

Studio della disautonomia cardiaca silente mediante monitoraggio ambulatorio della pressione arteriosa: diagnosi tramite la scomparsa del ritmo circadiano della frequenza cardiaca nei pazienti con diabete mellito tipo 1

P. Cugini^{1*}, S. Amato, G. Tarquini, S. Mercuri, I. Turinese, A. Tego, M. Rossetti, D. Panetti, T. Filardi, M. Curione, S. Morano

Dipartimento di Scienze Cliniche, Università "Sapienza", Roma, Italia

Riassunto

Introduzione. Il diabete mellito (DM) può indurre una compromissione del sistema neurovegetativo (SNV), convenzionalmente e non invasivamente diagnosticata per mezzo dei test di Ewing e l'analisi della variabilità della frequenza cardiaca (HRV). È ben noto che il SNV è fisiologicamente responsabile (attraverso orologi biologici) della regolazione dei Ritmi Circadiani (RC) che caratterizzano la maggioranza delle funzioni biologiche. Pertanto, questo studio è volto a investigare i RC della Frequenza Cardiaca (FC) e della Pressione Arteriosa (PA), nel DM postulando che la diagnosi di Disautonomia Cardiaca Silente (DCS) possa essere facilitata dal rilevamento di alcuni anomali cambiamenti ritmometrici, compreso il peggiore, cioè la scomparsa, di un RC.

Materiali e Metodi. Lo studio è stato compiuto su 30 soggetti clinicamente sani, 10 pazienti con DM1 e 30 pazienti con DM2, che sono stati sottoposti al monitoraggio ambulatorio della pressione arteriosa (MAPA), raccogliendo i dati equidistantemente ogni 30 minuti, in condizioni standardizzate di stile di vita. I valori di PA sistolica (PAS), diastolica (PAD) e FC in ciascun gruppo sono stati analizzati mediante: 1. analisi statistica convenzionale della loro variabilità intragiornaliera; 2. analisi cronobiologica (metodo Cosinor) del loro RC.

Risultati. L'analisi convenzionale ha mostrato che, sia nei soggetti normali che nei pazienti con DM1 e DM2, entrambi la FC e la PA mostrano una significativa variabilità intragiornaliera ($p < 0,001$). L'analisi cronobiologica ha mostrato che nei soggetti normali e nei pazienti con DM2 sia la FC che la PA mostrano un significativo RC ($p < 0,001$); viceversa nei pazienti con DM1 la FC è caratterizzata da un RC non significativo ($p = 0,124$), nonostante la PAS e la PAD mantengano un significativo RC ($p < 0,001$).

Conclusioni. La scomparsa del RC della FC nei pazienti con DM1 rivela il coinvolgimento dell'orologio biologico neurovegetativo che selettivamente controlla il RC della FC, come è dimostrato dal rilievo fisiopatologico di una desincronizzazione interna tra i RC della FC e della PA. La perdita selettiva del RC della FC nei pazienti con DM1 porta a concludere che il MAPA, insieme con la sua analisi Cosinor, possa essere una tecnica pratica, ripetibile, a basso costo e a basso rischio per diagnosticare la DCS, almeno nei pazienti con DM1. *Clin Ter 2010; 161(1):e1-e10*

Parole chiave: metodo Cosinor, desincronizzazione interna, disautonomia cardiaca silente, frequenza cardiaca, malattia diabetica, ritmo circadiano, pressione arteriosa diastolica, pressione arteriosa sistolica, sistema neurovegetativo

Abstract

Diagnosing silent cardiac dysautonomia via ambulatory blood pressure monitoring: early diagnosis shown by the lack of heart rate circadian rhythm in type 1 diabetes mellitus

Introduction. Diabetes mellitus (DM) can be complicated by an involvement of Neurovegetative System (NVS), conventionally and non-invasively diagnosed by the means of Ewing's test and Heart Rate Variability (HRV) analysis. It is well known that the NVS is physiologically responsible, via biological clocks, for the regulation of Circadian Rhythms (CR) characterizing the majority of biological functions. Therefore, this study is aimed at investigating the CR of Heart Rate (HR) and Blood Pressure (BP) in DM, postulating that the diagnosis of Silent Cardiac Dysautonomia (SCD) could be facilitated by detecting anomalous rhythmometric changes, including the worse one, i.e., the lose of a CR.

Materials and Methods. The study has been performed on 30 clinically healthy subjects (CHS), 10 patients with DM1 and 30 patients with DM2, who underwent an ambulatory BP monitoring (ABPM) collecting data equidistantly every 30 minutes, under standardized conditions of lifestyle. The group specific monitored values of systolic (S), diastolic (D) BP, as well as HR have been analyzed via: 1. a conventional analysis of their intradiem variability; 2. a chronobiometric analysis (Cosinor method) of their CR.

Results. The conventional analysis disclosed that in CHS, DM1 and DM2, both the HR and BP show an intradiem variability that is significant ($p < 0.001$). The chronobiological analysis showed that in CHS and DM2, both the HR and BP show a significant CR ($p < 0.001$), viceversa in DM1 HR is characterized by a non significant CR ($p = 0.124$), notwithstanding that the SBP and DBP maintain a significant CR ($p < 0.001$).

Conclusions. The disappearance of HR CR in DM1 reveals the involvement of neurovegetative biological clock that selectively controls the HR CR, as it is demonstrated by the pathophysiological finding of an internal desynchronization between the HR and BP CR. The selective lose of HR CR in DM1 leads to conclude that the ABPM, along with its Cosinor analysis, might be a practical, repeatable, low cost, low risk technique for diagnosing the SCD, at least in DM1. *Clin Ter 2010; 161(1):e1-e10*

Key words: circadian rhythm, cosinor method, diabetic disease, diastolic blood pressure, heart rate, internal desynchronization, neurovegetative system, silent cardiac dysautonomia, systolic blood pressure

* Professore fuori ruolo

Corrispondenza: Prof. Mario Curione. Dipartimento di Scienze Cliniche, Policlinico Umberto I, Università "Sapienza", Roma, Italia. Tel. +39.06.4997.0331. E-mail: mario.curione@uniroma1.it

Introduzione

Il Sistema Neurovegetativo (SNV) degli esseri umani si compone strutturalmente di centri del sistema nervoso centrale, di gangli (nodi) e di fibre nervose reperibili del sistema nervoso periferico: metaspinali, paragangliari e intramurali.

La fisiologia tradizionale attribuisce al SNV la capacità di regolare le funzioni involontarie degli organi viscerali, in particolare di quelli che hanno una qualche attività elettro-meccanica. Di queste funzioni, il SNV regola la cadenza elettro-motoria in condizioni di attività fisiologica sia spontanea che in risposta a condizioni di carattere stimolatorio o inibitorio, anche da stress (1).

Meno noto, ma non per questo meno importante, è il fatto che il SNV esplica un'importante regolazione di tipo ritmico sulle attività elettro-meccaniche degli organi che hanno questa prerogativa di motricità (2). Questa funzione di controllo cronobiologico è esercitata da strutture neurovegetative chiamate "Orologi (Oscillatori) Biologici" o "Pacemakers" (3), "Entraining Agents" (4), "Donatori di Ritmo - Zeitgebers" (5, 6), "Sincronizzatori - Synchronizers" (7).

