioni ureterali fossero attribuibili a differenze esistenti a livello del macchinario contrattile subcellulare, i parametri meccanici sperimentalmente ottenuti hanno costituito i dati d'ingresso nelle equazioni del formalismo matematico di Huxley [44], che mette in relazione le caratteristiche biomeccaniche del muscolo con quelle dei motori molecolari actomiosinici. Tale formalismo matematico è in grado di fornire informazioni inerenti il numero di ponti trasversi, la loro forza unitaria, le loro costanti cinetiche, nonché la durata complessiva dell'intero ciclo dei ponti trasversi [43, 55]. Secondo la teoria della contrazione esposta da Huxley, ciascun ponte trasverso agisce come un generatore di forza autonomo, per cui la forza complessivamente sviluppata da un muscolo dipende sia dal numero totale di ponti actomiosinici formati che dalla forza elementare sviluppata da ogni ponte [43, 44, 45, 56]. L'ipotesi che la maggiore forza isometrica massima osservata nella regione addominale rispetto a quella pelvica potesse dipendere da differenze riscontrabili nelle interazioni actomiosiniche, ha trovato conferma nel maggior numero di ponti trasversi formati nelle fibre longitudinali di questa regione. I nostri

risultati, tuttavia, non hanno rivelato alcuna differenza significativa per quanto riguardava la forza unitaria del singolo ponte, qualunque fosse l'orientamento delle fibre ed indipendentemente dalla regione ureterale esaminata. Era, quindi, facilmente deducibile che la maggiore  $P_0$  registrata nelle strisce longitudinali della regione addominale fosse una conseguenza del più alto numero di ponti trasversi formati per  $\text{mm}^2$  di tessuto attivo.

La velocità con la quale un muscolo si accorcia dipende dalla rapidità con la quale all'interno del comparto intracellulare le teste miosiniche legano il filamento actinico, lo fanno slittare verso l'interno del sarcomero e poi si staccano, per cominciare un nuovo ciclo. Più rapida è la cinetica con la quale operano i motori molecolari miosinici, maggiore risulta essere la velocità di accorciamento del muscolo. Infatti, a fronte di una maggiore velocità di accorciamento, la muscolatura liscia longitudinale della regione addominale mostrava una migliore cinetica già a livello molecolare, come confermato dalle durate, significativamente più brevi, delle costanti cinetiche di attacco ( $1/f_1$ ) e stacco ( $1/g_2$ ) dei ponti trasversi.

Nonostante la durata dell'intero ciclo,  $T_c$ , sia risultata simile per entrambe le regioni, indipendentemente dall'orientamento delle strisce, è la durata della fase di stacco della miosina dall'actina,  $1/g_2$ , più che la durata complessiva di  $T_c$ , quella critica nel determinare la massima velocità di accorciamento del muscolo [43].

Una completa conoscenza delle caratteristiche anatomiche, fisiologiche e biomeccaniche della muscolatura liscia ureterale umana è determinante in condizioni patologiche, congenite o acquisite, per indirizzare verso scelte terapeutiche più corrette e mirate e per garantire un'azione selettiva sulla muscolatura liscia dell'organo, incrementando l'efficacia terapeutica.

Il danno renale associato ad urolitiasi è, per esempio, il risultato di una sequenza di eventi fisiopatologici la cui causa iniziale è dipendente dall'ostruzione del lume ureterale; l'evento ostruttivo, che può essere parziale o totale, dipende da fattori meccanici legati, per la maggior parte, alla ciclica alternanza tra contrazione e rilasciamento muscolare. Un uretere



cronicamente ostruito mostra anomalie nella capacità di sviluppare forza contrattile attiva ed alterazioni della tensione passiva, che influenzano la pressione idrostatica alla quale le pareti dell'organo sono soggette. Tale condizione determina, normalmente, un'azione propulsiva inefficace [57] con sviluppo di onde peristaltiche così piccole in ampiezza da non garantire la coaptazione delle pareti ureterali, la cui naturale conseguenza è la riduzione della diuresi.

Attualmente, l'urolitiasi, che si instaura principalmente nella regione pelvica, è trattata mediante somministrazione di  $\alpha 1$ -litici, il cui utilizzo nella pratica clinica era, inizialmente, dettato più dall'esperienza e dall'osservazione del medico piuttosto che dall'esistenza di veri protocolli scientifici. Più recentemente è stato dimostrato che nell'uretere umano esiste un gradiente noradrenergico crescente, dalla regione addominale verso quella pelvica, dove è stata, infatti, osservata una maggiore espressione di recettori  $\alpha 1$ -adrenergici [58].

