

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA DEL SONNO**  
**XVIII CICLO**

**Settore scientifico disciplinari di afferenza: MED-26**

**TITOLO TESI**

**STUDIO DEI RITMI CIRCADIANI  
IN PAZIENTI IN STATO VEGETATIVO**

Presentata da: Dott.ssa ELISA SANCISI

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. PASQUALE MONTAGNA**

**Relatore**

**Prof. PASQUALE MONTAGNA**

Esame finale anno 2008-2009



## INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>PAG. 5</b>
<b>OBIETTIVI</b>	<b>PAG. 11</b>
<b>PARTE SPERIMENTALE 1</b>	
<b>METODO</b>	<b>PAG. 13</b>
<i>Etica</i>	<i>Pag. 13</i>
<i>Popolazione</i>	<i>Pag. 13</i>
<i>Protocollo di studio</i>	<i>Pag. 14</i>
<i>Analisi dei risultati</i>	<i>Pag. 16</i>
<i>Analisi statistica</i>	<i>Pag. 17</i>
<b>RISULTATI</b>	<b>PAG. 27</b>
<i>Campione dello studio</i>	<i>Pag. 27</i>
<i>Caratteristiche cliniche del campione e follow-up clinico</i>	<i>Pag. 27</i>
<i>Caratteristiche neuroradiologiche del campione</i>	<i>Pag. 27</i>
<i>Ciclo sonno-veglia</i>	<i>Pag. 31</i>
<i>Caratteristiche polisonnografiche ed analisi del sonno</i>	<i>Pag. 31</i>
<i>Confronto tra pazienti e controlli in condizioni basali</i>	<i>Pag. 55</i>
<i>Ritmo della Temperatura Corporea Interna</i>	<i>Pag. 59</i>
<i>Correlazione tra sonno e Temperatura Corporea Interna</i>	<i>Pag. 60</i>
<b>PARTE SPERIMENTALE 2</b>	
<b>METODO</b>	<b>PAG. 67</b>
<i>Etica</i>	<i>Pag. 67</i>
<i>Popolazione</i>	<i>Pag. 67</i>
<i>Protocollo di studio</i>	<i>Pag. 68</i>
<i>Valutazione quantitativa della soppressione della melatonina con la luce</i>	<i>Pag. 70</i>
<i>Analisi statistica</i>	<i>Pag. 71</i>

***RISULTATI*** ***PAG. 73***

---

*Campione dello studio* *Pag. 73*

*Caratteristiche cliniche del campione* *Pag. 73*

*Follow-up clinico del campione* *Pag. 74*

*Confronto dei valori di melatonina tra notte basale e notte test* *Pag. 74*

*Analisi dei profili di secrezione e soppressione della melatonina* *Pag. 74*

*Punteggi di soppressione della melatonina con la luce* *Pag. 79*

***CONCLUSIONI*** ***PAG. 83***

---

***BIBLIOGRAFIA*** ***PAG. 89***

---

## **INTRODUZIONE**

Lo stato vegetativo (SV) è un disturbo della coscienza caratterizzato da perdita del contenuto di coscienza (totale perdita delle funzioni cognitive con assenza di interazione con l'ambiente circostante) in presenza dello stato di coscienza (vigilanza) e persistenza delle funzioni vegetative (**Allegato 1**) [1]. I pazienti in stato vegetativo riacquistano la coscienza attraverso uno stadio, transitorio o definitivo, chiamato stato di minima coscienza (MCS), caratterizzato da limitati ed inconsistenti segni di consapevolezza [2]. Pazienti in tale stato presentano un primo segno di interazione volontaria con l'ambiente (**Allegato 2**). La vigilanza nei pazienti in stato vegetativo e in stato di minima coscienza è organizzata in ritmi circadiani di sonno-veglia. In letteratura sono presenti solo un numero limitato di studi, che hanno dimostrato una disorganizzazione del ritmo sonno-veglia con comparsa random di sonno durante il giorno e la notte in tali pazienti. Nei pazienti in stato vegetativo possono essere assenti elementi elettroencefalografici, che normalmente si susseguono nelle differenti fasi del sonno, come i fusi del sonno e le punte al vertice [3]. È stata inoltre riportata una riduzione delle attività fasiche del sonno REM, che potrebbe riflettere un possibile danno ai meccanismi colinergici del tegmento peduncolo-pontino [4]. È stata avanzata l'ipotesi che l'assenza di un ciclo sonno-veglia regolare e l'assenza di figure tipiche del sonno come i fusi del sonno [5] siano un indicatore della severità della disfunzione cerebrale e di conseguenza un segno prognostico sfavorevole per il recupero funzionale [6]. Tra i criteri diagnostici dello stato vegetativo e di minima coscienza è inclusa la presenza di completo o parziale mantenimento delle funzioni autonome ipotalamiche e del tronco encefalico: attività cardiaca, respirazione, temperatura, pressione sanguigna devono essere sufficientemente preservate per permettere la sopravvivenza [1]. Alterazioni della regolazione del sistema autonomo sono però state riscontrate in pazienti in stato vegetativo. In particolare sono state segnalate alterazioni della variabilità e nel pattern circadiano della pressione arteriosa e frequenza cardiaca in pazienti in stato vegetativo [7,8]. Fukudome e colleghi, hanno riscontrato un ritmo circadiano della temperatura preservato in 16 pazienti in stato vegetativo persistente [8]. Altri due studi hanno valutato il ritmo circadiano della temperatura in un gruppo di pazienti con trauma cranico grave, con media distanza dal trauma di circa 30 giorni ed hanno evidenziato un ritmo della temperatura free-running, superiore alle 24 ore, che potrebbe essere espressione del fatto che i pazienti con trauma cranico non sono sincronizzati da fattori ambientali, esterni [9]. Dauch e colleghi hanno

evidenziato un'alterazione del ritmo circadiano della temperatura in pazienti comatosi con lesioni del tronco encefalico [10].

I pazienti in stato vegetativo o di minima coscienza sembrerebbero essere particolarmente vulnerabili allo sviluppo di un deterioramento della ritmicità circadiana. Tale deterioramento potrebbe essere causato sia da alterazioni anatomo-funzionali del sistema di regolazione endogeno dei ritmi circadiani (l'orologio biologico localizzato a livello del nucleo ipotalamico soprachiasmatico e delle sue connessioni corticali e sottocorticali) sia da una riduzione dei sistemi di sincronizzazione esterni, come una riduzione dell'esposizione alla luce o a stimoli neurosensoriali come spesso si verifica in ambiente ospedaliero. La luce in particolare è considerata come il più forte stimolo (cue) per la sincronizzazione e la stabilizzazione dei ritmi circadiani [11], ma i livelli di esposizione alla luce nei pazienti ospedalizzati si sono dimostrati probabilmente non sufficienti a mantenere stabili i ritmi circadiani [12-13]. La fototerapia sta attualmente diventando un trattamento promettente per la terapia di numerosi disturbi caratterizzati da alterazioni dei ritmi circadiani. Buoni risultati sono stati ottenuti nella terapia dei disturbi del sonno e comportamentali in pazienti con demenza, nelle depressioni stagionali, in disturbi del sonno come la sindrome di fase di sonno avanzata e di fase ritardata e nel miglioramento del rendimento lavorativo di lavoratori turnisti. La fototerapia può essere considerata un trattamento cronobiologico perchè va a modulare la generazione e la regolazione dei ritmi circadiani, come il ritmo della temperatura corporea (determinandone un innalzamento), il ritmo sonno-veglia, i ritmi ormonali (soppressione melatonina, aumento dei livelli di cortisolo) e il ritmo riposo/attività andando a stimolare il nucleo ipotalamico soprachiasmatico [14-16]. La stimolazione con luce a bassa lunghezza d'onda (luce blu: 464-484 nm) è quella che si è dimostrata maggiormente utile nella sincronizzazione dei ritmi circadiani per il suo effetto soppressivo sulla melatonina [17-18]. Dati non definitivi sono presenti riguardo all'orario migliore per effettuare la stimolazione luminosa. Ancoli-Israeli e colleghi hanno dimostrato un miglioramento dei ritmi circadiani in pazienti dementi in seguito all'esposizioni durante le ore serali rispetto all'esposizione durante le ore del mattino [19]. Ruger e colleghi ha evidenziato variazioni del ritmo della temperatura corporea con riduzione della fisiologica caduta durante il sonno e aumento della frequenza cardiaca in soggetti sani in seguito all'esposizione notturna (12 a.m.-4 a.m.) [20]. Tali modificazioni non sono apprezzabili in seguito all'esposizione alla luce durante il giorno (12 p.m.-4 p.m.). Non vi sono a nostra conoscenza studi in letteratura che

valutino l'effetto della stimolazione luminosa in pazienti in stato vegetativo o di minima coscienza.

Nello studio di sonno e bioritmi e degli effetti della stimolazione luminosa potrebbe occupare un ruolo preminente lo studio delle concentrazioni della melatonina (MLT). Tra le funzioni fisiologiche della melatonina vi è infatti la regolazione dei ritmi circadiani per effetto sia sulla temperatura che sul sonno. La melatonina (N-acetil-5-metossitriptamina) è il principale ormone prodotto dalla ghiandola pineale. In tutti i vertebrati la concentrazione di melatonina circolante segue un evidente ritmo circadiano con valori maggiori durante la notte; gli elevati livelli notturni persistono per circa 5-7 ore e presentano un andamento pulsatile caratterizzato da due picchi: uno immediato all'inizio della notte, l'altro 3-4 ore più tardi. La secrezione della melatonina nell'uomo presenta alcuni aspetti particolari: vi è una forte variabilità inter-individuale nell'ampiezza del ritmo, tanto che in alcuni soggetti, in particolare anziani con disturbi del sonno, la secrezione notturna è scarsa o assente; nello stesso soggetto l'ampiezza e la forma del ritmo di secrezione sono, al contrario, altamente riproducibili giorno per giorno; l'ampiezza del ritmo della secrezione della melatonina diminuisce con l'età.

Nei mammiferi il ritmo circadiano della melatonina è guidato dai nuclei soprachiasmatici, che regolano la sintesi di melatonina tramite l'attivazione dell'enzima N-acetil-transferasi (NAT), che converte la serotonina in N-acetilserotonina. La regolazione avviene attraverso una via multisinaptica, che dai nuclei soprachiasmatici, innervati direttamente dalla retina tramite le fibre "non-visive" del tratto retino-ipotalamico, porta all'epifisi attraverso i nuclei paraventricolari dell'ipotalamo, i gangli cervicali superiori, i nervi carotidei interni ed infine i nervi conari. La luce ha la capacità di inibire direttamente, sempre tramite il tratto retino-ipotalamico, l'attivazione del NAT da parte dei nuclei soprachiasmatici e quindi di inibire la sintesi di melatonina. La curva fase-risposta della melatonina è esattamente opposta a quella determinata dalla luce [21]. La melatonina sembra quindi agire come un "dark pulse" e la sua produzione nei periodi di passaggio tra luce e buio (alba e tramonto) è vitale per la sincronizzazione del pacemaker circadiano. Studi recente suggeriscono che la melatonina può avere effetti specifici sull'induzione del sonno e sulla temperatura corporea, di cui determina un abbassamento temperatura corporea fondamentale per un sonno fisiologico [22]. In letteratura sono presenti solo tre lavori che valutano le concentrazioni della melatonina in pazienti con severo trauma cranico. Goscinski e colleghi correlarono le concentrazioni della melatonina delle ore 8 al livello di coscienza, determinato

attraverso la Glasgow Coma Scale, e non trovano alcuna correlazione tra i due parametri [23]. Moskala e colleghi studiarono le concentrazioni della melatonina in 5 pazienti con severo trauma cranico a distanza di 2-5 giorni dal trauma e in 2 controlli sani ed evidenziarono un'alterazione del ritmo circadiano della melatonina nei pazienti con trauma cranico per la presenza di differenze insignificanti tra i valori diurni e notturni della melatonina in tali pazienti [24]. Paparrigopoulos e colleghi trovarono che pazienti con trauma cranico ricoverati in terapia intensiva presentavano ridotti livelli di melatonina e un profilo di secrezione circadiano della melatonina alterato con relazione alla severità del trauma cranico. Il pattern di secrezione della melatonina era più chiaramente alterato in pazienti con trauma cranico severo, mentre pazienti con trauma cranico lieve presentavano un ritmo della melatonina relativamente intatto [25].

Non vi sono invece studi che valutino le concentrazioni di melatonina in pazienti in stato vegetativo, né che valutino l'effetto della stimolazione luminosa sulle concentrazioni della melatonina. Lo studio di tali concentrazioni in condizioni basali e in seguito a stimolazione con luce blu potrebbe permettere di valutare l'integrità della regolazione endogena della melatonina e di tutto l'asse retino-ipotalamico (responsabile della regolazione esogena) nei pazienti in stato vegetativo o di minima coscienza e ci consentirebbe di avere ulteriori informazioni diagnostiche e prognostiche su tali pazienti. Se tale asse infatti non fosse integro a causa delle lesioni sottostanti lo stato vegetativo o di minima coscienza, il ritmo della melatonina potrebbe subire delle alterazioni e soprattutto potrebbe essere assente l'effetto soppressivo della stimolazione luminosa. L'identificazione inoltre dell'integrità dell'intero asse retino-ipotalamico consentirebbe di identificare i pazienti in cui effettuare la stimolazione luminosa potrebbe essere utile per ottenere una regolarizzazione dei ritmi circadiani. Il test di soppressione della melatonina deve essere effettuato in corrispondenza del picco notturno della melatonina. Vi sono numerosi studi in letteratura che hanno effettuato tale test in soggetti sani. Da tali studi si evince che la massima soppressione della melatonina con stimolazione luminosa si ottiene dopo 30-45 minuti [26, 27, 18] con una durata di soppressione che prosegue per tutta la durata dell'esposizione [17, 18] con ritorno alla normalità dopo 3 ore e 21 minuti [17]. L'orario in cui è meglio fare la stimolazione luminosa per ottenere massimo effetto di soppressione è in corrispondenza della fase crescente della melatonina individuata per ogni soggetto, comunque tra le 23.30 e le 2.30 [26]. La lunghezza d'onda che si è dimostrata sopprimere maggiormente la melatonina è la 460 nm corrispondente alla luce blu [28, 17].

## Allegato 1

**Criteri diagnostici per lo stato vegetativo della “Multi-Society Task force on PSV”**  
(The Multi-Society task force on PVS. Medical aspects of the persistent vegetative state. N Engl J Med 1994; 330: 1499-508)

- nessuna evidenza di consapevolezza di sé e dell’ambiente e inabilità ad interagire con altri
- nessuna evidenza di risposte durevoli, riproducibili, orientate o risposte comportamentali volontarie a stimoli visivi, uditivi, tattili o nocicettivi
- nessuna evidenza di comprensione o espressione di linguaggio
- veglia intermittente manifestata dalla presenza di cicli sonno-veglia
- funzioni autonome ipotalamiche e troncoencefaliche sufficientemente preservate per permettere la sopravvivenza con assistenza medica ed infermieristica
- incontinenza urinaria e fecale
- riflessi del tronco (pupillare, oculocefalico, corneale, vestibolo-oculare) e riflessi spinali variamente preservati

## Allegato 2

**Criteri diagnostici per lo stato di minima coscienza dell’American Academy of Neurology** (Giacinto JT et al. The minimally conscious state. Definition and diagnostic criteria. Neurology 2002; 58: 349-353)

Lo stato di minima coscienza è una condizione di coscienza severamente alterata in cui è possibile dimostrare segni minimi ma certi di consapevolezza di sé o dell’ambiente.

Per potere porre diagnosi di MCS il paziente deve presentare limitati ma chiari segni di consapevolezza del sé e dell’ambiente dimostrati su una base riproducibile e sostenuta di uno o più dei seguenti comportamenti:

- eseguire semplici comandi
- risposta gestuale e verbale sì/no
- verbalizzazione intelligibile
- comportamenti significativi, compresi movimenti o comportamenti affettivi che si verificano in relazione contingente a rilevanti stimoli ambientali e non siano dovuti ad un’attività riflessa. Alcuni esempi di comportamenti significativi sono:
  - sorriso o pianto appropriato in risposta a un contenuto emozionale linguistico o visivo ma non ad argomenti o stimoli neutri
  - vocalizzazioni o gesti che si verificano in risposta al contenuto di domande
  - ricerca di oggetti che dimostra una chiara relazione tra la sede dell’oggetto e la direzione
  - toccare o tenere oggetti in un modo consono alla grandezza e alla forma dell’oggetto
  - movimenti oculari di inseguimento o fissazione sostenuta che si verifica in diretta risposta ad un oggetto significativo o in movimento



## **OBIETTIVI**

Lo studio è stato suddiviso in due parti sperimentali.

### **OBIETTIVI DELLA PARTE SPERIMENTALE 1**

Gli obiettivi della parte sperimentale 1 sono stati distinti in obiettivi primari e secondari.

#### *Obiettivi primari:*

- Studio dell'architettura del sonno in pazienti in stato vegetativo o in stato di minima coscienza;
- Valutazione del ritmo circadiano della temperatura corporea interna in pazienti in stato vegetativo o di minima coscienza;
- Valutazione delle variazioni stato dipendenti (sonno-veglia) della temperatura corporea interna in soggetti in stato vegetativo o in stato di minima coscienza.

#### *Obiettivi secondari:*

- correlazione dei risultati ottenuti relativi a sonno e bioritmi con parametri clinici-strumentali;
- valutazione degli effetti della stimolazione luminosa sul ritmo sonno-veglia e sui bioritmi dei pazienti in stato vegetativo o di minima coscienza. Sono stati valutati gli effetti immediati (durante il primo giorno di stimolazione) e tardivi (dopo una settimana di stimolazione luminosa)

### **OBIETTIVI DELLA PARTE SPERIMENTALE 2**

#### *Obiettivi:*

- valutazione delle concentrazioni della melatonina (MLT) in condizioni basali in pazienti in stato vegetativo e di minima coscienza
- valutazione dell'effetto soppressivo della stimolazione luminosa sulle concentrazioni della melatonina nei pazienti in stato vegetativo e di minima coscienza



## **METODO- PARTE SPERIMENTALE 1**

### **ETICA**

Questo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Ospedale Maggiore di Bologna nel dicembre 2006. Il consenso informato firmato è stato richiesto a tutti i familiari dei pazienti partecipanti allo studio e ai controlli. La raccolta ed il trattamento dei dati personali sono state condotte senza violare la riservatezza del soggetto, nella misura permessa dalla legge (Legge 675/96) e dalle regolamentazioni italiane applicabili.

### **POPOLAZIONE**

Tutti i soggetti in stato vegetativo secondo i criteri della “Multi-Society Task force on PSV” [1] o in stato di minima coscienza secondo i criteri dell’American Academy of Neurology [2] ricoverati presso la Casa dei Risvegli “Luca De Nigris” - Presidio Ospedaliero Bellaria-Maggiore - Bologna sono stati sottoposti ad uno screening per l’inclusione nello studio. Il reclutamento del campione si è svolto da gennaio 2007 a settembre 2008.

Di ogni paziente sono stati valutati:

- esame obiettivo neurologico (EON);
- scale di valutazione dello stato di coscienza e/o vigilanza, della responsività, dell’abilità cognitiva, del livello funzionale dei soggetti: LCF (Levels of Cognitive Functions) (**Allegato 3**) e DRS (Disability Rating Scale) (**Allegato 4**);
- esami ematochimici di routine;
- esami neuroradiologici (RMN o TAC cerebrale)
- terapie farmacologiche in atto.