Nell'ambito dell'apparato cardiovascolare, e con riferimento al controllo del ritmo circadiano (RC) della pressione arteriosa (PA) sistolica (S) e diastolica (D) e della frequenza cardiaca (FC), l'oscillatore primario (Master clock) è indovato nell'area antero-inferiore del diencefalo, in due distinti nuclei, bilateralmente simmetrici, che sono chiamati "Nuclei Soprachiasmatici - NSC" (8-17). Il ruolo di "pacing" ritmometrico dei NSC è dimostrato dall'evidenza condivisa che la loro distruzione sperimentale è seguita dalla scomparsa del RC della PA e della FC, non concomitantemente accompagnata da sostanziali modifiche incrementali o decrementali del loro livello medio oscillatorio (18-22).

Con riferimento al controllo ritmico della FC, a tutti è noto che un oscillatore ritmico intramurale è costituito dal "Nodo del seno", la cui attività ritmica spontanea, con copula di millisecondi, è responsabile del *pacing* "battito-a-battito" dell'attivazione elettro-meccanica del cuore.

È ormai definitivamente acclarato che il Diabete Mellito (DM) è uno stato morboso il cui decorso è fortemente interessato dalla compromissione del SNV, che, a carico dell'attività elettrico-meccanica cardiaca, è causa di una disautonomia (23-36), di più rapido appannaggio nel DM Tipo 1 (DM1) che Tipo 2 (DM2), stante la più precoce età di insorgenza del primo rispetto al secondo.

Vale la pena sottolineare che la maggior parte degli studi sulla disautonomia cardiaca diabetica è stata condotta considerando la funzione del SNV in senso convenzionale verso la sua attività di controllo spontaneo e reattivo. Questi studi si sono avvalsi delle metodiche classiche di Ewing (37), a cui si aggiungono quelle consigliate dalla European Task Force per lo studio della Heart Rate Variability (HRV), sia nel dominio del tempo che nel dominio delle frequenze (38).

Molto meno numerose, invece, sono le ricerche che hanno inteso esplorare il controllo ritmico circadiano della regolazione neurovegetativa cardiovascolare, nel presupposto che ove vi fosse una compromissione, essa si sarebbe mostrata attraverso l'alterazione di uno o più parametri della periodicità del RC spontaneo, che

caratterizza l'attività pressoria e pulsatoria dell'apparato cardiovascolare in condizioni fisiologiche (39-41).

A questo tipo di studi cronobiologici ha dato un contributo sostanziale il nostro gruppo di ricerca, che, con tutta una serie di studi, ha dimostrato come la malattia diabetica (MD) dia luogo ad un interessamento complicativo disautonomico cardiaco silente dimostrabile attraverso la compromissione di alcuni parametri del RC dell'intervallo R-R misurato nelle 24-h mediante elettrocardiogramma (ECG) dinamico secondo Holter (42-45).

Non a caso, questi nostri studi cronobiologici hanno permesso di rilevare, in pazienti diabetici apparentemente indenni da neuropatia, una nuova forma di disautonomia neurovegetativa cardiaca silente (DNCS), da noi definita "Minimum Delirium Cordis Syndrome" (45).

La presente ricerca scientifica vuole estendere lo studio sui rapporti tra neuroregolazione vegetativa e RC della PA e della FC nei diabetici con il presupposto che un'indagine cronobiologica in tal senso, sui dati pressori e pulsatori acquisiti dalla metodica cosiddetta del "Monitoraggio Ambulatorio della Pressione Arteriosa" (MAPA), possa essere di ulteriore ausilio clinico alla diagnosi quanto più precoce possibile della DNCS anche in altri ambiti nosologici.

Si ritiene, infatti, importante sottolineare che qualsiasi alterazione delle proprietà oscillatorie, sino all'abolizione, di un ritmo biologico dovrebbe essere intesa come l'espressione di un profondo turbamento morfo-funzionale dell'oscillatore neurovegetativo che ne regola il *pacing* in quel determinato periodo di oscillazione. Dal che si desume che ogni alterazione di un RC della PA e della FC riflette, in ultima analisi, una subdola e, talvolta silente, compromissione del SNV di modulazione circadiana dell'apparato cardiovascolare.

In particolare, viene formulata l'ipotesi che in presenza di un'iniziale DNCS diabeto-indotta, si dovrebbe cronobiologicamente rilevare una qualche alterazione nei RC di PA e/o FC. Anzi, si può prospettare l'ipotesi che l'eventuale alterazione del controllo neurovegetativo ritmico cardiovascolare si appalesi più preminentemente nel RC della FC, specie nei DM1, stante la nota maggiore aggressività neurovegetativa di questo tipo di MD. Del resto abbiamo già citato i non pochi studi che hanno dimostrato la particolare suscettibilità della "Heart Rate Variability" nei pazienti con DM, specie di Tipo 1 (23-36).

Materiali e Metodi

Soggetti

Il presente studio è stato effettuato prendendo in esame 3 gruppi di soggetti. Il primo gruppo è costituito da 30 soggetti normali di età compresa tra 45 e 67 anni (età media = 58 ± 7 aa.), di cui 15 di sesso femminile e 15 di sesso maschile. Il secondo campione è costituito da 10 pazienti affetti da DM1, di età compresa tra 23 e 53 anni (età media = 38 ± 8 aa.), di cui 3 di sesso femminile e 7 di sesso maschile. Il terzo campione è costituito da 30 pazienti affetti da DM2, di età compresa tra 40 e 81 anni (età media = 65 ± 10 aa.), di cui 13 di sesso femminile e 17 di sesso maschile.

Tabella 1. Caratteristiche delle due popolazioni esaminate di pazienti con Diabete Mellito Tipo 1 e Tipo 2.

Variabile		Diabete Tipo 1	Diabete Tipo 2	p
Numero pazienti		10	30	
Sesso	F	3 (30%)	13 (43,3%)	=0,9 *
	M	7 (70%)	17 (56,7%)	
Età (anni) Media ± DS		38 ± 8	65 ± 10	<0,001**
Età di insorgenza del diabete (anni) Media ± DS		17 ± 10	56 ± 12	<0,001**
Durata Diabete (anni) Media ± DS		20 ± 15	9 ± 8	= 0,012**
Terapia Diabete		100% insulina	85,7% IGO 14,3% insulina	
Ipertensione arteriosa	Sì	12,5%	66,7%	=0,009 *
	No	87,5%	33,3%	
BMI (kg/m ²) Media ± DS		24 ± 3	28 ± 6	=0,017**
Emoglobina Glicosilata (%, V.N.<6) Media ± DS		7,4 ± 1,1	6,7 ± 0,9	=0,087**
Colesterolo totale (mg/dl) Media ± DS		171 ± 28	187 ± 45	=0,351**
Colesterolo HDL (mg/dl) Media ± DS		53 ± 9	48 ± 15	=0,379**
Trigliceridi (mg/dl) Media ± DS		106 ± 72	153 ± 89	=0,195**
Colesterolo LDL (mg/dl) Media ± DS		96 ± 19	110 ± 39	=0,346**
Creatinina (mg/dl) Media ± DS		1 ± 0,2	1,1 ± 0,7	=0,661**