È interessante constatare che la regione addominale dell'uretere umano, che secondo i nostri dati era quella che presentava fisiologicamente la migliore performance meccanica, fosse anche quella che, secondo la letteratura scientifica, subiva la minore modulazione noradrenergica.

Pertanto, la nostra interpretazione dei dati è che, in presenza di un'ostruzione conseguente ad urolitiasi, l'effetto miorilassante della terapia con  $\alpha 1$ -litici, più marcato nella regione pelvica, unito alla maggiore azione propulsiva della regione addominale, meno antagonizzata, favorirebbe l'espulsione rapida del calcolo ed il ripristino della normale peristalsi ureterale.

Le nuove osservazioni sulle caratteristiche biomeccaniche delle due regioni ureterali, messe in evidenza da questa ricerca, potrebbero rappresentare un nuovo punto di partenza per lo sviluppo di nuove tecniche chirurgiche sempre meno invasive e l'individuazione di nuovi materiali più specifici e biocompatibili, da utilizzare come stent ureterali nella chirurgia ricostruttiva. In questo campo sono già stati proposti diversi sostituti ureterali, tra cui i vasi sanguigni, le tube di Falloppio e l'appendice; tuttavia, queste soluzioni e le corrispondenti

procedure chirurgiche sono correlate ad un'elevata morbilità (reflusso ileo-ureterale, stenosi nella sede dell'anastomosi uretero-ileale ed infezioni ricorrenti) con compromissione della funzionalità renale per molti pazienti. Attualmente, la sostituzione parziale o completa di una porzione del condotto ureterale con tessuti biologici rimane una procedura indicata solo come trattamento secondario.

## 5. Bibliografia

- [1] Le Gros Clark WE, 1958: *The tissues of the body, an introduction to the study of anatomy*, Oxford, Clarendon Press, 264-65.
- [2] Chambers R and Renyi GS, 1925: The structure of cells in tissues as revealed by microdissection. The physical relationships of the cells in epithelia. *Am. J. Anat.* 35:385-402.
- [3] Kuriyama H and Tomita T, 1970: The action potential of the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli and ureter studied by the double sucrose gap method. *J. Gen.Physiol.* 55 (2): 147-62.
- [4] Zawalinski VC, Constantinou CE and Burnstock G, 1975: Ureteral pacemakers potentials recorded with the sucrose gap technique. *Experientia.* 31 (8): 931-33.
- [5] Hannappel J and Golenhofen K, 1974: Comparative studies on normal ureteral peristalsis in dogs, guinea-pigs and rats. *Pflugers Arch.* 348 (1): 65-76.
- [6] Bozler E, 1942: The activity of the pacemaker previous of the discharge of a muscular impulse. *Am.J.Physiol.* 136: 543-52.
- [7] Weiss RM, Wagner ML and Hoffman BF, 1967: Localization of pacemaker for peristalsis in the intact canine ureter. *Invest. Urol.* 5:42.
- [8] Constantinou CE, Silvert MA and Gosling J, 1967: Pacemaker system in the control of ureteral peristaltic rate in the multicalyceal kidney of the pig. *Invest Urol.* 14 (6): 440-1.
- [9] Gosling JA and Dixon JS, 1974: Species variation in the location of upper urinary tract pacemaker cells. *Investigative Urology.* 11: 418-23.
- [10] Lammers WJ, Ahmad HR and Arafat K, 1996: Spatial and temporal variations in pacemaking and conduction in the isolated renal pelvis. *Am J Physiol.* 270 (4 Pt 2): F567-74.