Sono stati inclusi nello studio i pazienti risultati stabili, intendendo per stabilità l’assenza di infezioni locali o sistemiche in corso e un’EON (extracoscienza e/o vigilanza) stabile da almeno un mese.

Sono stati mantenuti stabili in terapia i farmaci ritenuti necessari per l’assistenza del paziente.

E’ stato incluso nello studio anche un gruppo di soggetti sani di controllo paragonabili per sesso e per età.

Criteri inclusione soggetti di controllo:

- non obesi (BMI<18);
- soggetti non fumatori;
- assenza di terapie farmacologiche in corso (consentito l'uso di contraccettivi orali);
- soggetti con valori di pressione arteriosa inferiori a 140 mmHg di sistolica e a 90 mmHg di diastolica.

### **PROTOCOLLO DI STUDIO (Figura 1)**

Tutti i pazienti clinicamente stabili e dopo le opportune eventuali variazioni terapeutiche sono stati studiati attraverso la valutazione del ritmo circadiano della temperatura corporea e del ciclo sonno-veglia.

La temperatura corporea interna e il ciclo sonno-veglia sono stati monitorizzati in maniera continua per 48 ore in condizioni sperimentali controllate:

- la temperatura rettale (T°cI) è stata rilevata ogni 2 minuti da un apparecchio portatile Mini-logger;
- il ciclo sonno-veglia è stato monitorizzato per mezzo di un apparecchio poligrafico ambulante (Vitaport II) attraverso la registrazione dei seguenti parametri:
  - elettroencefalogramma (EEG: C3-A2, C4-A1, O2-A1 o O1-A2);
  - elettroculogramma destro e sinistro (EOG);
  - elettromiogramma (EMG) del muscolo milojoideo;
  - elettromiogramma degli arti inferiori (EMG del muscolo tibiale anteriore di destra e di sinistra);
  - elettrocardiogramma (ECG);
  - saturazione arteriosa d'ossigeno (SaO<sub>2</sub>);
  - respiro toracico ed addominale: elemento essenziale per escludere possibili interferenze dovute a disturbi del respiro legati al sonno.

Le registrazioni dei pazienti in stato vegetativo o di minima coscienza sono state effettuate presso la Casa dei Risvegli. Durante lo studio i pazienti hanno vissuto in una stanza a temperatura (25±1°C) controllata e sono rimasti in posizione clinostatica. I pazienti hanno ricevuto una dieta di 1800 kcal al giorno frazionata in 3 pasti effettuati

mediante nutrizione enterale (ore 8, 12, 18). L'apporto idrico è stato libero, ma è stato quantificato e durante il periodo di registrazione è stato effettuato il bilancio idrico con monitoraggio della diuresi, considerando separatamente la diuresi dalle 8 alle 20 e diuresi dalle 20 alle 8. Sulle urine raccolte sono stati effettuati il dosaggio del cortisolo, acido vanilmandelico (VMA), dell'acido omovanilmandelico (HMA), dell'adrenalina e della nordrenalina. Era previsto un periodo di adattamento di 48 ore nella stessa stanza con lo stesso ciclo luce-buio e la stessa dieta. Il protocollo prevedeva due cicli di registrazione di 48 ore. Il primo giorno (GIORNO 1) la registrazione è stata effettuata in condizioni basali e i pazienti sono stati sottoposti ad un ciclo luce-buio determinato (periodo di buio dalle ore 23 alle ore 7). Il giorno successivo (GIORNO 2) i pazienti sono stati sottoposti a stimolazione luminosa durante la notte. La stimolazione luminosa è stata effettuata mediante una luce monocromatica riflessa sul soffitto da due apparecchi di illuminazione (Lampada Sivra-Guzzini<sup>®</sup>) a luce indiretta posti ai due lati del letto. La superficie del soffitto illuminata omogeneamente (di dimensioni pari a 100 cm x 150 cm), esattamente sopra il letto, era ad una distanza di 1,95 m dagli occhi del soggetto disteso nel letto (**allegato 5**). Ciascuna lampada è dotata di 38 LEDs per una potenza complessiva di 38 Watt con emissione di luce monocromatica a 470 nm. I valori di illuminamento sulla cornea del soggetto in studio (espressi in *lux*) sono stati misurati con Luxmetro Minolta CL-200 tarato secondo la curva di visibilità standard CIE per la luce bianca (36 *lux*) e i valori di luminanza (espressi in *cd/m<sup>2</sup>*) attraverso un luminanzometro. La sorgente emittente la luce (rappresentata dal soffitto in questo disegno sperimentale) ha un valore di irradianza di 58  $\mu W/cm^2$  (per l'emissione a 470 nm). I pazienti sono stati sottoposti a stimolazione con la luce blu tra le 23.30 e le 3.30 per una durata totale di esposizione pari a 4 ore. Durante la stimolazione luminosa i pazienti erano posizionati in posizione supina. Nei 5 giorni successivi il paziente ha continuato ad essere sottoposto a stimolazione con la luce durante la notte, ma non è stata effettuata alcuna registrazione. Il secondo ciclo di registrazione è stato effettuato in coincidenza del settimo giorno di stimolazione luminosa (GIORNO 3) e del giorno successivo al termine della stimolazione luminosa (GIORNO 4).

## **ANALISI DEI RISULTATI**

### *Ritmi circadiani di temperatura corporea interna*

L'analisi della ritmicità è eseguita valutando la serie temporale di T°cI con il metodo del cosinor [29] usando una procedura computerizzata [30]. Con questa procedura è possibile determinare se è presente o meno un ritmo nelle 24 ore ( $p < 0,05$ ) e misurare i seguenti parametri con il relativo intervallo di confidenza 95%:

- (1) mesor (Midline Estimating Statistic of Rhythm): ritmo medio aggiustato per le 24 ore;
- (2) ampiezza: la differenza tra il valore massimo alla acrofase e il mesor della curva cosinor;
- (3) acrofase: differenza tra il tempo di referenza (12 p.m.) e il tempo del più elevato valore della funzione cosinor usata per approssimare il ritmo. Il pattern temporale nelle 24 ore della T°cI viene valutato calcolando la media di ciascun parametro ogni 30 minuti.

### *Sonno*

Le fasi del sonno vengono individuate in accordo con i criteri standard di Rechtschaffen and Kales per epoche di 30 secondi [31]. Il sonno è valutato come leggero (fase 1-2 Non Rem), profondo (fasi 3-4 Non Rem) e REM (fase dei movimenti oculari rapidi). L'esordio del sonno è definito come il tempo in cui compaiono le prime 3 epoche di fase 1 o la prima epoca di fase 2, 3-4 o di fase REM dopo le ore 11 p.m. (inizio del buio). Il periodo totale di sonno è definito come l'intervallo tra luce "on" e luce "off" (ore 23-7). Il tempo totale di sonno (TST) è il tempo speso dormendo durante il periodo totale di sonno. La durata totale delle fasi 1-2-3-4 e REM è espressa in minuti e in percentuale di ogni fase rispetto al tempo totale. La efficienza del sonno è calcolata come tempo totale di sonno/periodo sonno x 100 (%). La veglia quieta è stata definita come una fase in cui i pazienti giacciono immobili ad occhi chiusi e presentano movimenti oculari lenti dell'addormentamento pur mantenendo un tracciato elettroencefalografico di veglia

### *Relazioni tra T°cI e sonno*

Per sincronizzare le fasi di sonno con i valori di T°cI vengono considerate epoche di 2 minuti e si considera la fase prevalente di sonno in quel periodo. Le variazioni stato-

dipendenti di T°cI sono valutate tra le 20 e le 8 del giorno successivo valutando il valore medio di T°cI durante la veglia e nelle fasi 1-2-3-4 e REM del sonno.

#### **ANALISI STATISTICA**

Le differenze tra i gruppi sono state analizzate con appropriati test parametrici e non parametrici (Student's *t*-test). Le variabili sono state considerate significativamente differenti se  $p < 0.05$ . L'analisi tra i diversi giorni di registrazione è stata effettuata attraverso l'analisi della varianza intaindividuale (ANOVA).

### **Allegato 3**

#### **LCF (Levels of Cognitive Functioning)**

##### **Uno strumento per seguire il recupero della coscienza e della comunicazione dopo il coma**

La persona: come si presenta, come si comporta, come si muove.

A) Il termine “Risposta” contraddistingue i Livelli 1-2-3. Questi livelli sono caratterizzati dalla assenza o dalla presenza e qualità del tipo di risposta, essenzialmente motoria e distinta in nessuna, generalizzata e localizzata, da parte della persona colpita in seguito alle stimolazioni ambientali.

##### **Livello 1) - NESSUNA RISPOSTA**

La persona come si presenta:

- non è responsiva a nessuna stimolazione.

##### **Livello 2) - RISPOSTA GENERALIZZATA**

La persona come si presenta:

- è responsiva in maniera aspecifica alle stimolazioni.

La persona come si comporta:

- risponde in maniera incostante e non finalizzata alle stimolazioni;
- le risposte non sono direttamente correlate al tipo di stimolo presentato, sono ritardate, di entità limitata e spesso uguali a prescindere dal tipo di stimolo presentato;
- le risposte possono consistere in modificazioni di parametri fisiologici (per es., frequenza del respiro), in movimenti grossolani e vocalizzazioni;
- la risposta più precoce a comparire è quella al dolore.

##### **Livello 3) - RISPOSTA LOCALIZZATA**

La persona come si presenta:

- è responsiva in maniera specifica alle stimolazioni.

La persona come si comporta:

- risponde in maniera incostante, ma finalizzata alle stimolazioni;
- le risposte sono direttamente correlate al tipo di stimolo presentato, come girare il capo verso un suono, fissare un oggetto presentato nel campo visivo, ritirare un'estremità e vocalizzare alla somministrazione di uno stimolo doloroso;
- può mostrare una vaga consapevolezza di sé e del proprio corpo e può reagire a situazioni di disagio, come tirarsi il sondino naso-gastrico, il catetere vescicale o cercare di togliersi i mezzi di contenzione;
- può restare ferma e tranquilla, quando non le vengono portate stimolazioni.

La persona come si muove:

- può eseguire ordini semplici seppure in maniera incostante e ritardata, come chiudere gli occhi, stringere la mano o estendere un arto;
- può differenziare le risposte, rispondendo ad alcune persone, soprattutto familiari e amici, e non ad altre.

### **INDICAZIONI A FAMILIARI E AMICI DEL PAZIENTE CON LCF 1 - 2 - 3**

- ✓ Portategli oggetti personali e foto di familiari e amici;
- ✓ parlategli con un tono di voce normale;
- ✓ quando arrivate, presentatevi e dategli dove si trova, che giorno e che momento della giornata è e perché si trova in ospedale;
- ✓ spiegategli sempre cosa state per fare, per es. “ora ti metto un cuscino sotto la testa”;
- ✓ siate brevi e semplici nelle frasi e nelle domande e, per es., invece di dire “puoi girare la testa verso di me?” è meglio dire “guardami”;
- ✓ abbiate pazienza nell’attendere la risposta e non perdetevi d’animo se non c’è risposta;
- ✓ rispettate i suoi periodi di riposo senza essere troppo incalzanti, perché in questa fase si affatica rapidamente e facilmente;
- ✓ limitate il numero dei visitatori (1 o 2 alla volta).

**B)** Il termine “Confuso” contraddistingue i Livelli 4-5-6. Questi livelli sono caratterizzati dalla presenza di uno stato di confusione, distinto in agitato, inappropriato e appropriato, presentato dalla persona colpita.

#### **Livello 4) - CONFUSO AGITATO**

La persona come si presenta:

- è in uno stato di iperattività.

La persona come si comporta:

- presenta un comportamento indifferente a quanto le accade intorno e reagisce principalmente al suo stato di confusione interiore, con grave difficoltà ad analizzare le informazioni provenienti dall’ambiente;
- spesso presenta un comportamento bizzarro e non finalizzato in rapporto al contesto ambientale, come piangere o gridare in modo sproporzionato rispetto agli stimoli, anche quando questi sono rimossi, cercare di togliersi le sonde, i cateteri o i mezzi di contenzione e di scendere dal letto;
- può essere confabulante con una verbalizzazione inappropriata rispetto al contesto ambientale e con caratteristiche di aggressività o di ostilità;
- può essere francamente aggressiva con necessità, a volte, di contenzione per evitare che si faccia male;
- presenta una capacità di attenzione molto limitata verso l’ambiente;
- l’attenzione selettiva è spesso inesistente, senza capacità di distinguere le persone e gli oggetti e di cooperare al trattamento;
- non essendo consapevole di quanto le accade e avendo una scarsa capacità di attenzione, non ha capacità di memoria a breve termine.

La persona come si muove:

- esegue ordini semplici ancora in modo incostante, ma se non ha menomazioni fisiche importanti, può eseguire attività motorie automatiche anche complesse, come sedersi e camminare, non necessariamente come atto intenzionale o su comando;
- non è in grado di eseguire attività finalizzate, come le attività di cura della propria persona, se non con molta assistenza.

#### **INDICAZIONI A FAMILIARI E AMICI DEL PAZIENTE CON LCF 4**

- ✓ Non scoraggiatevi e non risentitevi se si mostra agitato, ostile o aggressivo;
- ✓ non fategliene una colpa e non lo “sgridate”, ma, se possibile, fategli notare in modo calmo e rassicurante che non c’è nulla per cui agitarsi;
- ✓ ricordategli dove si trova e rassicuratelo sul fatto che è al sicuro;
- ✓ non forzate a fare qualcosa: è meglio dare ascolto a ciò che vuole fare e assecondarlo, a meno che non rischi di farsi male o di fare del male a qualcuno;
- ✓ accompagnatelo in brevi spostamenti, se le sue condizioni lo consentono, e mentre spingete la carrozzina, commentate il percorso parlandogli con voce calma.

#### **Livello 5) - CONFUSO INAPPROPRIATO**

La persona come si presenta:

- è vigile e attenta.

La persona come si comporta:

- può presentare un comportamento agitato non dovuto a fattori interni come nel livello 4, ma in conseguenza di stimolazioni esterne e usualmente sproporzionato rispetto allo stimolo;
- può essere ancora confabulante con una verbalizzazione spesso inappropriata, anche se, posta in una situazione facilitante e strutturata, può conversare in maniera “automatica” con frasi di convenienza e per brevi periodi;
- presenta una certa capacità di attenzione verso l’ambiente, ma è facilmente distraibile ed è incapace di attenzione selettiva verso uno specifico compito, se non è continuamente facilitata;
- la memoria è gravemente compromessa e fa confusione tra passato e presente.

La persona come si muove:

- esegue ordini semplici in maniera abbastanza costante, ma se i comandi sono complessi o non ci sono facilitazioni, le risposte sono casuali o frammentate rispetto agli obiettivi richiesti;
- manca d’iniziativa per eseguire compiti funzionali, ma può essere in grado di eseguire attività finalizzate, come le attività di cura di sé e alimentarsi con supervisione, anche se, spesso, è incapace di usare correttamente gli oggetti se non è aiutata da qualcuno;
- può essere capace di eseguire compiti appresi in precedenza, compiti che soprattutto riguardano il proprio corpo, il proprio benessere e comfort, spesso rispondendo meglio con i familiari o se posta in una situazione adeguata, ma non è capace di apprendere nuovi compiti;
- se è in grado di spostarsi, può vagare per il Reparto o mostrare l’intenzione di “andare a casa”, senza comprenderne i rischi o le difficoltà e la sua gestione assistenziale può diventare problematica e difficoltosa.

#### **INDICAZIONI A FAMILIARI E AMICI DEL PAZIENTE CON LCF 5**

- ✓ Ricordategli che giorno è della settimana, la data, il luogo e il motivo per cui si trova in ospedale, appena arrivate a visitarlo e prima di andare via;
- ✓ parlategli in modo chiaro, breve e calmo, evitando di vezzeggiarlo e compatirlo;

- ✓ ripetetegli ciò che si è detto ogni volta che è necessario: non pensate che ricordi ciò che gli avete detto;
- ✓ aiutatelo a organizzare e a iniziare attività semplici adatte alle sue capacità fisiche, per es.: il mangiare, il bere, il lavarsi i denti, lo sfogliare un album di foto, ecc. ecc.;
- ✓ concedetegli periodi di riposo e non scoraggiatevi se le sue prestazioni calano nel tempo, in quanto è ancora facilmente affaticabile.

### **Livello 6) - CONFUSO APPROPRIATO**

La persona come si presenta:

- è vigile e attenta.

La persona come si comporta:

- ha un comportamento finalizzato, ma necessita ancora di stimoli e facilitazioni esterne per indirizzarlo correttamente;
- ha ancora una diminuita capacità di attenzione e di analisi delle informazioni provenienti dall'ambiente, ma le risposte sono adeguate al contesto anche se possono essere ritardate o scorrette, a causa di problemi di memoria;
- l'attenzione selettiva al compito può ancora essere compromessa, specie nell'esecuzione di compiti difficili o in situazioni non "facilitanti", ma, a differenza del livello 5, riesce a eseguire in maniera corretta le normali attività di cura di sé;
- la memoria per gli eventi del passato è migliore rispetto a quella per gli eventi recenti.
- la risposta al disagio è appropriata e può sopportare stimoli anche fastidiosi e spiacevoli, come il sondino naso-gastrico, se le viene spiegata la ragione;
- ha una migliore consapevolezza di sé, dei suoi bisogni elementari (per es. il mangiare), è più adeguata nei rapporti con i familiari e può iniziare a riconoscere i componenti del team;
- può mostrare una iniziale consapevolezza delle situazioni e della difficoltà che ha nel rispondere.

La persona come si muove:

- esegue ordini semplici in maniera costante;
- mostra di avere iniziativa e di potere seguire le indicazioni per eseguire alcuni compiti funzionali in maniera autonoma, se si è esercitata (per es., attività di cura della propria persona), ma necessita di supervisione nelle attività abituali;
- è capace di apprendere nuovi compiti mai svolti prima, ma necessita di assistenza;
- non vaga più senza meta per il reparto e inizia ad avere un parziale orientamento nello spazio e nel tempo.

### **INDICAZIONI A FAMILIARI E AMICI DEL PAZIENTE CON LCF 6**

- ✓ Spiegargli che cosa sta facendo in Ospedale e il motivo delle cure che sta ricevendo;
- ✓ ripetergli ciò che si è detto, se necessario;
- ✓ discutere di fatti accaduti nel corso della giornata, non di giorni prima, perché è troppo difficile ricordarli;

- ✓ aiutarlo a iniziare e a continuare attività semplici adatte alle sue capacità fisiche: spesso è in grado di iniziarle da solo, ma poi “si perde” nell’esecuzione del compito, se non lo si aiuta a mantenere l’attenzione a ciò che sta facendo.

C) Il termine “Appropriato” contraddistingue i Livelli 7-8. Questi livelli sono caratterizzati dalla presenza di un comportamento appropriato, distinto in automatico e finalizzato, presentato dalla persona colpita in risposta alle stimolazioni e alle richieste ambientali.