V.N.: Valori Normali di riferimento; IGO: ipoglicemizzanti orali; *: test del χ^2 ; **: test t di Student

A scanso di equivoci, si precisa subito che i soggetti afferenti ai tre gruppi di studio, in quanto espressione di un diverso stato di salute e di patologia, hanno caratteristiche anagrafiche, antropometriche e cliniche che, per principio, non sono confrontabili sul piano statistico (Tabella 1). Anzi, proprio la non-comparabilità dei dati clinici tra i DM1 e DM2 costituisce la garanzia che si sta operando su distinte tipologie nosologiche, note per la diversità nella loro età di insorgenza, peso e stato di composizione corporea, modalità di trattamento terapeutico, salienza del grado di compromissione metabolica, storia naturale nell'aggressività complicativa sul SNV. Diciamo solo che i pazienti diabetici partecipanti allo studio erano in soddisfacente controllo metabolico senza segni di chetosi o di cheto-acidosi, con diversa durata di malattia stante la diversa età di insorgenza e che non riferivano sintomi imputabili alla neuropatia.

Criteri di arruolamento

Il protocollo di arruolamento prevedeva che i tre gruppi di soggetti da esaminare costituissero un campione cosiddetto "a presentazione" ed esaudissero i seguenti criteri di esclusione, tali da non consentire loro l'esecuzione del MAPA in condizioni di standardizzazione dello stile di vita per: 1. abitudini di vita inusuali per quanto attiene allo schema sonno-veglia ed attività-riposo, nonché all'orario dei pasti; 2. attività lavorativa e stile di vita particolarmente stressanti;

3. disturbi del sonno, del comportamento alimentare e del tono dell'umore; 4. abuso nel fumare, nel mangiare e nel bere, specie di caffè, alcolici, superalcolici e bevande di tipo minerale. Per i pazienti diabetici era da considerare criterio di esclusione: 5. uso di farmaci diversi da quelli necessari alla cura del dismetabolismo diabetico (preparati insulinici iniettivi per il DM1, preparati antidiabetici orali per il DM2); 6. stato di scompenso metabolico chetosico o cheto-acidosico; 7. forte uguaglianza nella durata di malattia. Vale la pena precisare che un campione, cosiddetto "a presentazione", si compone di soggetti che sono stati reclutati in modo casuale, ciò a garanzia che essi hanno avuto la stessa probabilità di essere inclusi nel protocollo rispetto a tutti i soggetti della popolazione da cui provengono.

Tutti i soggetti partecipanti alla ricerca erano volontari che avevano espresso il loro consenso informato.

Protocollo di studio

Lo studio è stato condotto seguendo il seguente protocollo metodologico riguardante sia lo stile di vita sia la modalità di esecuzione del MAPA. *Stile di vita.* Per il tramite di un diario, si verificava che lo stile di vita del soggetto in studio, rispettasse le attività routinarie di una giornata comune feriale. Si verificava, pertanto, che il soggetto monitorato ordinariamente si svegliasse tra le 06:30 e le 08:00, andasse a dormire tra le 21:30 e le 23:00, nonché tenesse la colazione,

il pranzo e la cena, rispettivamente tra le 07:00 e le 08:30, le 12:30 e le 14:00, le 19:30 e le 21:00. Il soggetto che durante il monitoraggio avesse derogato alla routine di una giornata tipo, avendo fatto sforzi fisici, mentali o sessuali, e/o non rispettato l'orario dei pasti e/o del periodo sonno-veglia, veniva escluso dallo studio.

A ciascun soggetto in studio veniva praticato il MAPA con apparecchiatura non-invasiva, che tecnicamente registra la serie storica di 24-h dei valori puntuali discreti (dati grezzi) della PAS, PAD (in mmHg) e FC (in bpm), utilizzando il metodo oscillatorio. Nella fattispecie, l'apparecchio di monitoraggio era il Modello 90207 della Space Labs (Redmond, MA, USA), validato nella sua accuratezza (46).

L'apparecchiatura svolgeva in modo automatico la sua attività di misurazione sfigmomanometrica intervallare, in quanto programmabile nel suo firmware, costituito da una EPROM (*Erasable Programmable Read Only Memory*), attraverso un software dedicato. Nella fattispecie, lo strumento era programmato ad effettuare le sue misure ad intervalli di 30 minuti nell'arco delle 24 ore, evitando una raccolta di dati non-equidistanti e di diversa densità tra il giorno e la notte. Infatti, una campionatura asimmetrica di dati in serie storica temporale meno si presta a stime cronobiometriche accurate.

L'apparecchio di monitoraggio effettua ogni singola misurazione attraverso una cuffia sfigmomanometrica gonfiabile le cui dimensioni di altezza e lunghezza sono calibrate secondo gli standard della Società Italiana dell'Iperensione Arteriosa (SIIA) (47).

Il monitoraggio, in genere, è stato iniziato alle 12:00 e proseguito per le successive 24 ore. Tutti i monitoraggi sono stati effettuati nei mesi invernali.

Nel monitor da noi usato le misure di PAS, PAD ed FC erano memorizzate su di una memoria solida CMOS, sotto forma di dati ASCII (American Standard Code International Interchange), insieme con il dato riguardante il tempo di campionamento, in ora (HH) e minuti (MM). Il formato dei dati è quello di stringhe alfa-numeriche, del tipo "comma-delimited", poste in serie digitale sequenziale, per cui su ogni riga è registrata la misura della PAS, PAD, FC, HH, MM, con la virgola come delimitatore dei valori é [es. 140,75,81,12,30].

Finito il monitoraggio, i dati memorizzati venivano trasferiti, con "software" adeguato, ad un computer IBM-compatibile. Il trasferimento avveniva tramite la connessione del registratore pressorio all'elaboratore elettronico, attraverso un cavo "null-modem" collegato ad una interfaccia seriale asincrona (ACA) del tipo RS232. I dati, importati nel computer venivano memorizzati sul disco rigido del computer in un file ASCII, con estensione .MON, intestato al soggetto monitorato, pronto per l'analisi cronobiometrica (vedi appresso).

Analisi cronobiometrica dei dati MAPA

L'analisi statistica cronobiometrica delle serie temporali giornaliere dei dati di PAS, PAD, FC, HH, MM, registrati dal MAPA è stata condotta con due distinte metodiche cronobiometriche come meglio illustrato in seguito. Si fa

presente, che tutte le analisi dei dati sono state effettuate in automatico con una procedura informatica, definita "in batch", basata sull'allestimento di una "script", ovvero di un file di *setup*, in cui sono scritte tutte le operazioni statisticomatematiche che il computer deve eseguire in automatico senza che alcun operatore possa intervenire nell'esecuzione. Ciò a garanzia di operare in "doppio cieco", per cui non vi era scambio di informazioni tra i componenti della ricerca che avevano reclutato i soggetti e quelli che avevano eseguito le opportune analisi cronobiometrico-statistiche.