- [11] Lang RJ, Exintaris B, Teele ME, Harvey J and Klemm MF, 1998: Electrical basis of peristalsis in the mammalian upper urinary tract. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 25 (5): 310-21.
- [12] Tsuchida S, Morita T, Harada T and Kimura Y, 1981: Initiation and propagation of canine renal pelvic peristalsis. *Urol Int.* 36 (5): 307-14.
- [13] Lang RJ, Takano H, Davidson ME, Suzuki H and Klemm MF, 2001: Characterization of the spontaneous electrical and contractile activity of smooth muscle cells in the rat upper urinary tract. *J Urol.* 166 (1): 329-34.
- [14] Dewey MM and Barr L, 1962: Intercellular Connection between Smooth Muscle Cells: the Nexus. *Science* 137 (3531): 670-2.
- [15] Barr L, Berger W and Dewey MM, 1968: Electrical transmission at the nexus between smooth muscle cells. *J Gen Physiol.* 51 (3): 347-68.
- [16] Santicioli P and Maggi CA, 2000: Effect of 18beta-glycyrrhetic acid on electromechanical coupling in the guinea-pig renal pelvis and ureter. *Br J Pharmacol.* 129 (1): 163-9.
- [17] Santicioli P and Maggi CA, 1998: Myogenic and neurogenic factors in the control of pyeloureteral motility and ureteral peristalsis. *Pharmacol Rev.* 50 (4): 683-722.
- [18] Osman F, Romics I, Nyirády P, Monos E and Nádasy GL, 2009: Ureteral motility. *Acta Physiologica Hungarica* 96 (4): 407-26.
- [19] Andersson KE, 2011: Muscarinic acetylcholine receptors in the urinary tract. *Handb Exp Pharmacol.* (202): 319-44.
- [20] Hernández M, Prieto D, Simonsen U, Rivera L, Barahona MV and García- Sacristán A, 1992: Noradrenaline modulates smooth muscle activity of the intravesical ureter through different types of adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 107: 924-31.

- [21] Patacchini R, Santicioli P, Zagorodnyuk V, Lazzeri M, Turini D and Maggi CA, 1998. Excitatory motor and electrical effects produced by tachykinins in the human and guinea-pig isolated ureter and guinea-pig renal pelvis. *Br J Pharmacol.* 125 (5): 987-96.
- [22] Maggi CA, Giuliani S, Meini S and Santicioli P, 1995. Calcitonin gene related peptide as inhibitory neurotransmitter in the ureter. *Can J Physiol Pharmacol.* 73 (7): 986-90.
- [23] Maggi CA, Giuliani S, Santicioli P, Abelli L and Meli A, 1987. Visceromotor responses to CGRP in the rat lower urinary tract: Evidence for a transmitter role in the capsaicin-sensitive nerves of the ureter. *Eur J Pharmacol.* 143: 78-87.
- [24] Maggi CA, Theodorsson E, Santicioli P and Giuliani S, 1992. Tachykinins and CGRP as co-transmitters in local motor responses produced by sensory nerve activation in the guinea-pig isolated renal pelvis. *Neuroscience* 46: 549-59.
- [25] Poyner DR, 1992: CGRP: Multiple actions, multiple receptors. *Pharmacol Ther* 56: 23-51.
- [26] Edyvane KA, Smet PJ, Trussel DC, Jonavicius J, Henwood A and Marshall VR, 1992: Presence and regional variations in peptide-containing nerves in the human ureter. *J Auton Nerv Syst* 48: 241-45.
- [27] Edyvane KA, Smet PJ, Trussell DC, Jonavicius J and Marshall VR, 1994. Patterns of neuronal colocalisation of tyrosine hydroxylase, neuropeptide Y, vasoactive intestinal polypeptide, calcitonin gene-related peptide and substance P in human ureter. *J Auton Nerv Syst.* 48 (3): 241-55.
- [28] Ganitkevich VY and Isenberg G, 1995: Efficacy of peak  $Ca^{2+}$  currents (ICa) as a trigger of sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  release in myocytes from the guinea-pig coronary artery. *J of Physiol.* 484: 287-306.

- [29] Kamishima T and McCarron JG, 1996: Depolarization-evoked increase in cytosolic calcium concentration in isolated smooth muscle cells in rat portal vein. *J of Physiol.* 492: 61-74.
- [30] Taggart MJ and Wray S, 1998: Contribution of sarcoplasmic reticular calcium to smooth muscle contractile activation: gestational dependence in isolated rat uterus. *J of Physiol.* 511: 133-44.
- [31] Weiss RM, Bassett AL and Hoffman BF, 1972: Dynamic length-tension curves of cat ureter. *Am J Physiol.* 222: 388-93.
- [32] Yin FC and Fung YC, 1971: Mechanical properties of isolated mammalian ureteral segments. *Am J Physiol.* 221 (5): 1484-93.
- [33] Lang RJ, Davidson ME and Exintaris B, 2002: Pyelo-ureteral motility and ureteral peristalsis: essential role of sensory nerves and endogenous prostaglandins. *Exp Physiol.* 87: 129-46.
- [34] Santicioli P and Maggi CA, 1998. Myogenic and Neurogenic Factors in the control of pyeloureteral motility and ureteral peristalsis. *Pharmacological Reviews* 50: 683-721.
- [35] Thulesius O, Angelo-Khattar M and Sabha M, 1989: The effect of ureteral distension on peristalsis. *Urol Res.* 17: 385-8.
- [36] Biancani P, Onyski JH, Zabinski MP and Weiss RM, 1984: Force-velocity relationships of guinea pig ureter. *J Urol.* 131 (5): 988-91.
- [37] Biancani P, Hausman M and Weiss RM, 1982: Effect of obstruction on ureteral circumferential force-length relations. *Am J Physiol.* 243 (2): F204-10.
- [38] Rose JG and Gillenwater JY, 1973: Pathophysiology of ureteral obstruction. *Am J. Physiol.* 225 (4): 830-7.