### **Livello 7) – APPROPRIATO AUTOMATICO**

La persona come si presenta:

- è vigile e orientata;

La persona come si comporta:

- la persona è appropriata e orientata nell’ambiente terapeutico e domiciliare;
- non presenta confusione e si mostra sempre più consapevole della sua situazione, dei suoi problemi, dei suoi bisogni e necessità fisiche, della presenza dei famigliari, delle altre persone presenti intorno a lui e dell’ambiente in generale;
- ha recuperato una certa capacità di ricordare che cosa gli è successo, ma ha una superficiale consapevolezza della sua situazione generale, senza essere in grado di poterla analizzare nelle sue conseguenze, con scarsa capacità di critica e di giudizio (per es. non può guidare l’auto), di risoluzione dei problemi e senza essere in grado di fare programmi realistici per il futuro.

La persona come si muove:

- può utilizzare nuove abilità, ma con difficoltà e in maniera parziale e necessita di una supervisione, seppure minima, per difficoltà di apprendimento e per motivi di sicurezza;
- è autonoma nelle attività di cura della propria persona e svolge le sue attività di vita quotidiana anche se in maniera automatica e in modo simile a un robot, con minima o assente confusione e con parziale ricordo di quello che sta facendo;
- in un ambiente strutturato e facilitante, può essere capace di iniziare in maniera autonoma alcune attività pratiche, ricreative o sociali verso le quali mostra interesse.

### **Livello 8) – APPROPRIATO FINALIZZATO**

La persona come si presenta:

- è vigile e orientata,

La persona come si comporta:

- è appropriata e consapevole della sua situazione;
- è capace di ricordare e integrare eventi passati e recenti e può presentare livelli di capacità intellettuale, di adattamento emozionale e di abilità relazionali sociali ancora inferiori rispetto a prima, ma che comunque ne consentono il reinserimento sociale e lavorativo;
- può continuare a presentare una riduzione delle proprie capacità riguardo alla velocità e adeguatezza nell’analisi delle informazioni, nel ragionamento astratto,

nella tolleranza dello stress e della capacità di critica e di giudizio in situazioni di emergenza o in circostanze non abituali.

La persona come si muove:

- può utilizzare nuove abilità, purchè accettabili e compatibili con il suo stile di vita, senza necessità di supervisione una volta apprese;
- nei limiti delle sue eventuali difficoltà fisiche, è indipendente e autonoma nell'esecuzione delle attività della vita quotidiana domiciliare e sociale (per es. può guidare l'auto).

#### **INDICAZIONI A FAMILIARI E AMICI DEL PAZIENTE CON LCF 7 - 8**

- ✓ Trattare da adulto, non in modo infantile, offrendogli guida e aiuto nel prendere le decisioni, ma senza scegliere per lui, quando possibile;
- ✓ aiutarlo a riconoscere le sue difficoltà sia sul piano fisico (debolezza, difficoltà di coordinazione, ecc.) che mentale (difficoltà di memoria, di concentrazione, ecc.), senza drammatizzare e senza criticare;
- ✓ incoraggiarlo a parlare delle sue sensazioni e di come si sente;
- ✓ discutere delle situazioni che lo infastidiscono o che lo fanno irritare e di come poterle affrontare;
- ✓ spiegarli che tutto questo è dovuto al suo trauma, facendo attenzione a non usare giochi di parole o espressioni gergali, perché può fraintenderne il significato;
- ✓ incoraggiarlo a impegnarsi nella terapia: se tende a negare le sue difficoltà, non bisogna assecondarlo, ma cercare di farlo riflettere su queste;
- ✓ incoraggiarlo a essere il più autonomo possibile nelle attività di vita quotidiana.

**Allegato 4**

**DISABILITY RATING SCALE (DRS)**

**Vigilanza consapevolezza e responsività**

<p>Apertura degli occhi:</p> <p>0 = spontanea 1 = alla parola 2 = al dolore 3 = nessuna</p> <p style="text-align: right;"><input type="checkbox"/></p>	<p>Abilità di comunicazione:</p> <p>0 = orientata 1 = confusa 2 = inappropriata 3 = incomprensibile 4 = nessuna</p> <p>(in caso di tracheotomia barrare la T, in caso di disartria, diafonia, afasia barrare la D)</p> <p style="text-align: right;"><input type="checkbox"/></p>	<p>Miglior risposta motoria:</p> <p>0 = su ordine 1 = localizzata 2 = generalizzata 3 = in flessione 4 = in estensione 5 = nessuna</p> <p style="text-align: right;"><input type="checkbox"/></p>
--	---	---

**Abilità cognitiva per le attività della cura di sé:**  
(Il paziente sa come e quando? Ignorare la disabilità motoria)

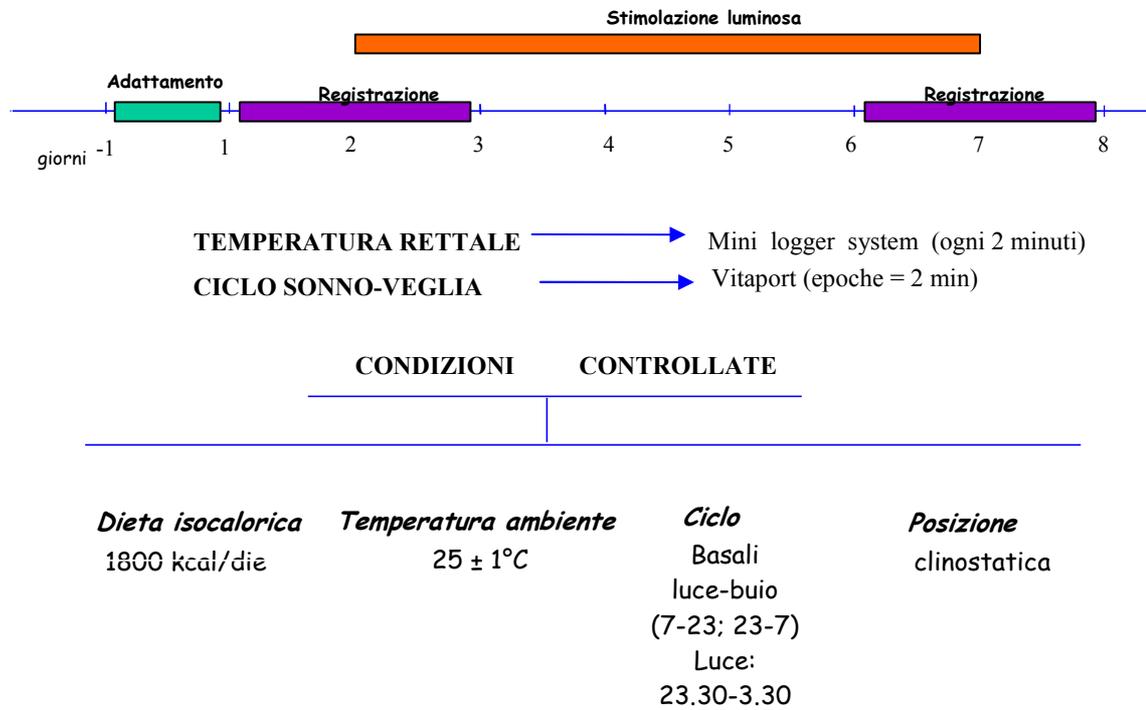
<p>Nutrirsi:</p> <p>0 = completa 1 = parziale 2 = minima 3 = nessuna</p> <p style="text-align: right;"><input type="checkbox"/></p>	<p>Sfinteri:</p> <p>0 = completa 1 = parziale 2 = minima 3 = nessuna</p> <p style="text-align: right;"><input type="checkbox"/></p>	<p>Rassettarsi:</p> <p>0 = completa 1 = parziale 2 = minima 3 = nessuna</p> <p style="text-align: right;"><input type="checkbox"/></p>
---	---	--

<p><b>Livello funzionale:</b></p> <p>0 = completa indipendenza 1 = indipendenza con particolare necessità ambientali 2 = dipendenza lieve 3 = dipendenza moderata 4 = dipendenza marcata 5 = dipendenza totale</p> <p style="text-align: right;"><input type="checkbox"/></p>	<p><b>Impiegabilità:</b></p> <p>0 = non ristretta 1 = impieghi selezionati (competitivi) 2 = lavoro protetto (non competitivo) 3 = non impiegabile</p> <p style="text-align: right;"><input type="checkbox"/></p>
---	---

Categorie di disabilità		Punteggio complessivo
Nessuna disabilità	<input type="radio"/>	0
Disabilità lieve	<input type="radio"/>	1
Disabilità parziale	<input type="radio"/>	2 - 3
Disabilità moderata	<input type="radio"/>	4 - 6
Disabilità moderatamente severa	<input type="radio"/>	7 - 11
Disabilità severa	<input type="radio"/>	12 - 16
Disabilità estremamente severa	<input type="radio"/>	17 - 21
Stato vegetativo	<input type="radio"/>	22 - 24
Stato vegetativo grave	<input type="radio"/>	25 - 29
Morte	<input type="radio"/>	30

**Figura 1:** Protocollo di studio

## PROTOCOLLO



**Figura 2:** Lampade SIVRA- iGuzzini



## **RISULTATI- PARTE SPERIMENTALE 1**

### **CAMPIONE DELLO STUDIO**

Sono stati reclutati 8 pazienti (5 maschi e 3 femmine; età media  $32\pm 8$  anni) e 8 controlli (6 maschi e 2 femmine; età media  $40\pm 8$  anni).

### **CARATTERISTICHE CLINICHE DEL CAMPIONE E FOLLOW-UP CLINICO**

In tabella 1 sono riportate le principali caratteristiche cliniche del campione dei pazienti. Al momento della valutazione tutti i pazienti erano in uno stato vegetativo in accordo ai criteri della “Multi-Society Task force on PSV” [1]. In tutti i pazienti l’eziologia dello stato vegetativo era post-traumatica. La distanza media dal trauma nel momento della registrazione era di  $185\pm 102$  giorni (minimo 70 giorni; massimo 387 giorni). In due pazienti (pz 3 e pz 5) è stato necessario interrompere lo studio per il subentrare di condizioni cliniche non più stabili: nel paziente 3 in corrispondenza del giorno 3 di registrazione, mentre nel paziente 5 in corrispondenza del giorno 4 di registrazione.

Nella tabella 2 è riportato l’esame obiettivo neurologico (EON) del campione dei pazienti al momento dell’inclusione nello studio.

Degli 8 pazienti inclusi nello studio, 5 pazienti (paziente 1, 2, 3, 5 e 8) non hanno presentato modificazioni del quadro clinico e permangono in uno stato vegetativo (LCF 2). Il paziente 2, a distanza di 1 mesi, dallo studio è progredito in uno stato di MCS (LCF 3) e dopo altri due mesi in uno stato di disabilità grave (LCF 5). Attualmente è in uno stato di disabilità moderata (LCF 7). La paziente 3, a distanza di 10 mesi dallo studio, è progredita verso uno stato di MCS (LCF 3) e a distanza di altri 4 mesi è progredita in uno stato di disabilità grave, in cui permane tuttora (LCF 5). Il paziente 5, a distanza di 8 mesi dallo studio, è progredito in uno stato di MCS (LCF 3) e a distanza di altri 4 mesi è progredito verso uno stato di disabilità grave, in cui permane tuttora (LCF 5).

### **CARATTERISTICHE NEURORADIOLOGICHE DEL CAMPIONE**

Le caratteristiche neuroradiologiche del campione sono state valutate mediante RMN cerebrale, in tutti i pazienti eccetto il paziente 3 e 5, in cui è stata effettuata attraverso TAC cerebrale (Tabella 3).

**Tabella 1.** Caratteristiche cliniche dei pazienti al momento dell'inclusione nello studio

	<b>Distanza trauma (giorni)</b>	<b>GCS iniziale</b>	<b>Comorbilità pre-evento</b>	<b>Interventi neurochirurgici</b>	<b>Crisi neurovegetative</b>	<b>LCF</b>	<b>DRS</b>	<b>Terapie in atto</b>
Pz 1: M, 24 aa	70	4	no	craniectomia decompressiva	presenti	2/8	23/30	Metoprololo 200 mg/die
Pz 2: F, 34 aa	235	6	idrocefalo congenito	misurazione PIC	pregresse	2/8	23/30	Clonidina TTS1 Bisoprololo 5 mg/die
Pz 3: M, 28 aa	387	3	no	derivazione ventricolo-perit	pregresse	2/8	27/30	Nessuna
Pz 4: F, 38 aa	128	5	no	craniectomia decompressiva	pregresse	2/8	24/30	Clonidina TTS1
Pz 5: M, 37 aa	78	4	no	craniectomia decompressiva	presenti	2/8	22/30	Clonidina TTS1 Propranololo 80 mg/die
Pz 6: F, 47	223	3	no	no	assenti	2/8	24/30	Olanzapina 5 mg/die
Pz 7: M, 20 aa	165	-	no	no	assenti	2/8	24/30	Olanzapina 2.5 mg/die
Pz 8: M, 30 aa	195	3	no	misurazione PIC	presenti	2/8	24/30	Olanzapina 2.5 mg/die

Pz, paziente; GCS, Glasgow Coma Scale; PIC, pressione intracranica ; LCF, Level of Cognitive Functioning; DRS, Disability Rating Scale; TTS, sistema transdermico

**Tabella 2.** EON dei pazienti al momento dell'inclusione nello studio

<b>EON</b>	
Pz 1: M, 24 aa	pz vigile, ad occhi aperti, esplora l'ambiente con lo sguardo; motilità attiva spontanea AS sx e AI dx; deviazione del capo verso sx; sindrome piramidale bilaterale; riflessi arcaici; automatismi oro-mandibolari, sbadigli
Pz 2: F, 34 aa	pz vigile ad occhi aperti, non in contatto con l'ambiente; motilità attiva assente; iperalgesia trigeminale dx; deviazione del capo verso sx; atteggiamento in decerebrazione emisoma sx e decorticazione emisoma dx; riflessi arcaici; automatismi oro-mandibolari, sbadigli
Pz 3: M, 28 aa	pz ad occhi chiusi (ptosi palpebrale bilaterale), non in contatto con l'ambiente, non esegue ordini; motilità attiva assente; strabismo divergente occhio sx; deviazione del collo a sx, atteggiamento in decerebrazione; ipotrofia ed ipotonia muscolare diffusa; respirazione orale con scarso interessamento diaframmatico, apnee ripetute e prolungate; automatismi oro-mandibolari
Pz 4: F, 38 aa	pz vigile, ad occhi aperti, non in contatto con l'ambiente, esplora l'ambiente con lo sguardo; motilità attiva ai 4 arti; deviazione del capo verso sx; atteggiamento in decorticazione emisoma dx e decerebrazione emisoma sx; riflessi arcaici; sbadigli, automatismi oro-mandibolari
Pz 5: M, 37 aa	pz vigile, ad occhi aperti, esplora l'ambiente con lo sguardo; motilità attiva spontanea AI sx; deviazione del capo e occhi a dx; atteggiamento in decorticazione; riflessi arcaici
Pz 6: F, 47	pz vigile, ad occhi aperti, esplora l'ambiente con lo sguardo; motilità attiva spontanea AS sx; miosi OD, midriasi OS; deviazione del capo a dx; doppia emiplegia; riflessi arcaici; movimenti oro-mandibolari
Pz 7: M, 20 aa	pz vigile, ad occhi aperti, esplora l'ambiente con lo sguardo; motilità attiva spontanea AASS e AI sx; strabismo con esoforia OD; sindrome piramidale bilaterale
Pz 8: M, 30 aa	pz vigile, ad occhi aperti, non segue con lo sguardo; motilità attiva AS sx; midriasi OD, miosi OS; lieve risposta allo stimolo luminoso; capo deviato verso dx; strabismo divergente; atteggiamento globale in decorticazione
Pz, paziente; AS, arto superiore; AI, arto inferiore; AASS, arti superiori; sx; sinistro; dx, destro; OD, occhio destro; OS, occhio sinistro	

**Tabella 3:** Caratteristiche neuroradiologiche del campione

	<b>corteccia</b>	<b>Sostanza bianca</b>	<b>Strutture encefaliche</b>	<b>tronco-</b>	<b>Nuclei della base</b>	<b>Sistema ventricolare</b>
Pz 1: M, 24 aa	esiti malacici in sede frontale anteriore bilaterale e temporale dx	diffusa iperintensità di segnale (>dx); DAD 2/3 posteriori del corpo calloso	no		no	dilatazione ex vacuo corno occipitale ventricolo laterale dx e di tutto il sistema ventricolare
Pz 2: F, 34 aa	vasta area malacica frontale sx, e minore, frontale dx	area malacica nel corpo calloso	no		no	raccolta subdurale frontale dx, con compressione ventricolo laterale corrispondente
Pz 3: M, 28 aa	craniotomia fronto-temporale dx; lesione ischemica emisferica dx	no	ipodensità pontina e del peduncolo cerebellare medio sx		esiti malacici bilaterali, compreso il talamo	marcata dilatazione corni frontale e temporale dx, in minor misura del ventricolo laterale dx e del terzo ventricolo; falda sottodurale emisferica sx
Pz 4: F, 38 aa	esito malacico lobo frontale dx, erniato attraverso craniectomia; focolai lacero-contusivi in sede temporale bilaterale (>dx)	no	no		no	ampio con pervietà cistica setto pellucido
Pz 5: M, 37 aa	esito malacico fronto-parietale sx	no	no		no	ematoma extradurale fronto-temporo-parietale dx; sistema ventricolare compresso e dislocato verso sx
Pz 6: F, 47 aa	no	sofferenza vascolare periventricolare	sfumata sofferenza vascolare pontina		lesione talamica sx	dilatazione sistema ventricolare
Pz 7: M, 20 aa	DAD frontale dx al vertice e frontale sx parasagittale	area malacica semiovale sx; DAD splenio corpo calloso	no		no	modicamente ampio
Pz 8: M, 30 aa	DAD fronto-temporale bilaterale; esito malacico frontale sx	no	DAD mesencefalo bilaterale, bulbo dx, ponte sx,		DAD talamo dx e capsulo-lenticolare sx	dilatati spazi subaracnoidei in sede frontale; asimmetria ventricoli laterali per sx>dx

DAD, danno assonale diffuso; dx, destro;; sx, sinistro

## CICLO SONNO-VEGLIA

### Caratteristiche polisonnografiche ed analisi del sonno

#### *Paziente 1*

Il tracciato di veglia del paziente 1 è caratterizzato da un'attività delta, con sovrimposte frequenze più rapide ed artefatti da movimento, e da movimenti oculari rapidi. Il tracciato di veglia quieta è caratterizzato dalla comparsa di movimenti oculari lenti dell'addormentamento pur mantenendo un tracciato elettroencefalografico di veglia. Le fasi di sonno leggero sono caratterizzate dalla comparsa di un'attività theta, dalla presenza di movimenti oculari lenti dell'addormentamento e da abbozzi degli elementi caratteristici della fase 2 di sonno NREM (fusi del sonno e K-complessi) evidenti sulle regioni centrali. Le fasi di sonno profondo sono caratterizzate dalla comparsa di un'attività delta polimorfa, con frammenti abbozzi di spindles. Le fasi di sonno REM sono caratterizzate da un tracciato di bassa ampiezza, a volte frammentato da onde aguzze (del tipo a denti di sega), e da movimenti oculari rapidi (**Figura 3**). La presenza di un artefatto continuo sul canale registrante l'attività del muscolo miloideo e dei muscoli tibiali anteriori impedisce di valutare se presente la fisiologica atonia della fase REM e se presenti i movimenti periodici degli arti in sonno (PLMS).