1. Analisi cronobiometrica della variabilità intragiornaliera di PA e FC

I dati delle serie temporali individuali di PAS e PAD e FC venivano raggruppati, per ciascun gruppo, in una pertinente matrice vettoriale bivariata "tempo-valori", le cui colonne corrispondevano ai tempi di campionamento, in ore e minuti, posti in crescendo con un intervallo di mezz'ora, dalle 00:30 alle 24:00; le righe, invece, corrispondevano ai valori in serie storica della relativa variabile, ciascuno corrispondente a quel determinato tempo di campionamento, nei singoli individui facenti parte di quel dato gruppo.

Le matrici vettoriali bivariate gruppo-specifiche di PAS, PAD e FC venivano in automatico importate in un Tabellone Elettronico (Spread-Sheet) programmato per la stima della Media Aritmetica di ciascuna colonna, con la relativa Deviazione Standard (DS). Così facendo, venivano computati i limiti di dispersione intorno alla loro media, per ciascuna mezz'ora della giornata, dalle 00:30 alle 24:00, rispettivamente per la PAS, PAD e FC per ciascun gruppo oggetto di studio.

Queste stime descrittive emiorarie sono servite per costruire il grafico del **cronogramma medio intragiornaliero** di gruppo per la variabilità intragiornaliera di PAS, PAD e FC.

Sulle serie temporali discrete veniva effettuato il test statistico dell'ANOVA "a un criterio di classificazione" (One-way ANOVA) al fine di stabilire se la distribuzione dei valori ai singoli tempi di campionamento, in ciascun gruppo, rifletteva l'effetto del tempo come avviene se esiste una variabilità intragiornaliera. La significatività dell'ANOVA consente di affermare che la serie di dati, a ciascun tempo di campionamento, è costituita da valori non uguali e costanti ma diversi tra di loro al punto di dar luogo ad una variabilità intragiornaliera. La constatazione ANOVA di una significativa variabilità temporale intragiornaliera (definita anche variabilità circadiana) dei dati è il presupposto per poter effettuare la successiva analisi cronobiometrica del RC, considerando che, secondo la Legge di Fourier, un segnale tempo-variabile è definibile "ritmo" se la sua variabilità può essere rappresentata da una oscillazione a forma d'onda (armonica fondamentale) che ha un determinato periodo di rivoluzione. La significatività di tale oscillazione può essere verificata con il metodo di analisi cronobiometrica del Cosinor (vedi appresso). In definitiva, si vuole stressare il concetto che una variabilità intragiornaliera (da alcuni definita impropriamente "variabilità circadiana"), potrebbe non essere l'espressione di un RC se non è strutturata a mo' di oscillazione a forma d'onda sinusoidale che ha un documentabile periodo di fluttuazione di 24-h.

2. Analisi cronobiometrica del ritmo circadiano di PA e FC

Disponendo, per ciascuno dei soggetti studiati in ogni gruppo, dei valori di 24 ore della PAS, PAD e FC con il dato del corrispettivo tempo di campionamento, ai fini della definizione dei parametri oscillatori del relativo RC, si praticava, a dette serie temporali, l'analisi del Single-Cosinor (48), secondo la formula:

$$Y = M + A \cos\left(\frac{2\pi}{\tau} \times t + \phi\right)$$

ove,

1. M, ovvero il "MESOR" (acronimo di *midline estimating statistic of rhythm*), corrisponde al livello medio giornaliero intorno al quale oscilla la variabile in studio per effetto del suo RC;
2. A, ovvero la "Ampiezza", corrisponde allo scostamento dal MESOR raggiunto dal livello massimo dell'oscillazione ritmica circadiana;
3. ϕ (PHI), ovvero l'acrofase, corrisponde all'orario della massima elevazione del RC rispetto alla mezzanotte locale;
4. τ (TAU), ovvero il periodo di oscillazione, corrisponde alla durata del periodo oscillatorio da testare;
5. t , ovvero il tempuscolo interpolante, corrisponde all'unità minima con cui si deve interpolare la funzione coseno;
6. $\frac{2\pi}{\tau}$, ovvero coefficiente angolare, corrisponde alla rotazione ciclica espressa in radianti.

Va precisato che il metodo Single-Cosinor è un'analisi di regressione periodica "a periodo noto" che approssima l'espressione coseno con il "Metodo dei Minimi Quadrati" al fine di trovare la *sinusoide* che meglio si adatta ai dati grezzi tempo-qualificati (*sinusoide approssimante ottimale*). Tale *sinusoide* si ottiene minimizzando la somma dei *residui* (*varianza dei dati grezzi rispetto alla sinusoide*), calcolati come differenza al quadrato dei valori dei dati grezzi tempo-qualificati, rispetto ai valori della curva ottimale oscillatoria approssimata a quel tempuscolo t . Il metodo usa il periodo TAU come un termine noto, ovvero come una "costante", e non come un *parametro da stimare*, e, nel caso del RC, TAU assume il valore numerico di 24, corrispondente a quante sono le ore di un ciclo circadiano giorno-notte. I parametri da stimare sono dunque M, A e ϕ . Come vedremo in seguito, oltre alla quantizzazione di questi parametri, il metodo Single-Cosinor effettua anche la stima della significatività dell'oscillazione.

I dati della *sinusoide approssimante ottimale* costituiscono i valori con cui rappresentare l'oscillazione ottimale di 24-h (*cosinogramma circadiano*) che, per la Legge di Fourier, restituisce la componente armonica fondamentale del segnale, depurata dal rumore dei residui se il segnale ha una variabilità giornaliera strutturata in modo ciclico con periodo di 24-h.

Al fine di comprendere la parte statistica del metodo Cosinor, è importante ricordare che in base al *metodo dei minimi quadrati* si ottiene la varianza dei dati grezzi tempo-qualificati. A sua volta, per il tramite della *sinusoide approssimante ottimale* si può calcolare la varianza della funzione di regressione periodica approssimata. Pertanto, la

varianza della sinusoide approssimante ottimale espressa in percentuale della varianza dei dati grezzi tempo-qualificati, fatta uguale 100%, restituisce la varianza spiegata dalla regressione con periodo di 24-h che viene definita "Ritmo Percentuale" (RP). Peraltro, il rapporto tra le due suddette varianze restituisce il coefficiente F la cui significatività deve essere riscontrata sulle Tavole Statistiche per la Distribuzione di Fisher. Se la F di Fisher risulta essere significativa ($p \leq 0,05$), si deve concludere che la frequenza coseno con periodo di 24-h ha convalidato la presenza di un significativo RC; in caso di F non significativa ($p > 0,05$) si deve pervenire all'inferenza opposta di non presenza di un RC.

Una volta che sono state effettuate le stime del Single-Cosinor sulle serie individuali di dati PAS, PAD e FC si procedeva, mediante il metodo del Population-Mean Cosinor (49), alla stima di ogni parametro ritmico come valore medio di gruppo corredato dalla dispersione intorno alla sua locazione: Errore Standard (ES) per il MESOR, Limiti di Confidenza al 95% (LC95%) per A e ϕ . A completamento, il metodo del Population Mean-Cosinor rileva il valore medio di RP e di F della sinusoide approssimante ottimale media, e quindi, identifica, attraverso la significatività statistica di questo secondo coefficiente, se il RC di PAS, PAD e FC è presente o assente in quel gruppo.