- [39] Pagano F and Passerini G, 1977: Primary obstructed megaureter. *Br J Urol.* 49 (6): 469-75.
- [40] Tokunaka S, Kojanagy T, Tsuji I and Yamada T, 1982: Histopathology of the nonrefluxing megaureter: a clue to its pathogenesis. *J Urol.* 127 (2): 238-44.
- [41] Sripathi V, King PA, Thompson MR and Bogle MS, 1991: Primary obstructive megaureter. *J Pediatr Surg.* 26 (7): 826-9.
- [42] Bomalaski MD and Bloom DA, 1997: Urodynamics and massive vesicoureteral reflux. *J Urol.* 158 (3 Pt 2): 1236-8.
- [43] Blanc FX, Coirault C, Salmeron S, Chemla D and Lecarpentier Y, 2003: Mechanics and cross-bridge kinetics of tracheal smooth muscle in two inbred rat strains. *Eur Respir J.* 22: 227-34.
- [44] Huxley AF, 1957: Muscle structure and theories of contraction. *Prog Biophys Biophys Chem.* 7: 255–318.
- [45] Lecarpentier Y, Blanc FX, Salmeron S, Pourny JC, Chemla D and Coirault C, 2002: Myosin cross-bridge kinetics in airway smooth muscle: a comparative study of humans, rats, and rabbits. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 282: L83-L90.
- [46] Hill AV, 1938: The heat of shortening and the dynamic constant of muscle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 126: 136–95.
- [47] Woledge RC, Curtin NA and Homsher E, 1985. Energetic aspects of muscle contraction. *Monogr Physiol Soc.* 41: 1-357.
- [48] Coirault C, Chemla D, Péry-man N, Suard I and Lecarpentier Y, 1995: Effects of fatigue on force-velocity relation of diaphragm: energetic implications. *Am J Respir Crit Care Med.* 151: 123–8.

- [49] Aragona F, Artibani W, De Caro R, Pizzarella M and Passerini G, 1988: The morphological basis of ureteral peristalsis. An ultrastructural study of the rat ureter. *Int Urol Nephrol*.20 (3): 239-50.
- [50] Gosling JA, 1970: The musculature of the upper urinary tract. *Acta Anat*.75: 408-22.
- [51] Notley Richard G, 1971: The structural basis for normal and abnormal ureteric motility: The innervations and musculature of the human ureter. *Ann Roy Coll Surg Engl*. 49: 250-67.
- [52] Osman F, Nádasy GL, Monos E, Nyirády P and Romics I, 2009: A novel videomicroscopic technique for studying rat ureteral peristalsis in vivo. *World J Urol*. 27: 265-70.
- [53] Pal A and Brasseur JG, 2002: The mechanical advantage of local longitudinal shortening on peristaltic transport. *J Biomech Eng*.124 (1): 94-100.
- [54] Yin FC and Fung YC, 1971: Mechanical properties of isolated mammalian ureteral segments. *Am J Physiol*. 221 (5): 1484-93.
- [55] Hai CM and Murphy RA, 1988: Regulation of shortening velocity by cross-bridge phosphorylation in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 255: C86-C94.
- [56] Blanc FX, Langeron O, Coirault C, Salmeron S, Lambert F, Riou B and Lecarpentier Y, 2004: Mechanical properties of tracheal smooth muscle are impaired in the rabbit with experimental cardiac pressure overload. *Chest* 125 (1): 236-42.
- [57] Rosen JG and Gillewater JY, 1973: Pathophysiology of ureteral obstruction. *Am J Physiol*. 225: 830-7.
- [58] Sigala S, Dellabella M, Milanese G, Fornari S, Faccoli S, Palazzolo F, Peroni A, Mirabella G, Cunico SC, Spano P and Muzzonigro G, 2005: Evidence for the presence of alpha1 adrenoceptor subtypes in the human ureter. *Neurourol Urodyn*. 24 (2): 142-8.