Nel GIORNO 1 il paziente presenta un tempo totale di sonno (TST) nelle 24 ore ridotto (285.5 minuti), con un'efficienza del sonno (SE) pari a 19.8%. È presente una ridotta efficienza del sonno notturno (24.8%). In due occasioni in seguito a risveglio prolungato il paziente si addormenta in fase REM. Nelle ore diurne il paziente presenta numerose oscillazioni del livello di vigilanza e 5 addormentamenti, di cui due in sonno REM, per un TST di 167.5 minuti (SE=17.4%). Nel GIORNO 2 si conferma un tempo totale di sonno nelle 24 ore ridotto (194 minuti) con una efficienza del sonno pari a 13.5%. Si conferma una ridotta efficienza del sonno notturno (19.4%). In un'occasione in seguito a risveglio prolungato il paziente si addormenta in fase REM. Durante le ore diurne (precedenti la stimolazione luminosa) il paziente presenta numerose oscillazioni del livello di vigilanza ed due addormentamenti in sonno NREM per una durata di TST pari a 101 (SE=10.5%). Nel GIORNO 3 si segnala un aumento del tempo totale di sonno (TST=634 minuti, SE=44%), sia diurno che notturno, con incremento delle fasi di sonno profondo. Nelle ore diurne sono presenti continue oscillazioni del livello di vigilanza e 8 addormentamenti, 5 dei quali in REM. Nel GIORNO 4 si segnala una

riduzione del tempo totale di sonno nelle 24 ore (TST=218 minuti, SE=15%) ed una ridotta efficienza del sonno notturno. Il sonno notturno è caratterizzato dall'addormentamento in fase REM, dalla prevalenza delle fasi di sonno leggero e da risvegli frequenti. Durante le ore diurne il paziente presenta 6 addormentamenti, tre dei quali in fase REM, per un totale di tempo di sonno pari a 146 minuti. Nelle 4 giornate il paziente ha trascorso una media di 132 minuti in una fase di veglia quieta (**Figura 4**).

#### *Paziente 2*

Il tracciato di veglia della paziente 2 è caratterizzato da un'attività theta-delta, con sovrimposte frequenze alfa ed artefatti da movimento, e da movimenti oculari rapidi. Il tracciato di veglia quieta è caratterizzato dalla comparsa di un'attività alfa e da movimenti oculari lenti dell'addormentamento. Le fasi di sonno leggero sono caratterizzate dalla comparsa di un'attività theta, dalla presenza di movimenti oculari lenti dell'addormentamento e da abbozzi degli elementi caratteristici della fase 2 di sonno NREM (fusi del sonno e K-complessi). Le fasi di sonno profondo sono caratterizzate dalla comparsa di un'attività theta-delta polimorfa. Le fasi di sonno REM sono caratterizzate da un tracciato di bassa ampiezza, a volte frammisto da onde aguzze (del tipo a denti di sega), e da movimenti oculari rapidi (**Figura 5**). La presenza di un artefatto continuo sul canale registrante l'attività del muscolo miloideo e dei muscoli tibiali anteriori impedisce di valutare se presente la fisiologica atonia della fase REM e se presenti i movimenti periodici degli arti in sonno (PLMS).

Nel GIORNO 1 la paziente presenta un tempo totale di sonno nelle 24 ore ridotto (197.5 minuti), con un'efficienza del sonno pari a 13.7%. Tale sonno è concentrato soprattutto nelle ore notturne (TST=161 minuti), dove la paziente presenta un'efficienza del sonno pari a 33.5%. Il sonno notturno si caratterizza dalla prevalenza delle fasi di sonno leggero (53,4%) e della fase REM (34.8%) e dall'addormentamento in fase REM. In un'occasione, in seguito a risveglio prolungato, la paziente si addormenta in fase REM. Nelle ore diurne il paziente presenta numerose oscillazioni del livello di vigilanza e 2 addormentamenti, uno in sonno REM, per un TST di 36.5 minuti. Nel GIORNO 2 si conferma un tempo totale di sonno nelle 24 ore ridotto (242 minuti) con un'efficienza del sonno pari a 16.8%. Anche in questa giornata, tale sonno è concentrato nelle ore notturne (TST=163 minuti), dove la paziente presenta un'efficienza del sonno notturno ridotta (33.9%). Il sonno notturno è sempre caratterizzato dalla prevalenza delle fasi di sonno leggero (80.3%) a scapito delle fasi di sonno profondo (1.2%). In un'occasione,

in seguito a risveglio prolungato, la paziente si addormenta in fase REM. Durante le ore diurne (precedenti la stimolazione luminosa) la paziente presenta oscillazioni del livello di vigilanza e tre addormentamenti in sonno REM per un TST pari a 79 minuti (SE=8.2%). Nel GIORNO 3 si segnala un aumento del tempo totale di sonno (TST=367 minuti, SE=25.5%), sia diurno che notturno, con un lieve incremento delle fasi di sonno profondo. Il sonno notturno è sempre però caratterizzato dalla prevalenza delle fasi di sonno leggero e di sonno REM e dall'addormentamento in fase REM. Nelle ore diurne sono presenti delle oscillazioni del livello di vigilanza e 4 addormentamenti, uno dei quali in REM. Nel GIORNO 4 si segnala una riduzione del tempo totale di sonno nelle 24 ore (TST=210 minuti, SE=14.5%) rispetto alla giornata precedente ed una ridotta efficienza del sonno notturno (SE=27.5%). Il sonno notturno è sempre caratterizzato dall'addormentamento in fase REM e dalla prevalenza delle fasi di sonno leggero. Durante le ore diurne la paziente presenta 2 addormentamenti, uno dei quali con latenza REM ridotta, per un totale di tempo di sonno pari a 78 minuti. Nelle 4 giornate la paziente ha trascorso una media di 152 minuti in una fase di veglia quieta (**Figura 6**).

### *Paziente 3*

Il tracciato di veglia del paziente 3 è caratterizzato da un'attività theta-delta, con sovrimposti artefatti oculari e da movimento, e da movimenti oculari rapidi. Non sono state registrate fasi di veglia quieta. Le fasi di sonno leggero sono caratterizzate dalla comparsa di un'attività theta, dalla riduzione dei movimenti oculari della veglia e da abbozzi degli elementi caratteristici della fase 2 di sonno NREM (fusi del sonno e K-complexi). Le fasi di sonno profondo sono caratterizzate dalla comparsa di un'attività theta-delta polimorfa. Le fasi di sonno REM sono caratterizzate da un tracciato di bassa ampiezza, a volte frammisto da onde aguzze (del tipo a denti di sega), e da movimenti oculari rapidi (**Figura 7**). La presenza di un artefatto continuo sul canale registrante l'attività del muscolo miloideo e dei muscoli tibiali anteriori impedisce di valutare se presente la fisiologica atonia della fase REM e se presenti i movimenti periodici degli arti in sonno (PLMS).

Nel GIORNO 1 il paziente presenta un tempo totale di sonno molto ridotto, pari a 94 minuti, con un'efficienza del sonno pari a 6.5%. Nelle ore notturne il pattern ipnico è caratterizzato da brevi addormentamenti e dalla sola presenza delle fasi di sonno leggero (100%). Nelle ore diurne il paziente presenta oscillazioni del livello di vigilanza e due addormentamenti, in cui il paziente raggiunge le fasi di sonno profondo.

Nel giorno 2 si osserva un incremento del tempo totale di sonno (TST=257.5 minuti), sia per incremento del sonno diurno antecedente alla stimolazione luminosa sia del sonno notturno. Si osserva inoltre un incremento delle fasi di sonno profondo nelle ore diurne antecedenti la stimolazione luminosa. In nessuna giornata sono state registrate fasi di sonno REM, né veglia quieta (**Figura 8**).

#### *Paziente 4*

Il tracciato di veglia della paziente 4 è caratterizzato da un'attività delta, con sovrimposte frequenze più rapide ed artefatti da movimento, e da movimenti oculari rapidi. Il tracciato di veglia quieta è caratterizzato dalla comparsa di un'attività alfa, frammista ad attività theta-delta e da movimenti oculari lenti dell'addormentamento. Le fasi di sonno leggero sono caratterizzate dalla comparsa di un'attività theta, dalla presenza di movimenti oculari lenti dell'addormentamento e da abbozzi degli elementi caratteristici della fase 2 di sonno NREM (fusi del sonno e K-complessi). Le fasi di sonno profondo sono caratterizzate dalla comparsa di un'attività theta-delta polimorfa. Le fasi di sonno REM sono caratterizzate da un tracciato di bassa ampiezza, a volte frammisto da onde aguzze (del tipo a denti di sega), e da movimenti oculari rapidi (**Figura 9**). La presenza di un artefatto continuo sul canale registrante l'attività del muscolo miloideo e dei muscoli tibiali anteriori impedisce di valutare se presente la fisiologica atonia della fase REM e se presenti i movimenti periodici degli arti in sonno (PLMS)

Nel GIORNO 1 la paziente presenta un tempo totale di sonno ridotto (TST=365 minuti) ed un'efficienza del sonno pari al 25.3%. Il pattern ipnico notturno è caratterizzato dalla prevalenza delle fasi di sonno leggero e da una efficienza del sonno pari a 46.6%. Non sono state registrate fasi REM. Nelle ore diurne presenta diversi addormentamenti, per un tempo totale di sonno pari a 141 minuti. Nel GIORNO 2 il tracciato non è interpretabile per la presenza di un artefatto per gran parte della registrazione. Nel GIORNO 3 la paziente presenta un tempo totale di sonno ridotto (187 minuti) e un'efficienza del sonno pari a 12.9%. Il pattern ipnico è notturno è sempre caratterizzato dalla prevalenza delle fasi di sonno leggero. Dopo un risveglio prolungato la paziente si addormenta in fase REM. Nelle ore diurne la paziente presenta alcuni brevi addormentamenti e due addormentamenti più prolungati in cui raggiunge le fasi di sonno NREM. Nel GIORNO 4 si conferma una riduzione del tempo totale di sonno (TST=246 minuti) con un'efficienza del sonno pari a 17%. Tale sonno si concentra

soprattutto nelle ore diurne (TTS=167 minuti, SE=17.4%), dove la paziente presenta numerosi addormentamenti, uno dei quali in fase REM. Durante la notte, si conferma un pattern ipnico caratterizzato dalle sole fasi di sonno leggero (100%). Nelle 4 giornate la paziente ha trascorso una media di 100 minuti in una fase di veglia quieta (**Figura 10**).

#### *Paziente 5*

Il tracciato di veglia del paziente 5 è caratterizzato da un'attività theta/delta, con sovrimposte attività rapide e artefatti da movimento, e da movimenti oculari rapidi. Il tracciato di veglia quieta è caratterizzato da un'attività alfa, frammista ad attività theta, e dalla comparsa di movimenti oculari lenti dell'addormentamento. Le fasi di sonno leggero sono caratterizzate dalla comparsa di un'attività theta, dalla presenza di movimenti oculari lenti dell'addormentamento e dalla comparsa degli elementi caratteristici della fase 2 di sonno NREM (fusi del sonno e K-complessi). Le fasi di sonno profondo sono caratterizzate dalla comparsa di un'attività theta-delta polimorfa, con sovrimposta un'attività rapida. Le fasi di sonno REM sono caratterizzate da un tracciato di bassa ampiezza, a volte frammisto da onde aguzze (del tipo a denti di sega), e da movimenti oculari rapidi (**Figura 11**). La presenza di un artefatto continuo sul canale registrante l'attività del muscolo miloideo e dei muscoli tibiali anteriori impedisce di valutare se presente la fisiologica atonia della fase REM e se presenti i movimenti periodici degli arti in sonno (PLMS).

I giorni 1 e 3 non sono interpretabili per la presenza di artefatti tecnici per tutta la registrazione. Nel GIORNO 2 si evidenzia un tempo totale di sonno nelle 24 ore ridotto (414 minuti) e una ridotta efficienza del sonno (28.7%). Il pattern ipnico notturno (TST=239 minuti) si caratterizza per la scarsa presenza di fase REM. Durante le ore diurne (successive la stimolazione luminosa) il paziente presenta brevi addormentamenti in sonno NREM e un addormentamento più prolungato in cui raggiunge la fase REM. Il paziente ha trascorso circa 95 minuti in una fase di veglia quieta (**Figura 12**).

#### *Paziente 6*

Il tracciato di veglia della paziente 6 è caratterizzato da un'attività alfa frammista ad attività theta, con sovrimposti artefatti da movimento, e da movimenti oculari rapidi. Il tracciato di veglia quieta è caratterizzato da un'attività alfa frammista ad attività theta e da movimenti oculari lenti dell'addormentamento. Le fasi di sonno leggero sono

caratterizzate dalla comparsa di un'attività theta, dalla presenza di movimenti oculari lenti dell'addormentamento e da elementi caratteristici della fase 2 di sonno NREM (fusi del sonno e K-complessi) ben caratterizzati. Le fasi di sonno profondo sono caratterizzate dalla comparsa di un'attività theta-delta polimorfa, frammista ad un'attività rapida. Le fasi di sonno REM sono caratterizzate da un tracciato di bassa ampiezza, a volte frammisto da onde aguzze (del tipo a denti di sega), da movimenti oculari rapidi e da atonia del muscolo miloideo (**Figura 13**). La presenza di un artefatto continuo sul canale registrante l'attività dei muscoli tibiali anteriori impedisce di valutare se presenti i movimenti periodici degli arti in sonno (PLMS).

Nel GIORNO 1 la paziente presenta un tempo totale di sonno pari a 376.5 minuti. Tale sonno si concentra tra le ore 21 e le 3 del mattino, quando la paziente presenta un addormentamento in fase REM. L'efficienza del sonno notturno è del 42.9%. nel GIORNO 2 la paziente presenta un tempo totale di sonno pari a 376.5 minuti. Tale sonno si concentra nel periodo notturno (TST=347 minuti) con una efficienza del sonno pari a 72.3%. Nelle ore diurne successive alla stimolazione luminosa sono presenti due addormentamenti in sonno NREM. Nel GIORNO 3 la paziente presenta una durata totale di sonno nelle 21 ore (3 ore del tracciato non sono interpretabili per la presenza di artefatti tecnici) pari a 221 minuti. Anche in questa giornata il sonno si concentra nel periodo notturno (TST=186 minuti, SE=38.7%). Nelle ore diurne la paziente presenta 3 addormentamenti, due dei quali in fase REM. Nel GIORNO 4 la paziente presenta un tempo totale di sonno pari a 278.5 minuti ed un'efficienza di sonno pari a 19.4%. Tale sonno si concentra tra le ore 4 e le 9 del mattino. Durante la notte, dopo un risveglio prolungato, la paziente si addormenta in fase REM. Nelle 4 giornate la paziente ha trascorso una media di 86 minuti in una fase di veglia quieta (**Figura 14**).

#### *Paziente 7*

Il tracciato di veglia del paziente 5 è caratterizzato da un'attività alfa e da movimenti oculari rapidi. Il tracciato di veglia quieta è caratterizzato da un'attività alfa, frammista ad attività theta e dalla comparsa di movimenti oculari lenti dell'addormentamento. Le fasi di sonno leggero sono caratterizzate dalla comparsa di un'attività theta, dalla presenza di movimenti oculari lenti dell'addormentamento e dagli elementi caratteristici della fase 2 di sonno NREM (fusi del sonno e K-complessi) ben caratterizzati. Le fasi di sonno profondo sono caratterizzate dalla comparsa di un'attività theta-delta polimorfa, con sovrimposte frequenze rapide. Le fasi di sonno REM sono caratterizzate da un

tracciato di bassa ampiezza, a volte frammisto da onde aguzze (del tipo a denti di sega), da movimenti oculari rapidi e da atonia del muscolo miloideo (**Figura 15**). La presenza di un artefatto continuo sul canale registrante l'attività dei muscoli tibiali anteriori impedisce di valutare se presenti i movimenti periodici degli arti in sonno (PLMS).

Nel GIORNO 1 il paziente presenta una durata totale di sonno pari a 362 minuti e una efficienza del sonno pari al 25%. Tale sonno si concentra tra le ore 22 e le 7 del mattino. Il pattern ipnico notturno è caratterizzato dalla prevalenza delle fasi di sonno leggero e da una scarsa rappresentazione delle fasi di sonno profondo (17%) e REM (3.7%). Nel GIORNO 2 il paziente presenta un aumento del tempo totale di sonno (TST=576.5 minuti; SE=40%). Tale sonno si concentra tra le 20.30 e le 8 del mattino successivo la stimolazione luminosa. Il pattern ipnico è sempre caratterizzato da una prevalenza delle fasi di sonno leggero. Nel GIORNO 3 il paziente presenta un ulteriore aumento del tempo totale di sonno nelle 24 ore, soprattutto per incremento del sonno diurno (TST diurno=325.5 minuti, SE=33.9%). Durante le ore diurne, il paziente presenta inoltre tre addormentamenti in fase REM. Il pattern ipnico notturno è caratterizzato dalla presenza di tutte le fasi del sonno. Nel GIORNO 4 si conferma l'aumento del tempo totale di sonno nelle 24 ore (TST=579.5 minuti, SE=40.2%). Tale sonno si concentra tra le ore 22 e le 9 del mattino successivo. Nelle ore diurne il paziente presenta cinque addormentamenti, in due dei quali si addormenta in fase REM. Nelle 4 giornate il paziente ha trascorso una media di 117 minuti in una fase di veglia quieta (**Figura 16**).

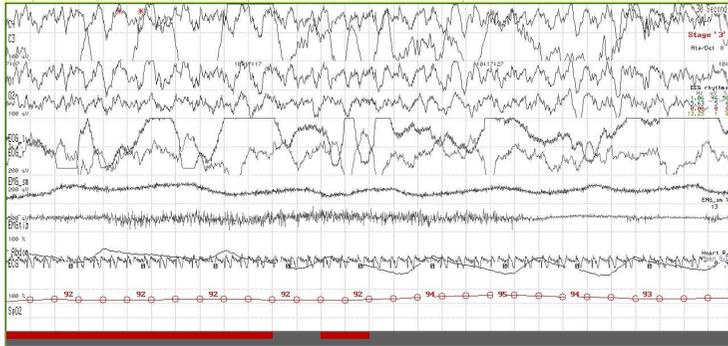
#### *Paziente 8*

Il tracciato di veglia del paziente 8 è caratterizzato da un'attività delta, con sovrimposte attività rapide e artefatti da movimento, e da movimenti oculari rapidi. Il tracciato di veglia quieta è caratterizzato da un'attività theta-delta e dalla comparsa di movimenti oculari lenti dell'addormentamento. Le fasi di sonno leggero sono caratterizzate dalla comparsa di un'attività theta, e da abbozzi degli elementi caratteristici della fase 2 di sonno NREM (fusi del sonno e K-complessi). Le fasi di sonno profondo sono caratterizzate dalla comparsa di un'attività theta-delta polimorfa e da riduzione in frequenza dei movimenti oculari. Le fasi di sonno REM sono caratterizzate da un tracciato di bassa ampiezza, a volte frammisto da onde aguzze (del tipo a denti di sega), da movimenti oculari rapidi e da atonia del muscolo miloideo (**Figura 17**). La presenza di un artefatto continuo sul canale registrante l'attività dei muscoli tibiali anteriori impedisce di valutare se presenti i movimenti periodici degli arti in sonno (PLMS).