È importante realizzare che per il tramite dei valori medi di gruppo di M, A e ϕ , è possibile costruire graficamente l'oscillazione sinusoidale ottimale media (**cosinogramma medio circadiano**) del RC della variabile nel gruppo in esame.

Da ultimo, è fondamentale ribadire che anche l'analisi Cosinor non è un metodo di semplice approssimazione geometrica, in quanto esso compie anche la convalida statistica della significatività della sinusoide approssimante ottimale di gruppo.

Questo sta ad indicare che qualora un ritmo non sia convalidato dal metodo Cosinor come statisticamente significativo, né l'ampiezza oscillatoria (A) né l'acrofase oscillatoria (ϕ) possono essere stimate nella dispersione dei loro valori di gruppo intorno alla loro media, proprio per l'assenza della oscillazione ritmica che li determina.

Di conseguenza, la non convalida Cosinor del RC si traduce in assenza di dati ritmometrici di A e ϕ , che possono essere sottoposti a test di comparabilità. Va però enfatizzato il fatto che il metodo Cosinor, vagliando statisticamente la significatività della oscillazione, permette di poter trarre inferenze scientificamente valide, in merito alla sussistenza o scomparsa di un RC, direttamente dal valore p della F di Fisher, che, se significativa, deve essere $\leq 0,05$.

Risultati

Vediamo i risultati ottenuti con i due metodi di analisi crono biometrica.

1. Analisi cronobiometrica della variabilità intragiornaliera di PA e FC

Questo tipo di analisi statistica ha permesso di stimare, ad intervallo di 30 min sulla distanza delle 24-h, i valori medi (\pm DS) dei dati grezzi delle serie temporali di PAS, PAD e

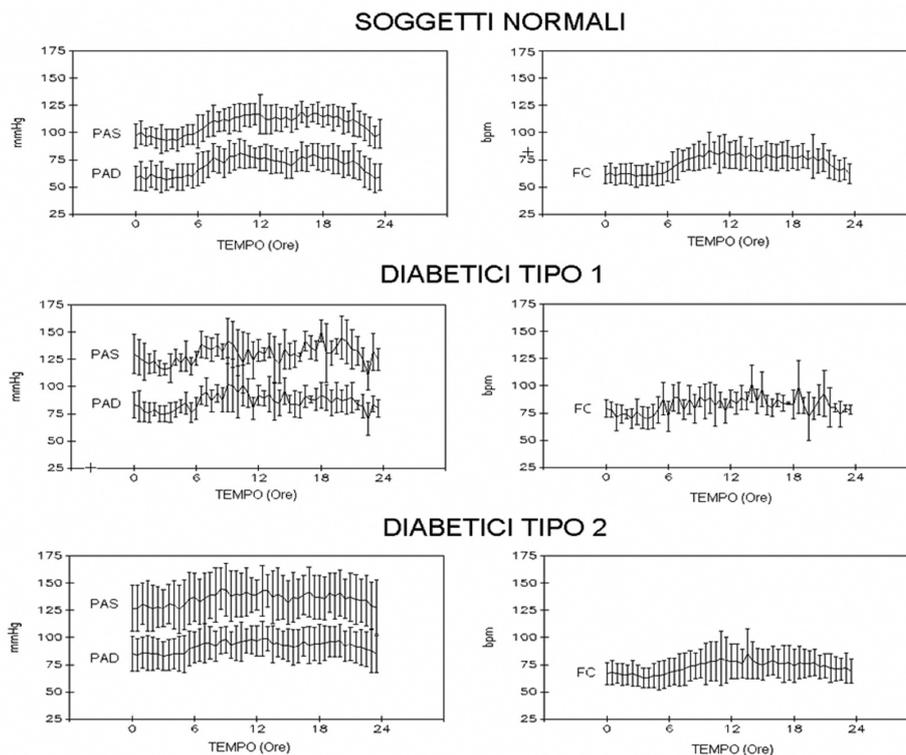


Fig. 1. Cronogrammi medi emiorari della variabilità intragiornaliera della pressione arteriosa (PA) sistolica (S) e diastolica (D) e della frequenza cardiaca (FC) in soggetti normali e pazienti con Diabete Mellito di Tipo 1 e 2.

FC nei gruppi esaminati.

I risultati di questa analisi sono esposti come *cronogrammi medi di gruppo* nella Figura 1.

Dall'esame ispettivo dei cronogrammi si evince che la PAS, PAD e FC hanno una variabilità intragiornaliera nei loro valori medi emiorari in tutti i gruppi esaminati. È immediata la constatazione che il cronogramma medio intragiornaliero della FC nei diabetici di Tipo 1 è molto più frastagliato e si caratterizza per una maggiore disomogeneità nei valori DS che rappresentano la dispersione dei dati intorno alla loro media tempo-qualificata.

Per verificare se queste varie forme gruppo-specifiche di variabilità intragiornaliera in qualche modo riflettano un

effetto del tempo non interferito dal caso, è stata effettuata l'analisi ANOVA "a una via di classificazione" sulle matrici bivariate "tempo-valori" di PAS, PAD e FC in ciascun gruppo esaminato.

I risultati di questa analisi sono esposti nella Tabella 2.

Dalla significatività della F di Fisher si evince che le serie temporali di dati relativi alla PAS, PAD ed FC riflettono, in ogni gruppo, l'effetto del tempo al riparo da una significativa interferenza casuale sulla distribuzione dei valori ad ogni mezz'ora. Si può dunque concludere che le serie temporali di dati **rappresentano un segnale variante nel tempo non per effetto della casualità.**

Va però precisato che questa effettiva variabilità

Tabella 2. Analisi della Varianza "a un criterio di classificazione" delle serie emiorarie di 24-h della pressione arteriosa (PA) sistolica (S) e diastolica (D) e della frequenza cardiaca (FC) nei gruppi oggetto di studio.

Gruppi	Variabili	F	GDL (colonne)	GDL (righe)	p
Soggetti normali	PAS	3,26	47	432	<0,001
	PAD	5,12	47	432	<0,001
	FC	3,11	47	432	<0,001
Diabetici Tipo 1	PAS	1,70	47	192	<0,001
	PAD	1,26	47	192	<0,001
	FC	2,23	47	192	<0,001
Diabetici Tipo 2	PAS	22,97	47	1258	<0,001
	PAD	9,19	47	1258	<0,001
	FC	12,84	47	1258	<0,001

GDL = Gradi di Libertà

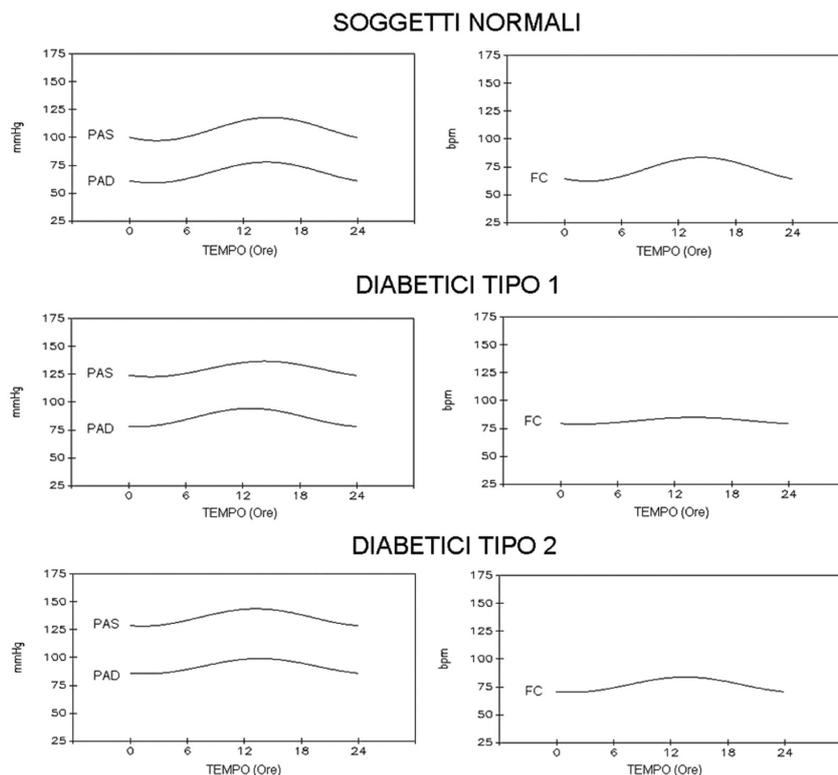


Fig. 2. Cosinogrammi medi circadiani della variabilità intragiornaliera della pressione arteriosa (PA) sistolica (S) e diastolica (D) e della frequenza cardiaca (FC) in soggetti normali e pazienti con Diabete Mellito di Tipo 1 e 2.

intragiornera, rilevata dalla ANOVA, non autorizza a ritenere che essa sia l'espressione di un RC perché questa metodica statistica non dà alcun ragguaglio circa la struttura periodica circadiana della variabilità intragiornaliera. Potrebbe trattarsi, infatti, di variabilità tempo-qualificata non strutturata in senso ritmico con periodo circadiano. Abbiamo avuto già modo di dire che una variabilità intragiornaliera risulta essere un RC se i dati tempo-qualificati che ne rappresentano il segnale sono approssimabili, con significatività statistica, da una oscillazione a forma d'onda sinusoidale il cui periodo di oscillazione è di 24-h. A quest'uopo è deputato il metodo Cosinor, di cui abbiamo già detto. Tutto questo per dire che non si deve fare confusione tra variabilità intragiornaliera e periodicità circadiana.

La significatività ANOVA della variabilità intragiornaliera è comunque di fondamentale e preliminare importanza per poter procedere nello studio dei RC di PAS, PAD e FC. Infatti, appare ovvio che se un segnale non risulta preliminarmente modulato in senso temporale è del tutto inutile procedere alla verifica di una sua eventuale struttura periodica.

2. Analisi cronobiometrica del ritmo circadiano di PA e FC

I risultati dell'analisi cronobiometrica del Population Mean-Cosinor per le serie temporali della PAS, PAD e FC nei gruppi oggetto di studio sono illustrati graficamente, nella Figura 2, sotto forma di *cosinogrammi medi circadiani di gruppo*.

Dall'esame ispettivo delle curve oscillatorie ottimali si può notare come la variabilità intragiornaliera della PAS, PAD e FC è interpolabile da un'onda sinusoidale con periodo

di 24-h in tutti i gruppi esaminanti. Ma quel che più colpisce è la modestissima ampiezza ondulatoria del cosinogramma medio della FC nei pazienti diabetici di Tipo 1.

Per appurare quali cosinogrammi raggiungono una ampiezza oscillatoria significativa tipica di un valido RC vediamo nei dettagli i risultati dell'analisi Population Mean-Cosinor (Tabella 3).

3. Risultati dell'analisi cronobiometrica del Population Mean-Cosinor delle serie emiorarie di 24-h della pressione arteriosa (PA) sistolica (S) e diastolica (D) e della frequenza cardiaca (FC) nei gruppi oggetto di studio.

Come è dato vedere dai valori di p del rapporto F tra la varianza dei dati grezzi e la varianza della regressione, tutte le oscillazioni testate con periodo di 24-h dal metodo Cosinor sono risultate significative, ad eccezione di quella relativa alla variabilità intragiornaliera della FC nei pazienti con DM1.

È importante rilevare nei soggetti normali e nei diabetici DM2, i singoli RC della PAS, PAD e FC, non solo sono presenti ma, stando all'orario coincidente nelle prime ore pomeridiane della loro acrofase oscillatoria, hanno la prerogativa di fluttuare in concordanza di fase (ritmi sincroni). Ciò a dimostrazione dell'esistenza e della persistenza di una loro fisiologica "sincronizzazione interna".

È interessante notare che nei DM1, i RC di PAS e PAD continuano a presentare una fase sincrona pomeridiana. Ciò vale a significare che la perdita del RC della FC in questi pazienti assume il significato fisiopatologico di una "desincronizzazione interna" nell'ambito della regolazione neurovegetativa circadiana dell'attività

Tabella 3. Risultati dell'analisi cronobiometrica del Population Mean-Cosinor delle serie emiorarie di 24-h della pressione arteriosa (PA) sistolica (S) e diastolica (D) e della frequenza cardiaca (FC) nei gruppi oggetto di studio.

Parametri del Ritmo Circadiano	Soggetti normali			Diabetici di Tipo 1			Diabetici di Tipo 2		
	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	FC (bpm)	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	FC (bpm)	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	FC (bpm)
Significatività statistica del ritmo (p)	<0,001	<0,001	<0,001	0,043	<0,005	=0,124 (NS)	<0,001	<0,001	<0,001
Livello Oscillatorio, MESOR (Media \pm ES)	108 \pm 1	69 \pm 2	73 \pm 2	130 \pm 4	86 \pm 4	82 \pm 3	136 \pm 4	92 \pm 3	74 \pm 2
Ampiezza Oscillatoria, A (Media, LC95%)	10 (9;12)	9 (8;11)	11 (9;13)	7 (1;19)	8 (2;20)	8 (NC)	8 (5;11)	7 (5;9)	7 (5;9)
Acrofase Oscillatoria, ϕ (Media, LC95%)	14:53 (14:04; 15:40)	14:28 (13:48; 15:04)	14:28 (13:48; 15:08)	14:20 (10:16; 21:08)	12:52 (11:56; 21:08)	14:08 (NC)	13:20 (11:36; 14:44)	13:48 (12:28; 14:48)	14:48 (13:52; 15:52)

ES = Errore Standard; LC95% = Limiti di Confidenza al 95%. hh:mm = ora e minuti. Valori arrotondati all'unità più vicina. NS = Non significativo, NC = Non calcolabili per assenza di periodicità circadiana significativa.

regolatoria cardiovascolare.

In virtù della dimostrazione che nei DM1, il RC della FC non sussiste, mentre quelli della PAS e della PAD persistono in sincronizzazione interna, si deve inferire che in questi pazienti vi è una profonda ed elettiva alterazione del controllo oscillatorio neurovegetativo che conferisce la periodicità circadiana alla HRV.