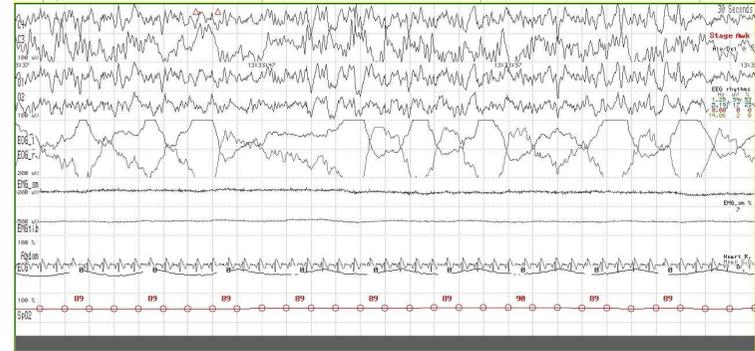
Nel GIORNO 1 il paziente presenta un tempo totale di sonno nelle 24 ore pari a 474 minuti ed un'efficienza del sonno pari al 32.9%. Il pattern ipnico è caratterizzato dalla prevalenza delle fasi di sonno profondo e della fase REM a scapito delle fasi di sonno leggero. Buona efficienza del sonno notturno (69.3%). Nelle ore diurne il sonno si concentra tra le ore 12 e le 16. Si segnala un addormentamento in fase REM. Nel GIORNO 2 il paziente presenta un tempo totale di sonno nelle 24 ore pari a 362.5 minuti ed un'efficienza del sonno pari al 25.2%. si conferma la prevalenza delle fasi di sonno profondo e di sonno REM. L'efficienza del sonno notturno è pari al 56%. Nelle ore diurne, il sonno si concentra tra le 12 e le 14. Sono presenti due addormentamenti in fase REM. Nel GIORNO 3 il paziente presenta un tempo totale di sonno nelle 24 ore pari a 460.5 minuti ed un'efficienza del sonno pari al 32.5%. si conferma la prevalenza delle fasi di sonno profondo e di sonno REM. L'efficienza del sonno notturno è pari al 50%. Nelle ore diurne, il sonno si concentra tra le 12 e le 16.30, tra le 7.30 e le 9 e tra le 10 e le 11. Sono presenti tre addormentamenti in fase REM. Nel GIORNO 4 il paziente presenta un tempo totale di sonno nelle 24 ore pari a 423.5 minuti ed un'efficienza del sonno pari al 29.5%. si conferma la prevalenza delle fasi di sonno profondo e di sonno REM. L'efficienza del sonno notturno è pari al 61.8%. Nelle ore diurne, il sonno si concentra tra le 11 e le 12 e tra le 13 e le 15. E' presente un addormentamento in fase REM. Nelle 4 giornate il paziente ha trascorso una media di 120 minuti in una fase di veglia quieta (**Figura 18**).