Discussione

Nell'intraprendere la discussione dei nostri risultati è bene ribadire che lo studio è stato effettuato con lo scopo di ricercare nuovi metodi di facile applicazione clinica per poter diagnosticare la compromissione neurovegetativa del *pacing* cardiaco, già nella forma di DNCS.

Per assolvere a questo compito abbiamo fatto riferimento alla MD ben sapendo che questa, specie nella sua forma insulino-dipendente, è causa di più precoce insorgenza di complicanze neurovegetative.

Tra i metodi di facile applicazione per lo scandaglio della funzione cardiovascolare abbiamo pensato di rivolgerci alla metodica strumentale del MAPA stante la praticità della sua esecuzione che permette di indagare, in contemporanea, sia la PAS che la PAD che la FC. Abbiamo pensato che un segno ad alto valore diagnostico potesse essere un eventuale comportamento anomalo del RC della FC stante la suscettibilità della HRV nei pazienti diabetici (23-36). L'ipotesi era che qualora nei pazienti diabetici del nostro studio si fosse già instaurata una DNCS, l'elettiva compromissione del RC della FC avrebbe avuto il significato di una profonda compromissione a carico degli orologi biologici che ne modulano la circadianità oscillatoria. Peraltro, la rilevanza fisiopatologica di una tale elettiva compromissione avrebbe avuto il significato cronopatologico di una desincronizzazione interna tra i RC di PA e di FC, essendo le rispettive oscillazioni fisiologicamente

caratterizzate da una stretta sincronia di fase.

I risultati conseguiti in questo studio, mediante analisi Cosinor, hanno palesemente dimostrato che nei pazienti diabetici di Tipo 1 non è dato riscontrare il RC della FC, a fronte della persistenza del RC della PAS e della PAD. Per converso, i dati Cosinor hanno patentemente chiarito che nei soggetti normali e nei diabetici di Tipo 2 si ha non solo la persistenza dei tre RC ma anche la sussistenza del loro sincronismo.

Avendo constatato che nei pazienti con DM1, a causa della perdita del RC della FC, si realizza una desincronizzazione interna nei fattori della regolazione circadiana dell'apparato cardiovascolare, abbiamo dovuto riflettere a quale oscillatore si dovesse addebitare l'alterato controllo circadiano dell'attività del nodo del seno.

In primis abbiamo concluso che nessun addebito dovesse essere fatto ai NSC, per il semplice ragionamento che se questi fossero stati danneggiati dalla MD, la loro complicità come oscillatori neurovegetativi primari, avrebbe interessato congiuntamente il RC della PA e della FC, come si deduce dagli studi sperimentali sin qui condotti (18-22).

A questo punto era d'uopo pensare ad uno degli oscillatori circadiani secondari selettivi per il controllo del RC della HRV. In mancanza di studi a tal scopo dedicati, abbiamo dovuto fare agio sui dati dello studio sperimentale di Warren et al. (19) che hanno dimostrato come il blocco della trasmissione intersinaptica con farmaci ganglioplegici comporta la perdita elettiva del RC della FC.

Ciò ci porta a ritenere che il riscontro della perdita del RC della FC nei pazienti diabetici di Tipo 1 sia un segno di compromissione neurovegetativa che si instaura per un *interessamento complicativo a livello paraganigliare* che si riverbera sull'innervazione postgangliare simpato-adrenergica del nodo del seno.

Ma a prescindere da questa speculativa interpretazione fisiopatologica, per rimanere, invece, nel nostro intendimento

prettamente clinico, in coerenza con lo scopo di questo lavoro, ci sentiamo di poter concludere che uno dei metodi pratici per individuare la compromissione neurovegetativa del *pacings* cardiaco, già nella forma di DNCS, è l'esecuzione del MAPA corredata dallo studio Cosinor del RC della PA e della FC. La diagnosi di DNCS è palese nel caso in cui si assista alla scomparsa della periodicità circadiana della FC a fronte della persistenza del RC della PAS e della PAD.

Si precisa inoltre che la prescrizione del MAPA nei diabetici di Tipo 1 è suggerita dalle Linee Guida della Società Italiana dell'Iperensione Arteriosa (47) in quanto per la ridotta variabilità giorno/notte della PAS e della PAD, in questi pazienti si configura il "fenomeno non-dipping" che può predire lo sviluppo di complicanze cardiovascolari (50). Inoltre sempre nei pazienti con Diabete Mellito Tipo 1, si è visto che lo sviluppo di microalbuminuria è spesso preceduto da un aumento della PAS durante la notte (47).