**Figura 3:** Aspetti polisonnografici della veglia e delle diverse fasi del sonno del paziente 1 (M, 24 aa)

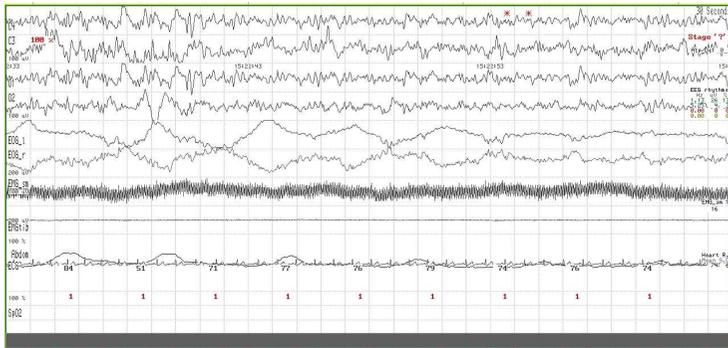
**Veglia**



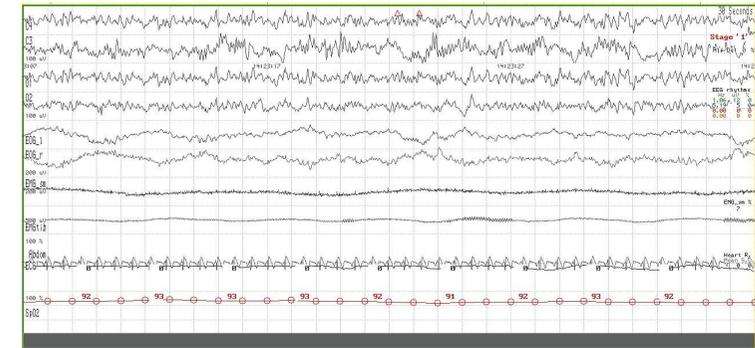
**Veglia rilassata**



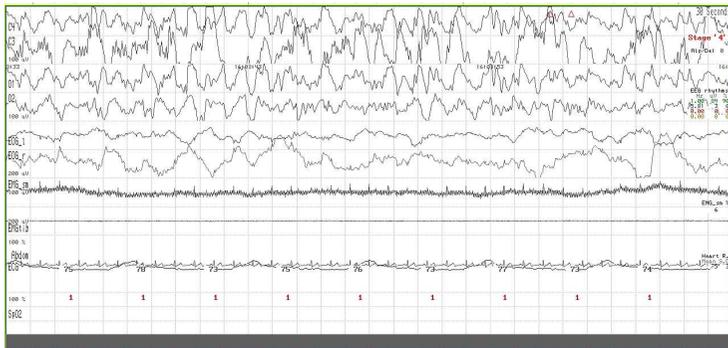
**Fase 1**



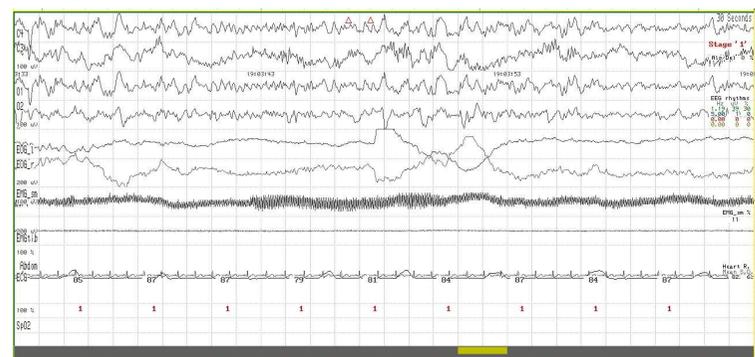
**Fase 2**



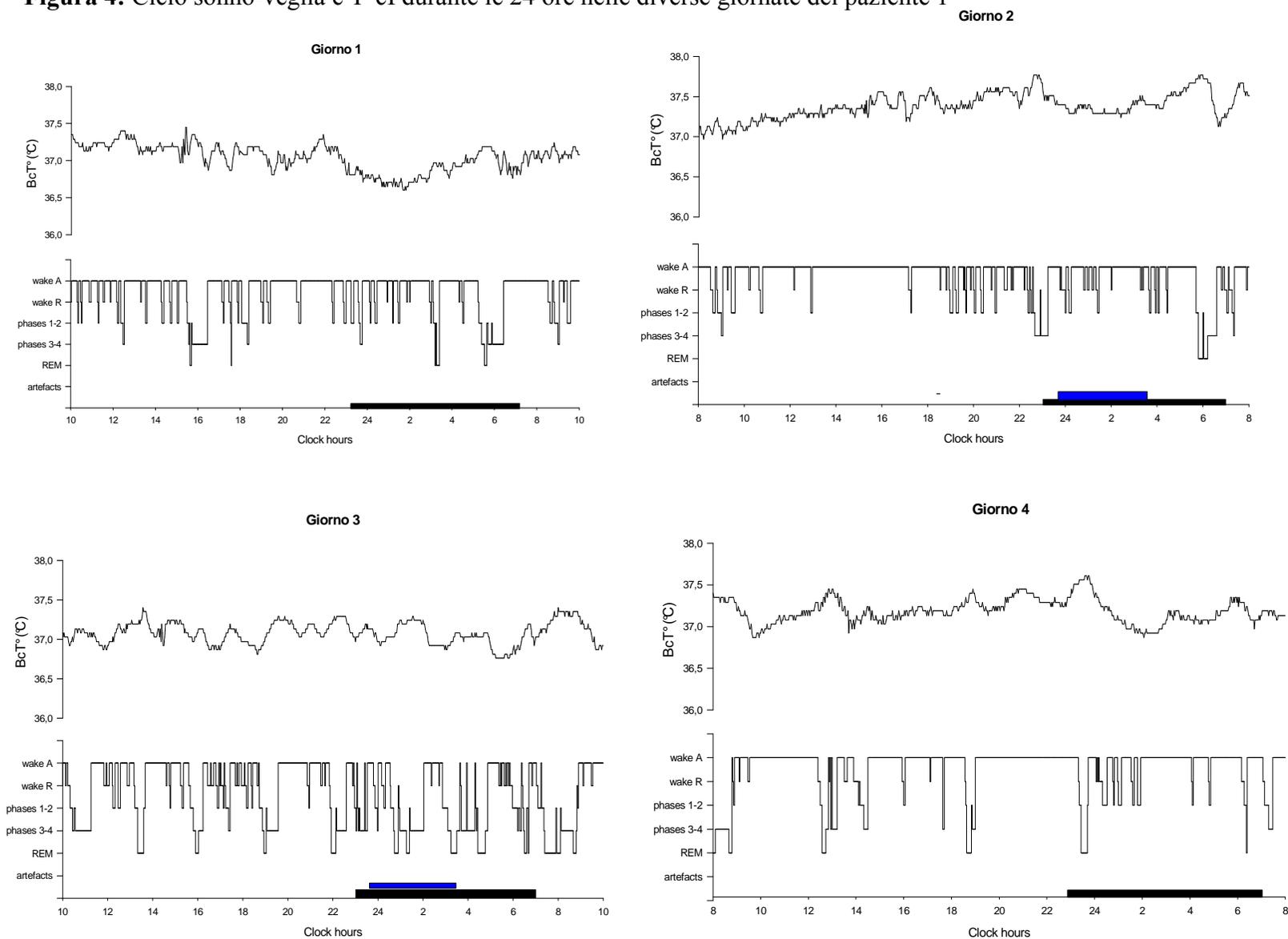
**Fase 3-4**



**REM**

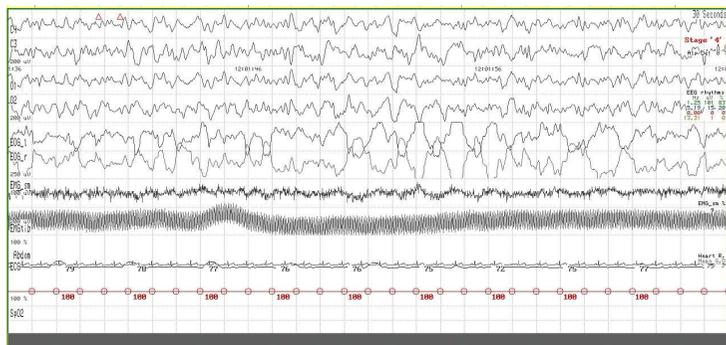


**Figura 4:** Ciclo sonno-veglia e T°CI durante le 24 ore nelle diverse giornate del paziente 1

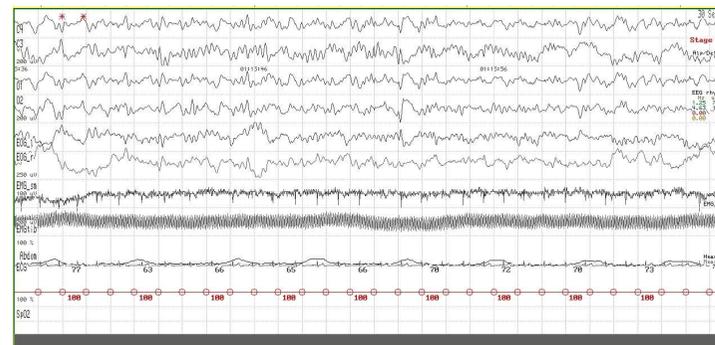


**Figura 5:** Aspetti polisonnografici della veglia e delle diverse fasi del sonno del paziente 2 (F, 34 aa)

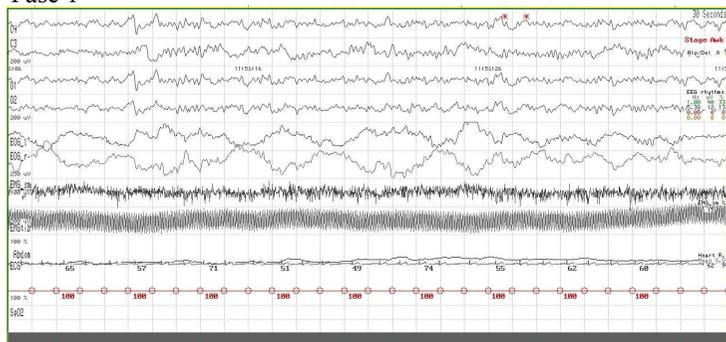
Veglia



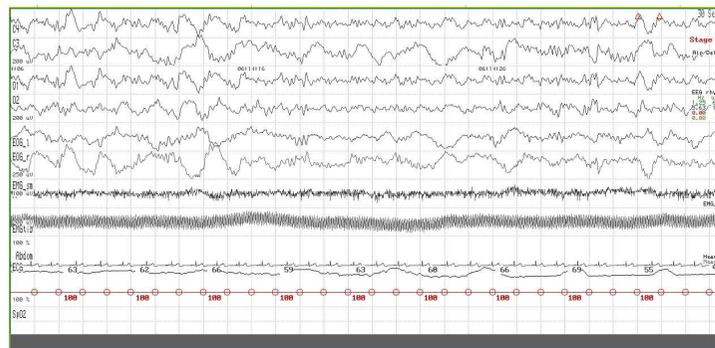
Veglia rilassata



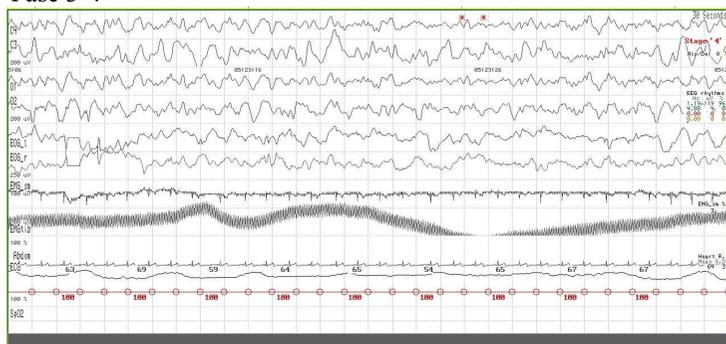
Fase 1



Fase 2



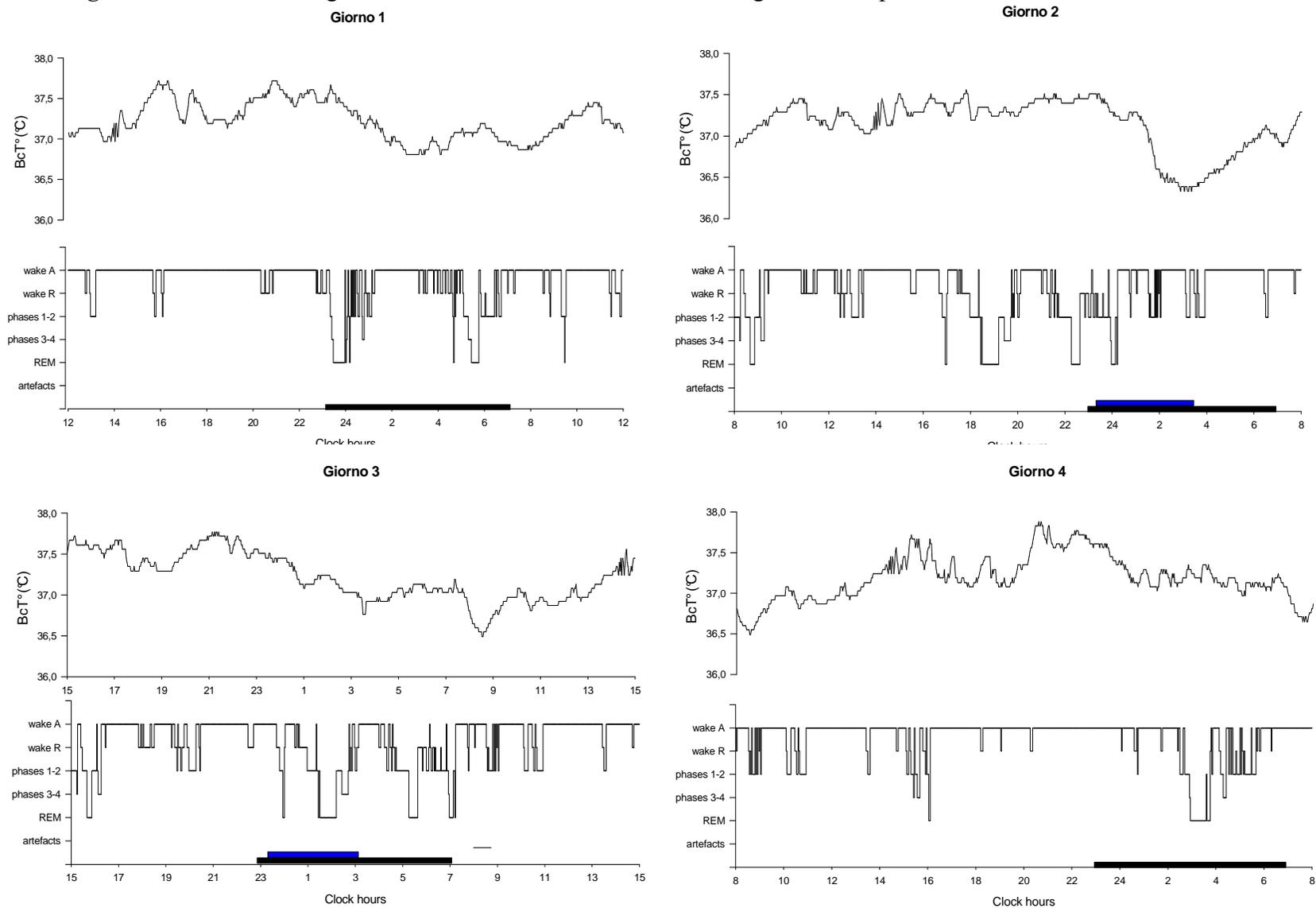
Fase 3-4



REM

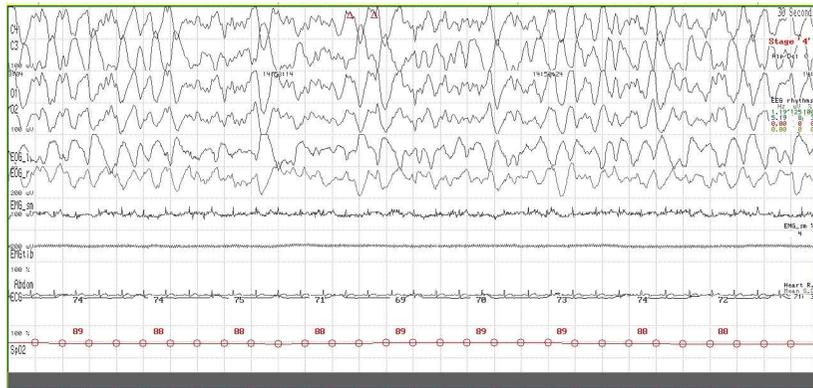


**Figura 6:** Ciclo sonno-veglia e  $T^{\circ}cI$  durante le 24 ore nelle diverse giornate del paziente 2

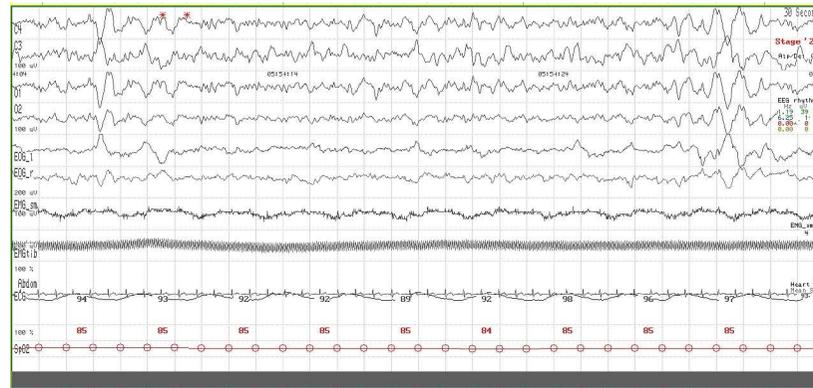


**Figura 7:** Aspetti polisonnografici della veglia e delle diverse fasi del sonno del paziente 3 (M, 28 aa)

Veglia



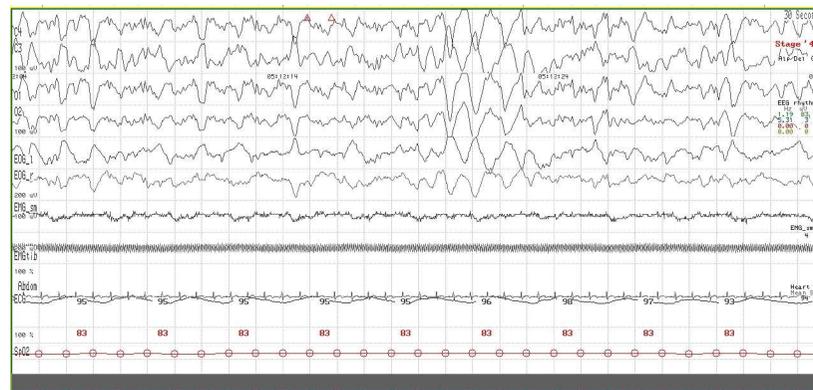
Fase 1



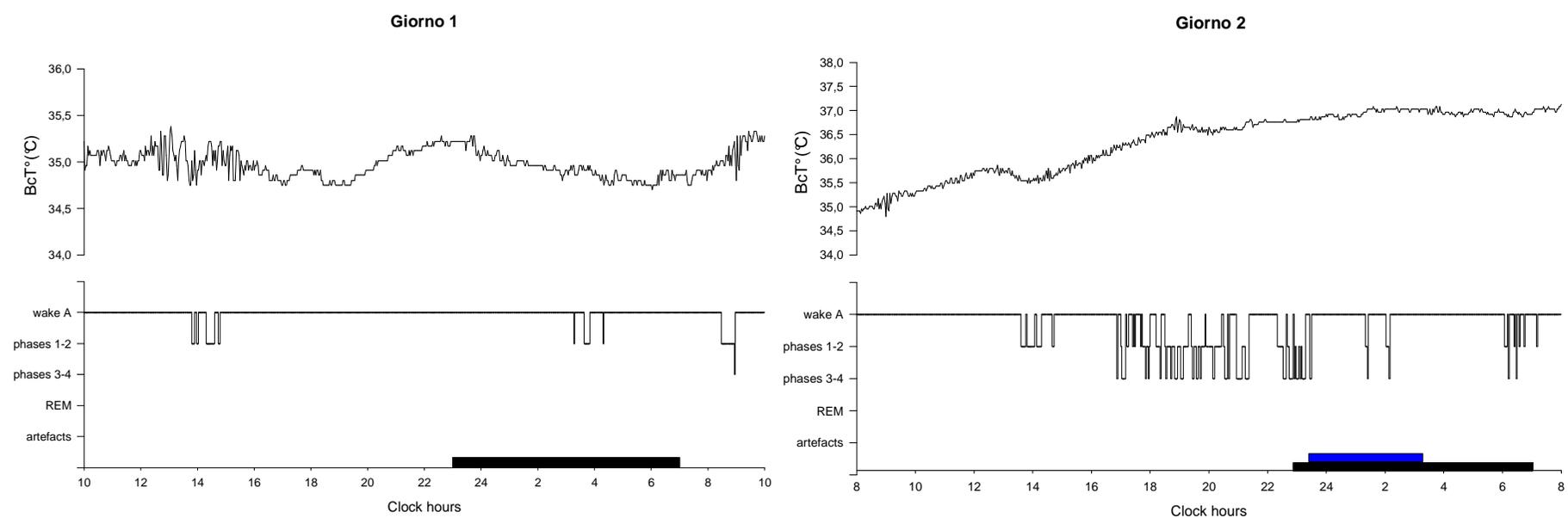
Fase 2



Fase 3-4

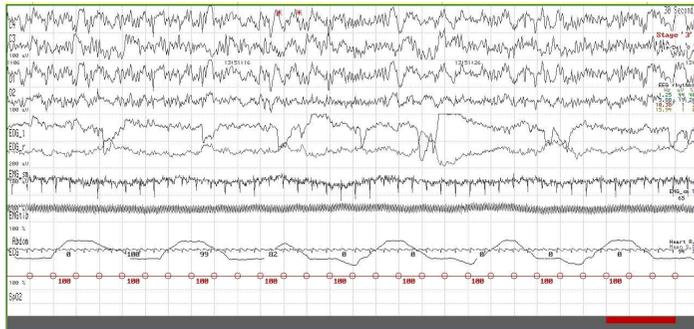


**Figura 8:** Ciclo sonno-veglia e T°cI durante le 24 ore nelle diverse giornate del paziente 3

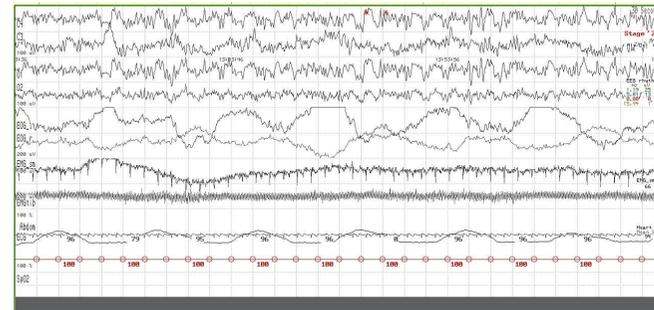


**Figura 9:** Aspetti polisonnografici della veglia e delle diverse fasi del sonno del paziente 4 (F, 38 aa)

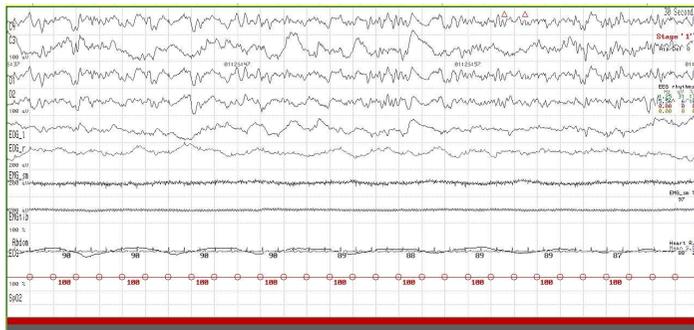
**Veglia**



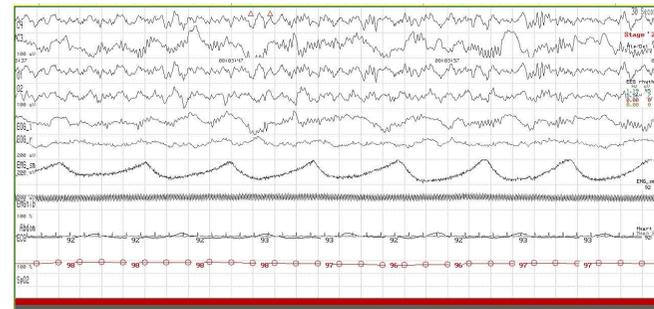
**Veglia rilassata**



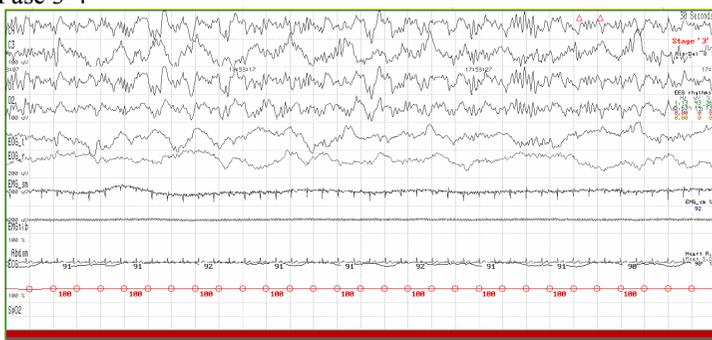
**Fase 1**



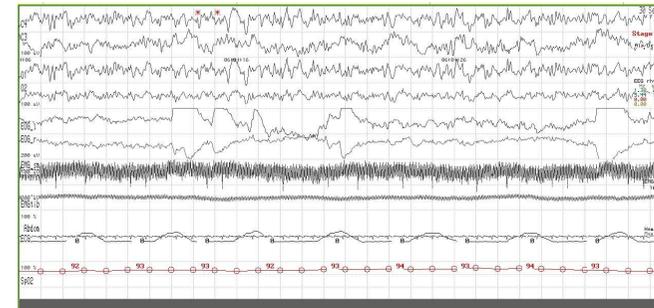
**Fase 2**



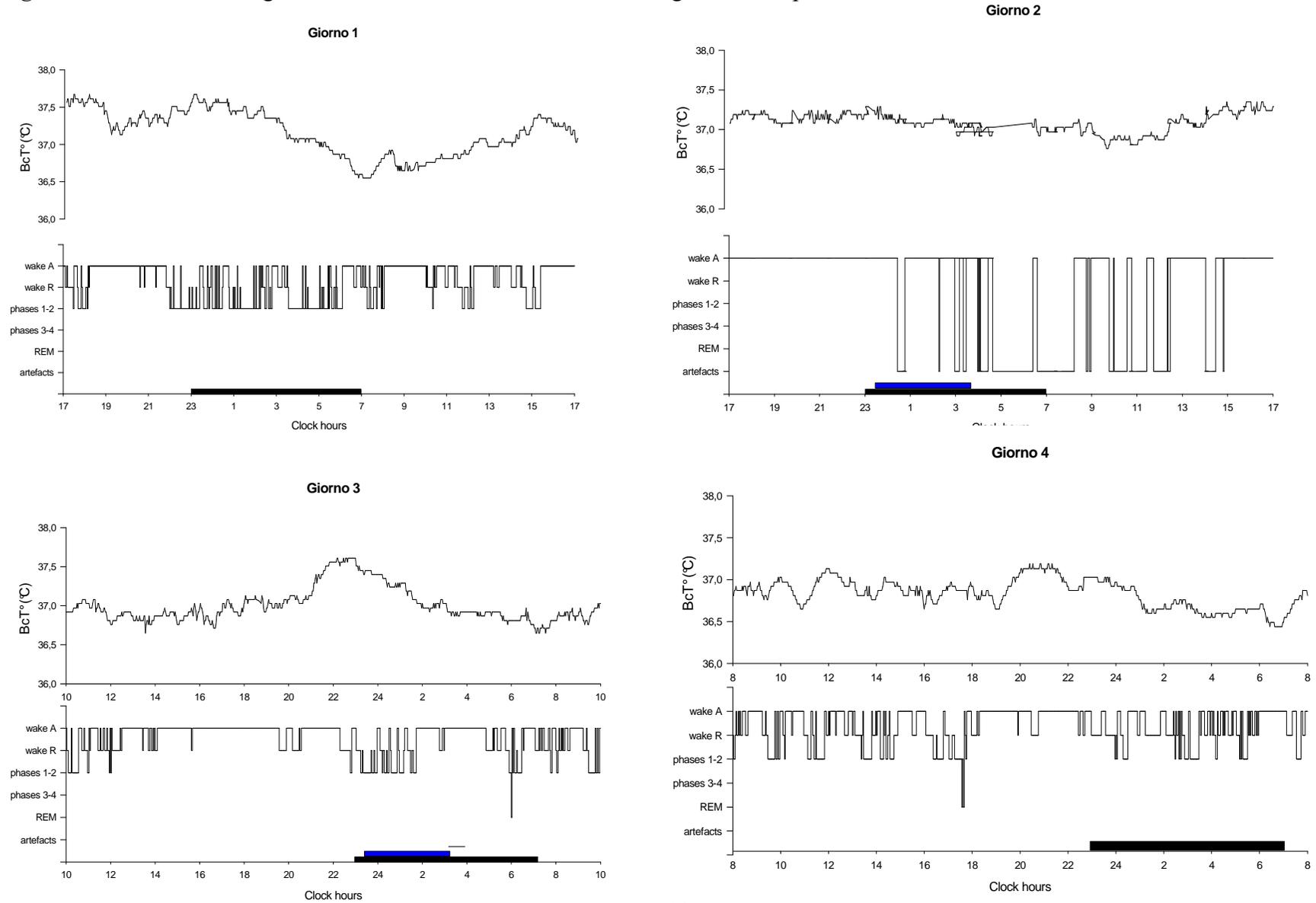
**Fase 3-4**



**REM**

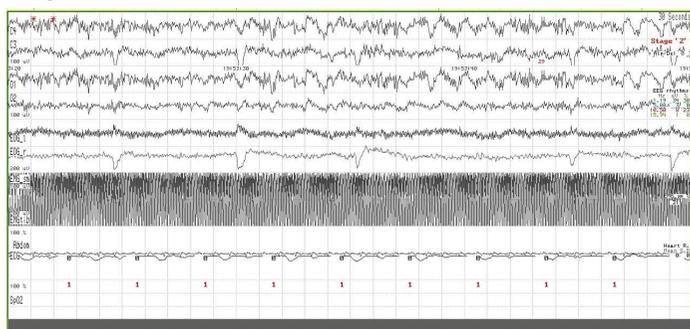


**Figura 10:** Ciclo sonno-veglia e T°CI durante le 24 ore nelle diverse giornate del paziente 4

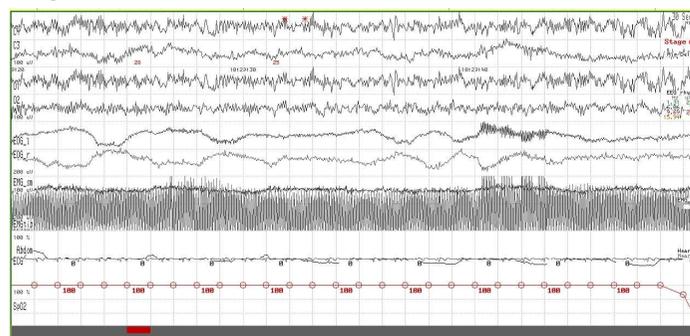


**Figura 11:** Aspetti polisonnografici della veglia e delle diverse fasi del sonno del paziente 5 (M, 37 aa)

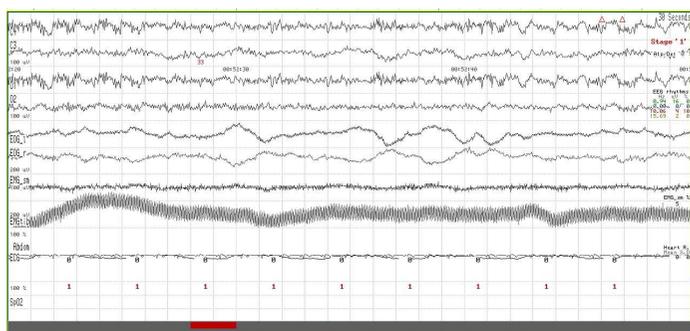
**Veglia**



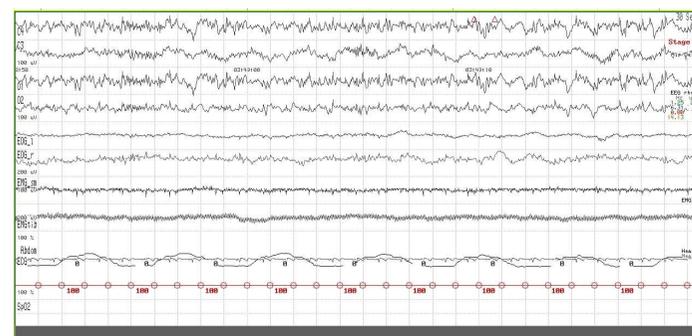
**Veglia rilassata**



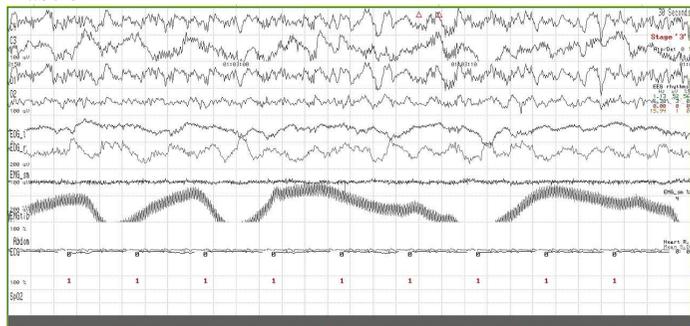
**Fase 1**



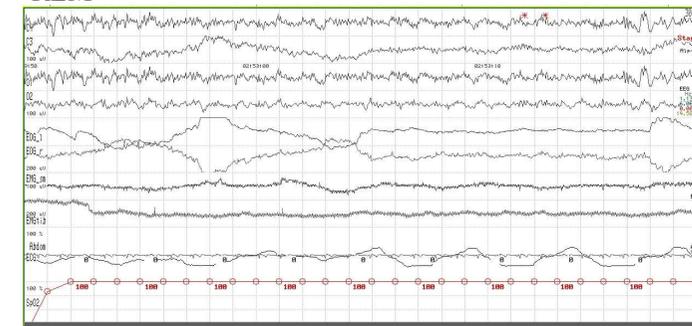
**Fase 2**



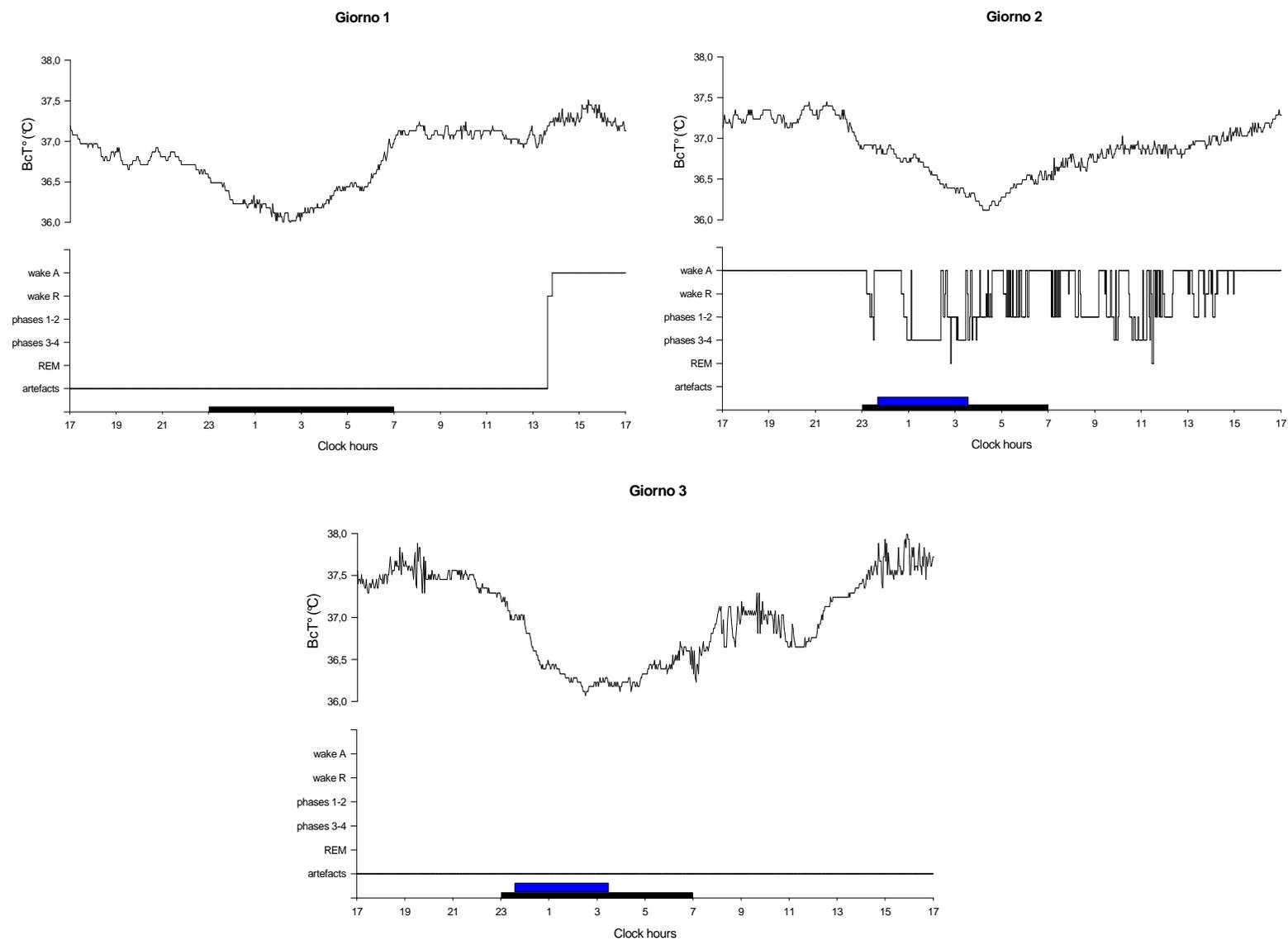
**Fase 3-4**



**REM**

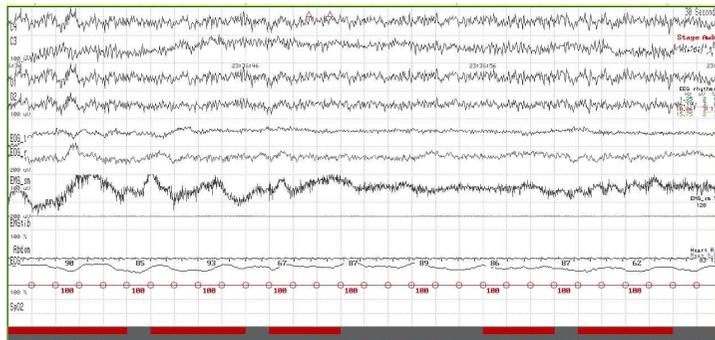


**Figura 12:** Ciclo sonno-veglia e T°cI durante le 24 ore nelle diverse giornate del paziente 5

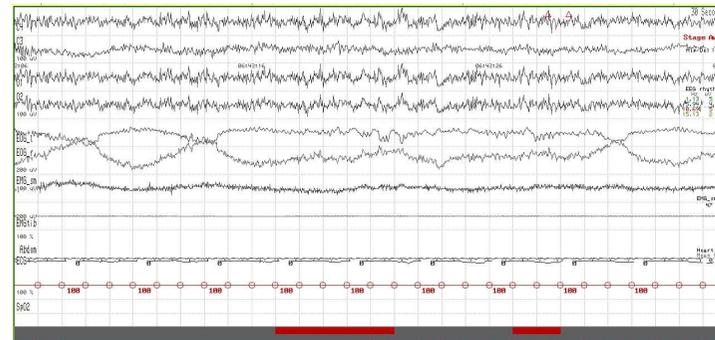


**Figura 13:** Aspetti polisonnografici della veglia e delle diverse fasi del sonno del paziente 6 (F, 47 aa)

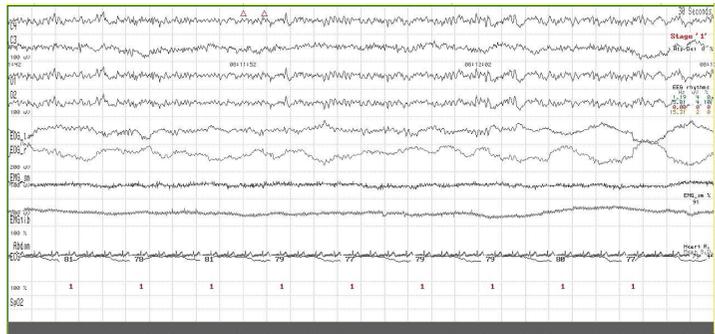
**Veglia**



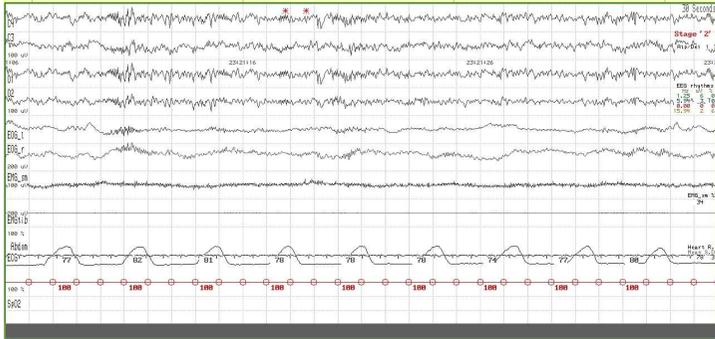
**Veglia rilassata**



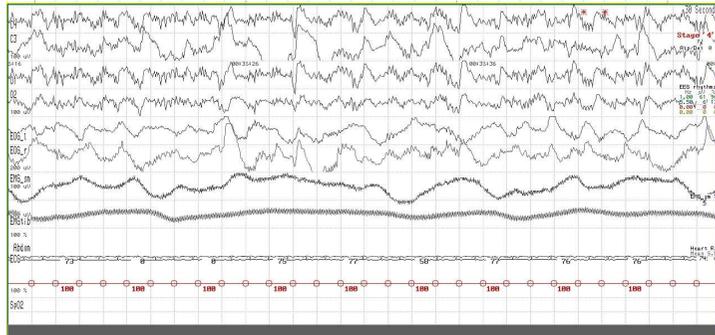
**Fase 1**



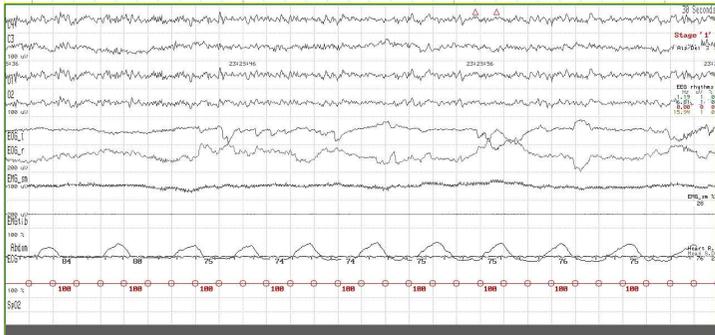
**Fase 2**



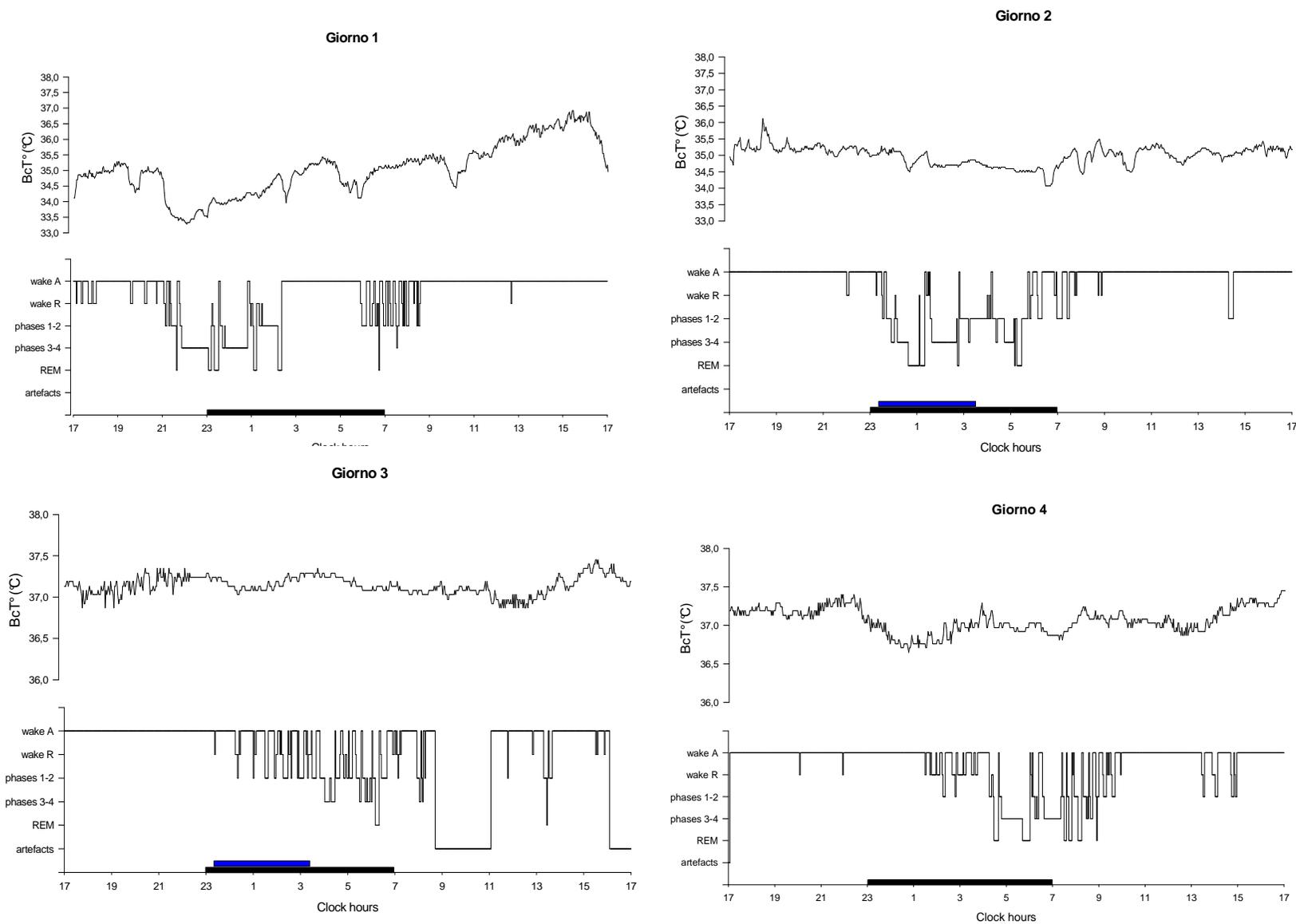
**Fase 3-4**



**REM**



**Figura 14:** Ciclo sonno-veglia e T°CI durante le 24 ore nelle diverse giornate del paziente 6

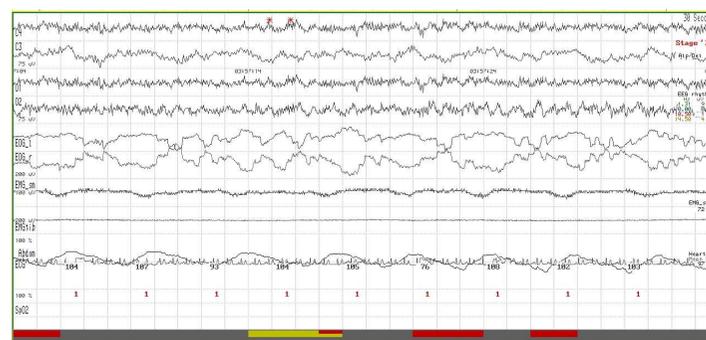


**Figura 15:** Aspetti polisonnografici della veglia e delle diverse fasi del sonno del paziente 7 (M, 20 aa)

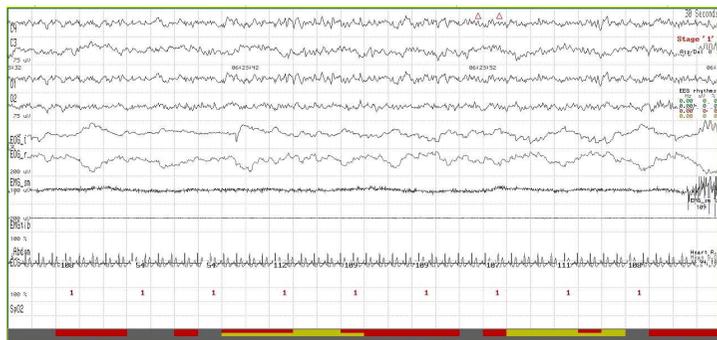
Veglia



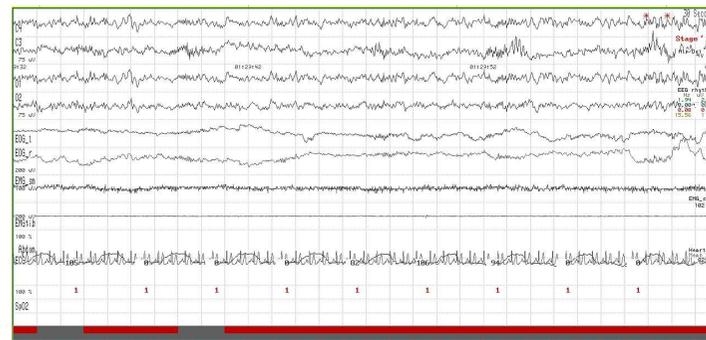
Veglia rilassata



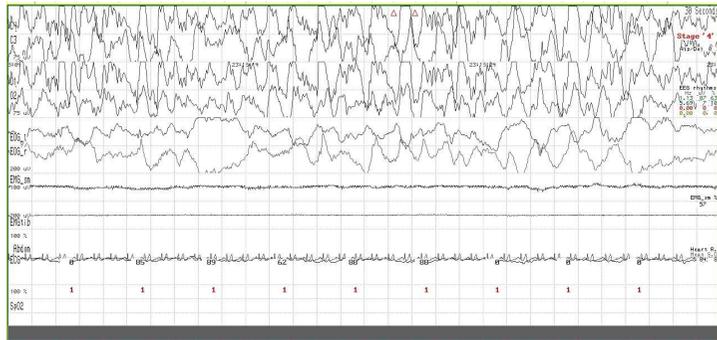
Fase 1



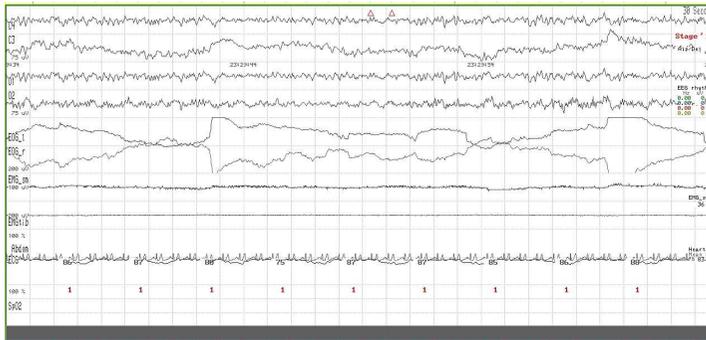
Fase 2



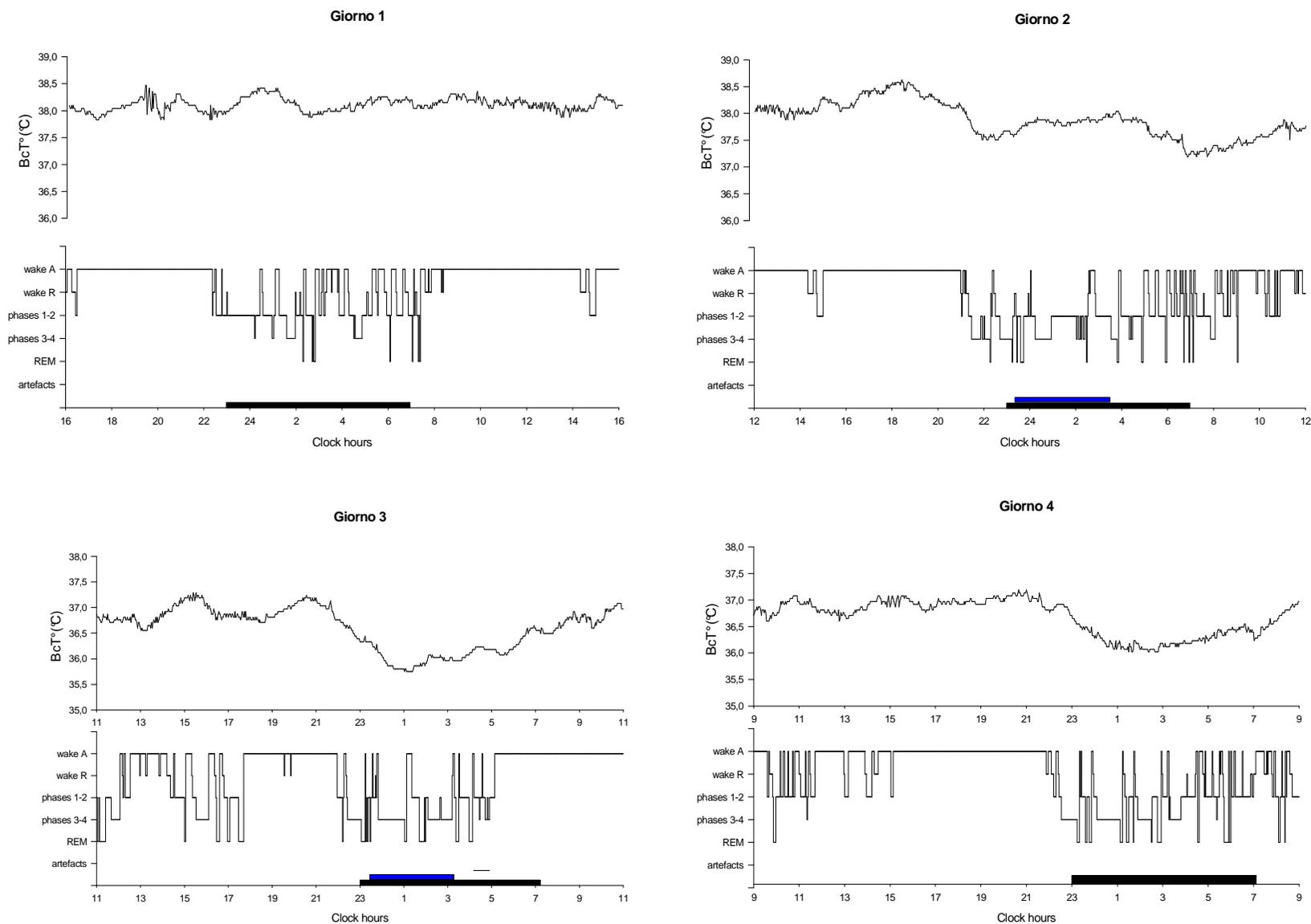
Fase 3-4



REM

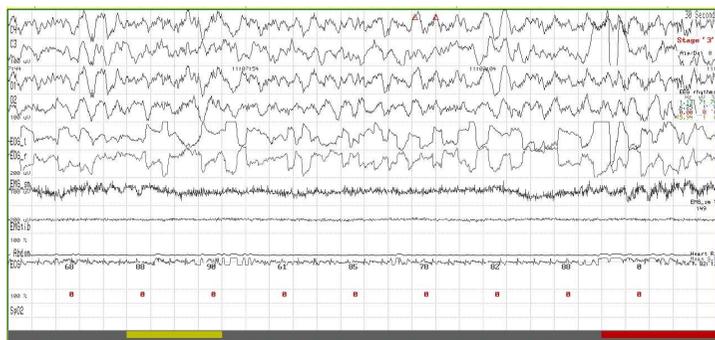


**Figura 16:** Ciclo sonno-veglia e T°cI durante le 24 ore nelle diverse giornate del paziente 7

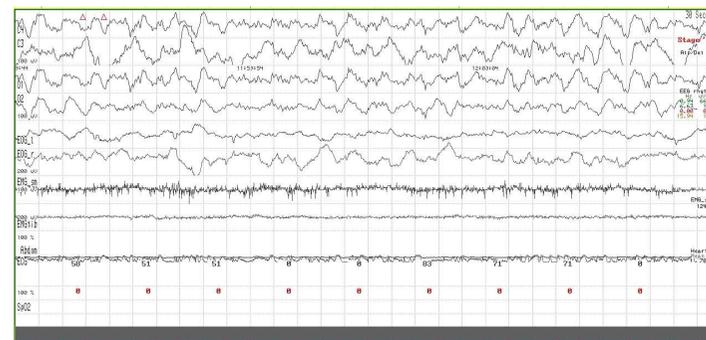


**Figura 17:** Aspetti polisonnografici della veglia e delle diverse fasi del sonno del paziente 8 (M, 30 aa)

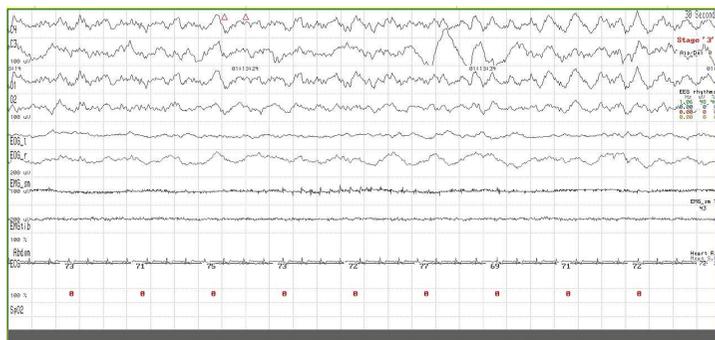
Veglia



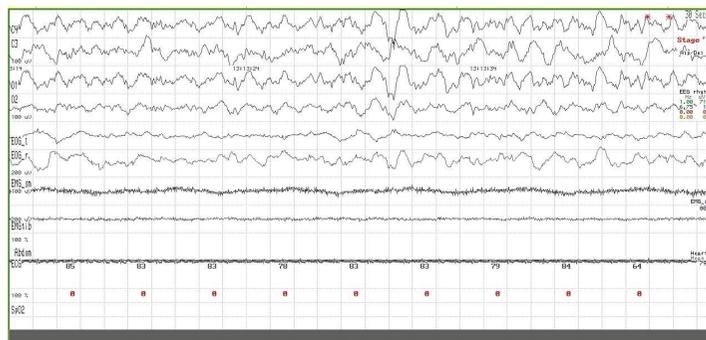
Veglia rilassata



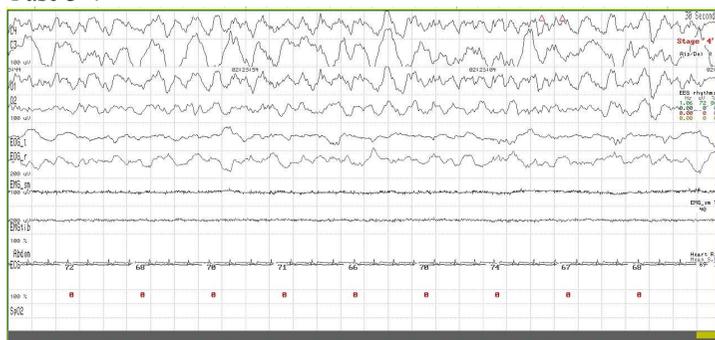
Fase 1



Fase 2



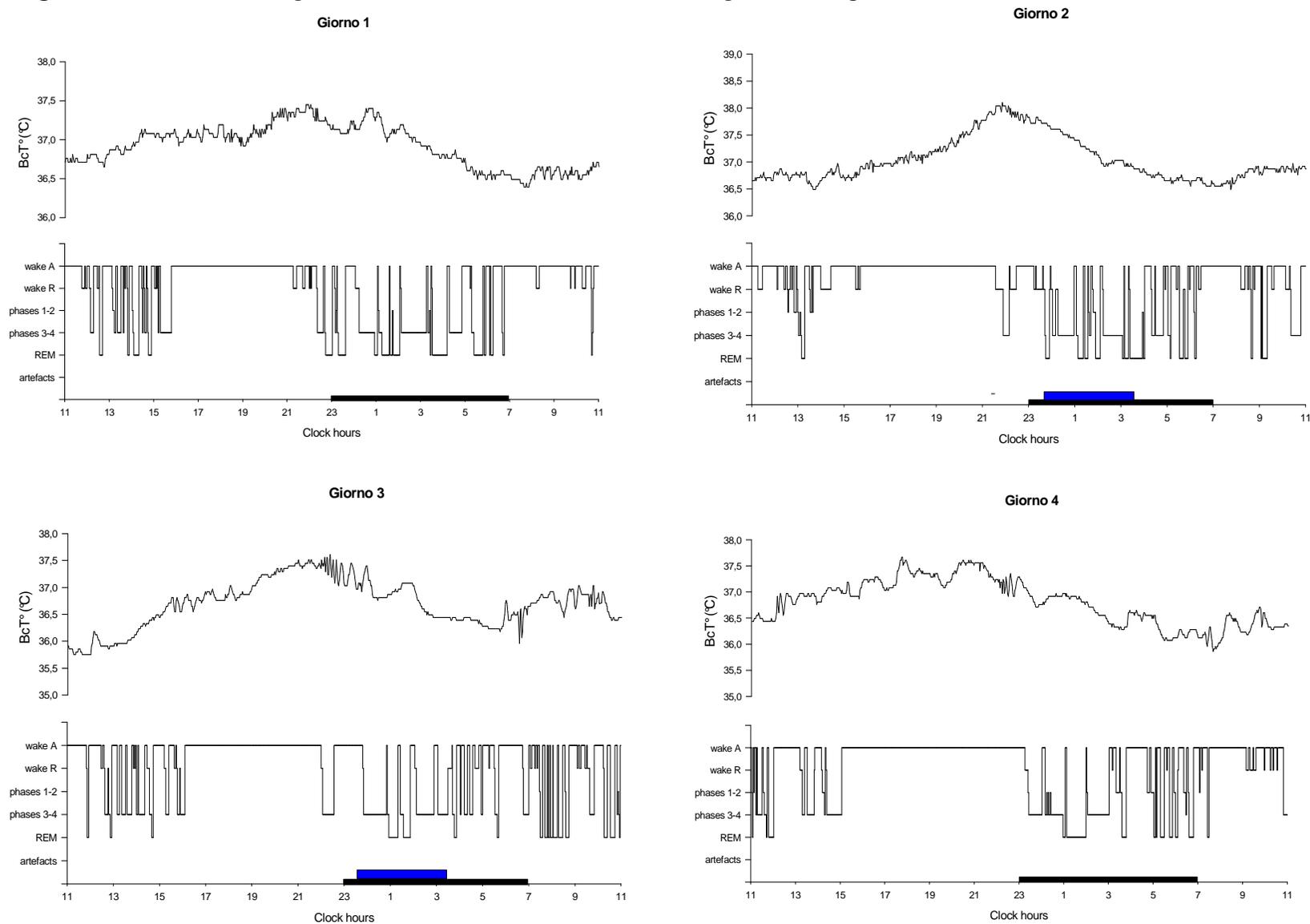
Fase 3-4



REM



**Figura 18:** Ciclo sonno-veglia e T°cI durante le 24 ore nelle diverse giornate del paziente 8



## **Confronto tra pazienti in stato vegetativo in condizioni basali e i controlli**

### *Analisi del sonno delle 24 ore*

I pazienti hanno presentato un tempo totale di sonno ( $301 \pm 124$  vs  $424 \pm 124$ ) e l'efficienza del sonno ( $20.4 \pm 8.6$  vs  $29.4 \pm 8.6$ ) inferiore ai controlli con tendenza alla significatività ( $p=0.07$ ). Il tempo trascorso in fase 1 era maggiore nei pazienti in stato vegetativo rispetto ai casi con tendenza alla significatività ( $110 \pm 117$  vs  $31 \pm 26.7$ ,  $p=0.08$ ). La percentuale di fase 1 ( $40 \pm 32$  vs  $7.3 \pm 5.4$ ) è risultata significativamente superiore nei pazienti rispetto ai controlli ( $p=0.01$ ). Il tempo trascorso in fase 2 ( $58.9 \pm 70.4$  vs  $200.8 \pm 76.9$ ,  $p=0.003$ ), la percentuale di fase 2 ( $21.9 \pm 21.7$  vs  $46.9 \pm 6.5$ ,  $p=0.008$ ) e il tempo trascorso in fase 3 ( $19.4 \pm 14$  vs  $43.8 \pm 17$ ,  $p=0.01$ ) sono risultati significativamente inferiori nei pazienti rispetto ai controlli (**Tabella 4**).

### *Analisi del sonno notturno (ore 23-7)*

I pazienti hanno presentato un tempo totale di sonno ( $193.5 \pm 107.9$  vs  $358.7 \pm 83$ ,  $p=0.005$ ) e un'efficienza di sonno ( $40.3 \pm 22.5$  vs  $74.7 \pm 17.3$ ,  $p=0.005$ ) significativamente ridotte rispetto ai controlli. La percentuale di fase 1 ( $40 \pm 36$  vs  $6 \pm 4.3$ ) è risultata significativamente superiore nei pazienti rispetto ai controlli ( $p=0.01$ ). Il tempo trascorso in fase 2 ( $39.2 \pm 62.9$  vs  $162.2 \pm 57.3$ ,  $p=0.002$ ), la percentuale di fase 2 ( $20 \pm 21.4$  vs  $44.7 \pm 8.4$ ,  $p=0.01$ ) e il tempo trascorso in fase 3 ( $12.3 \pm 9.5$  vs  $39.3 \pm 15.8$ ,  $p=0.002$ ) sono risultati significativamente inferiori nei pazienti rispetto ai controlli (**Tabella 5**). La percentuale di fase 3 ( $6.2 \pm 5$  vs  $10.8 \pm 3.7$ ,  $p=0.06$ ), il tempo trascorso in fase REM ( $39 \pm 54$  vs  $80.9 \pm 24.9$ ,  $p=0.07$ ) e il tempo totale trascorso in fase 3-4 ( $52.5 \pm 58.8$  vs  $94.3 \pm 23.5$ ,  $p=0.08$ ) sono risultati inferiori nei pazienti rispetto ai casi con tendenza alla significatività.

### *Analisi del sonno diurno*

Il tempo trascorso in fase 1 ( $47.5 \pm 43.9$  vs  $10.4 \pm 13.2$ ,  $p=0.04$ ) e la percentuale di fase 1 ( $49 \pm 33.7$  vs  $18.8 \pm 22$ ,  $p=0.05$ ) sono risultati significativamente più alti nei pazienti rispetto ai controlli. La percentuale di fase 2 è risultata significativamente più bassa nei pazienti rispetto ai controlli ( $19.9 \pm 17.8$  vs  $51.1 \pm 26$ ,  $p=0.02$ ) (**Tabella 6**).

### *Confronto tra giorni di registrazione*

L'analisi della varianza intraindividuale (ANOVA) tra i giorni di registrazione non ha evidenziato differenze significative per nessuna delle variabili esaminate, ad eccezione del tempo totale di sonno ( $p=0.04$ ) e del tempo trascorso in fase REM ( $p=0.02$ ) durante le ore diurne.

**Tabella 4:** Dati polisonnografici delle 24 ore (Giorno 1) di 7 pazienti in SV e di 7 controlli

	<b>TRT (min)</b>	<b>TST (min)</b>	<b>SE (%)</b>	<b>Fase 1 (min)</b>	<b>Fase 1 (%)</b>	<b>Fase 2 (min)</b>	<b>Fase 2 (%)</b>	<b>Fase 3-4 (min)</b>	<b>Fase3-4 (%)</b>	<b>REM (min)</b>	<b>REM (%)</b>