Bibliografia

- Guyton AC, Hall JE. Il sistema nervoso autonomo e la midollare del surrene. In: *Fisiologia Medica* (ed. II). Edises, Napoli, 2002; 716-22
- Aschoff J, Daan S, Groos G. *Vertebrate Circadian Systems: Structures and Physiology*. Springer-Verlag, Berlin-Gheidelberg-New York, 1982
- Emond LN Jr. *Cellular and molecular bases of biological clocks*. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1988
- Pittendrigh CS. Circadian systems: Entrainment. In: Aschoff J (Eds): *Biological Rhythms. Handbook of Behavioural Neurobiology*. Plenum, New York, 1988; 4:95-124
- Aschoff J. *Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik*. *Naturwissenschaften* 1954; 41:49-56
- Aschoff J, Daan S, Groos G. *Vertebrate Circadian Systems: Structures and Physiology*. Springer-Verlag, Berlin-Gheidelberg-New York, 1982
- Halberg F, Caradente F, Cornelissen G, et al. Glossary of Chronobiology. *Chronobiol* 1977; 6 Suppl.1
- Moore RY. Retino-hypothalamic projection in mammals. A comparative Study. *Brain Res* 1973; 49:403-9
- Rusak B. The role of the suprachiasmatic nuclei in the generation of the circadian rhythms in the golden hamster *Mesocricetus Auratus*. *J Comp Physiol* 1977; 118:145-64
- Moore RY, Card JP, Riley JN. The suprachiasmatic nucleus: neuronal ultrastructure. *Neuros Abstr* 1980; 6:758
- Rietveld WJ, Gross G. The central regulation of circadian rhythms. *NATO Adv Study Inst* 1980; 3:189-204
- Rietveld WJ. The functional significance of a retino-hypothalamo-retinal loop for the circadian eating activity of rabbits. *Behav Brain Res* 1981; 2:274-5
- Rietveld WJ, Gross GA. The role of the suprachiasmatic nucleus afferents in the central regulation of circadian rhythms. In: H Von Mayersbach, LE Scheving, JE Pauli (Eds). *Biological Rhythms in Structure and Functions*. Liss, New York, 1981
- Rietveld WJ. The Suprachiasmatic Nucleus and other pacemakers. In Y. Touitou, E. Haus (Eds). *Biological Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1982, pp. 55-64
- Moore RY. The suprachiasmatic nucleus and the organization of a circadian system. *Trends Neurosci* 1982; 5:404-7
- Rusak B, Zucker I. Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol Rev* 1982; 59:449-526
- Moore RY. Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamus nucleus. *Fed Proc* 1983; 42:2783-89
- Janssen BJ, Tyssen CM, Duindam H, et al. Suprachiasmatic lesions eliminate 24-h blood pressure variability in rats. *Physiol Behav* 1994; 55(2):307-11
- Warren WS, Champney TH, Cassone VM. The suprachiasmatic nucleus controls the circadian rhythm of heart rate via the sympathetic nervous system. *Physiol Behav* 1994; 55(6): 1091-9
- Sano H, Hayashi H, Makino M, et al. Effects of suprachiasmatic lesions on circadian rhythms of blood pressure, heart rate and locomotor activity in the rat. *Jpn Circ J* 1995; 59(8): 565-73
- Scheer FA, Ter Horst GJ, van Der Vliet J, et al. Physiological and anatomic evidence for regulation of the heart by suprachiasmatic nucleus in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280(3):1391-9
- Scheer FA, Kalsbeek A, Buijs RM. Cardiovascular control by the suprachiasmatic nucleus: neural and neuroendocrine mechanisms in human and rat. *Biol Chem* 2003; 384(5): 697-709
- Ewing DJ, Borseley DQ, Travis P, et al. Abnormalities of ambulatory 24-hour heart rate in diabetes mellitus. *Diabetes* 1983; 32(2):101-5
- Ewing DJ, Neilson JM, Shapiro CM, et al. Twenty four hour heart rate variability: effects of posture, sleep, and time of day in healthy controls and comparison with bedside tests of autonomic function in diabetic patients. *Br Heart J* 1991; 65(5):239-44
- Bernardi L, Ricordi L, Lazzari P, et al. Impaired circadian modulation of sympathovagal activity in diabetes. A possible explanation for altered temporal onset of cardiovascular disease. *Circulation* 1992; 86(5): 1443-52
- Noritake M, Takase B, Kudoh K, et al. Diurnal change in heart rate variability in healthy and diabetic subjects. *Intern Med* 1992; 31(4): 453-6
- Spallone V, Bernardi L, Ricordi L, et al. Relationship between the circadian rhythms of blood pressure and sympathovagal balance in diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes* 1993; 42(12):1745-52
- Takase B, Kurita A, Noritake M, et al. Heart rate variability in patients with diabetes mellitus, ischemic heart disease, and congestive heart failure. *J Electrocardiol* 1992; 25(2): 79-88
- Fujimoto Y, Fukuki M, Hoshio A, et al. Decreased heart rate variability in patients with diabetes mellitus and ischemic heart disease. *Jpn Circ J* 1996; 60(12):925-32
- Hoffman RP, Kienzle MG. Circadian control of heart rate in young insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Diabetes Complications* 1996; 10(4):220-2
- Nolan J, Flapan AD, Goodfield NE, et al. Measurement of parasympathetic activity from 24-hour ambulatory electrocardiograms and its reproducibility and sensitivity in normal subjects, patients with symptomatic myocardial ischemia, and patients with diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 1996; 77(2): 154-8
- Spallone V, Bernardi L, Maiello MR, et al. Twenty-four-hour pattern of blood pressure and spectral analysis of heart rate variability in diabetic patients with various degrees of autonomic neuropathy. Comparison to standard cardiovascular tests. *Clin Sci (Lond)* 1996; 91 Suppl:105-7
- Aronson D, Weinrauch LA, D'Elia JA, et al. Circadian

- patterns of heart rate variability, fibrinolytic activity, and hemostatic factors in type I diabetes mellitus with cardiac autonomic neuropathy. *Am J Cardiol* 1999; 84(4): 449-53
34. Burger AJ, Charlamb M, Sherman HB. Circadian patterns of heart rate variability in normals, chronic stable angina and diabetes mellitus. *Int J Cardiol* 1999; 30;71(1):41-8
 35. Yamamoto M, Yamasaki Y, Kodama M, et al. **Impaired diurnal** cardiac autonomic function in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22(12):2072-7
 36. Kondo K, Matsubara T, Nakamura J, et al. **Characteristic patterns** of circadian variation in plasma catecholamine levels, blood pressure and heart rate variability in Type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 2002; 19(5):359-65
 37. Ewing DJ, Martyn CN, Young RJ, Clarke BF. The value of cardiovascular autonomic function tests: 10 years experience in diabetes. *Diabetes Care* 1985; 8:491-8
 38. Task Force of the European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Eur Heart J* 1996; 17:354-81
 39. Malpas SC, Purdie GL. Circadian variation of heart rate variability. *Cardiovas Res* 1990; 24:210-3
 40. Nakagawa M, Iwao T, Ishida S, et al. **Circadian rhythm of the** signal averaged electrocardiogram and its relation to heart rate variability in healthy subjects. *Heart* 1998; 79(5):493-6
 41. Bonnemeier H, Richardt G, Potratz J, et al. **Circadian profile** of cardiac autonomic nervous modulation in healthy subjects: differing effects of aging and gender on heart rate variability. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003; 14:791-9
 42. Curione M, Bernardini F, Cedrone L, et al. **The chaotic** component of human heart rate variability shows a circadian periodicity as documented by the correlation dimension of the time-qualified sinus R-R intervals. *Clin Ter* 1998; 149(6):409-12
 43. Curione M, Cugini P, Napoli A, et al. **A lower level of entropy** in circadian rhythm of the sinus R-R intervals suggests a prevalence of the cardiac sympathetic regulation in early physiological pregnancy. *Chronobiol Int* 2005; 22(4):711-22
 44. Curione M, Cugini P, Cammarota C, et al. **Analysis of the** chaotic component of the sinus R-R intervals as a tool for detecting a silent cardiac dysautonomia in type 2 diabetes mellitus. *Clin Ter* 2005; 156(4):151-8
 45. Cugini P, Curione M, Castro C, et al. **The loss of entropy** circadian rhythm in sinus R-R intervals of type 1 diabetic pregnant women suggests an indeterministic chaos in cardiac pacing (minimum delirium cordis syndrome). A newly identifiable type of silent cardiac dysautonomia? *Acta Cardiol* 2007; 62(3):257-64
 46. Gropelli A, Omboni S, Parati G, et al. **Evaluation of noninvasive** blood pressure monitoring devices Spaceslabs 90202 and 90207 versus resting and ambulatory 24-hour intra-arterial blood pressure. *Hypertension* 1992; 20:227-32
 47. Comitato per la Stesura delle Linee Guida sul Monitoraggio della Pressione Arteriosa, Gruppo di Studio sul Monitoraggio Pressorio della Società Italiana dell'Ipertensione Arteriosa. Linee Guida della Società Italiana dell' Ipertensione Arteriosa sulla misurazione convenzionale e automatica della pressione arteriosa nello studio medico, a domicilio e nelle 24 ore, 2008
 48. Halberg F, Tong YL, Johnson EA. Circadian system phase: an aspect of temporal morphology; procedures and illustrative examples. In: H. Von Mayersbach (Eds). *The Cellular Aspects of Biorhythms*. New York: Springer-Verlag, 1967; 20-48
 49. Halberg F, Johnson EA, Nelson W, et al. **Authorhythmometry:** procedures for physiologic self-measurements and their analysis. *Physiol Teacher* 1972; 1:1-11
 50. Sturrock ND, George E, Pound N, et al. **Non-dipping diurnal** blood pressure and renal impairment are associated with increased mortality in diabetes mellitus. *Diabet Med* 2000; 17:360-4