Pz 1	1440	285,5	19,80	89	31,2	65,5	22,9	111,5	39	19,5	6,8
Pz 2	1440	197,5	13,70	116	58,7	3,5	1,7	19	9,6	59	29,8
Pz 3	1440	94	6,50	45	47,87	40,5	43,08	8,5	9,05	0	0
Pz 4	1440	365	25,34	363,5	99,6	1	0,27	0,5	0,13	0	0
Pz 5	1440	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pz 6	1440	332,5	23,09	38,5	11,57	110,5	33,23	140,5	42,25	43	12,93
Pz 7	1440	362	25,13	103	28,45	189,5	52,34	50,5	13,94	19	5,24
Pz 8	1440	474	32,90	18	3,79	2	0,42	256	53,97	198	41,77
<b>media±SD</b>	<b>1440</b>	<b>301.1±124.2</b>	<b>20.9±8.6</b>	<b>110.4±117.3</b>	<b>40.1±32.4*</b>	<b>58.9±70.4*</b>	<b>21.9±21.7*</b>	<b>83.7±92.7</b>	<b>23.9±20.6</b>	<b>48.3±69.4</b>	<b>13.8±16.03</b>
		<b>p=0.07</b>	<b>p=0.07</b>	<b>p=0.08</b>	<b>p=0.01</b>	<b>p=0.003</b>	<b>p=0.008</b>				
<b>Controlli</b>	<b>1440</b>	<b>424.4±124.7</b>	<b>29.4±8.6</b>	<b>31.6±26.7</b>	<b>7.3±5.4</b>	<b>200.8±76.9</b>	<b>46.9±6.5</b>	<b>102.4±20.7</b>	<b>25.2±5.8</b>	<b>89.5±37.7</b>	<b>20.5±4.8</b>

TRT, tempo totale di registrazione, TST, tempo totale di sonno, SE, efficienza del sonno

**Tabella 5:** Dati polisonnografici del periodo buio (ore 23-7) (Giorno 1) di 7 pazienti in SV e di 7 controlli

	<b>TRT</b> <b>(min)</b>	<b>TST</b> <b>(min)</b>	<b>SE</b> <b>(%)</b>	<b>Fase 1</b> <b>(min)</b>	<b>Fase 1</b> <b>(%)</b>	<b>Fase 2</b> <b>(min)</b>	<b>Fase 2</b> <b>(%)</b>	<b>Fase 3-4</b> <b>(min)</b>	<b>Fase3-4</b> <b>(%)</b>	<b>REM</b> <b>(min)</b>	<b>REM</b> <b>(%)</b>
Pz 1	480	118	24,58	25	21,2	26	22,03	53	44,9	14	11,86
Pz 2	480	161	33,54	85	52,79	1	0,62	19	0,51	56	34,78
Pz 3	480	16	3,3	12	75	4	25	0	0	0	0
Pz 4	480	224	46,6	224	100	0	0	0	0	0	0
Pz 5	480	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pz 6	480	206	42,91	16	7,76	73	35,43	76	36,89	41	19,9
Pz 7	480	299	62,29	68	22,74	169	56,52	51	17,05	11	3,67
Pz 8	480	333	69,37	10	3	2	0,6	169	50,74	152	45,64
<b>media±SD</b>	<b>480</b>	<b>193.8±108*</b>	<b>40.4±22.4*</b>	<b>62.8±76.9</b>	<b>40.3±36.6*</b>	<b>39.2±62.9*</b>	<b>20±21.4*</b>	<b>52.5±58.8</b>	<b>21.4±22.4</b>	<b>39.1±54</b>	<b>16.5±17.9</b>
		<b>p=0.005</b>	<b>p=0.005</b>		<b>p=0.02</b>	<b>p=0.002</b>	<b>p=0.01</b>	<b>p=0.08</b>		<b>p=0.07</b>	
<b>Controlli</b>	<b>480</b>	<b>358.7±83</b>	<b>74.7±17.3</b>	<b>21.2±16.4</b>	<b>6±4</b>	<b>162.26±57.3</b>	<b>44.70±8.4</b>	<b>94.37±23.5</b>	<b>27±6.2</b>	<b>80.93±24.9</b>	<b>22.3±5.2</b>

TRT, tempo totale di registrazione, TST, tempo totale di sonno, SE, efficienza del sonno

**Tabella 6:** Dati polisomnografici del periodo luce (Giorno 1) di 7 pazienti in SV e di 7 controlli

	<b>TRT</b>	<b>TST</b>	<b>SE</b>	<b>Fase 1</b>	<b>Fase 1</b>	<b>Fase 2</b>	<b>Fase 2</b>	<b>Fase 3-4</b>	<b>Fase3-4</b>	<b>REM</b>	<b>REM</b>
	<b>(min)</b>	<b>(min)</b>	<b>(%)</b>	<b>(min)</b>	<b>(%)</b>	<b>(min)</b>	<b>(%)</b>	<b>(min)</b>	<b>(%)</b>	<b>(min)</b>	<b>(%)</b>
Pz 1	960	167,5	17,44	64	38,2	39,5	23,58	58,5	34,91	5,5	3,28
Pz 2	960	36,5	36,5	31	84,93	2,5	6,8	0	0	3	8,2
Pz 3	960	78	8,1	33	42,3	36,5	46,79	8,5	10,89	0	0
Pz 4	960	141	14,68	139,5	98,9	1	0,7	0,5	0,35	0	0
Pz 5	960	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pz 6	960	126,5	13,17	22,5	17,78	37,5	29,64	64,5	50,97	2	1,58
Pz 7	960	63	6,56	35	55,55	20	31,74	0	0	8	12,69
Pz 8	960	141	14,68	8	5,67	0	0	87	61,69	46	32,62
<b>media±SD</b>	<b>960</b>	<b>107.6±48.4</b>	<b>15.8±9.8</b>	<b>47.5±43.9*</b>	<b>49±33.7*</b>	<b>19.5±18.3</b>	<b>18.9±17.8*</b>	<b>31.2±37.3</b>	<b>22.6±26.2</b>	<b>9.2±16.4</b>	<b>8.3±11.6</b>
				<b>p=0.04</b>	<b>p=0.05</b>		<b>p=0.02</b>				
<b>Controlli</b>	<b>900</b>	<b>65.6±75.3</b>	<b>7.3±8.3</b>	<b>10.4±1.2</b>	<b>18.8±22</b>	<b>38.5±40.1</b>	<b>51.1±26.2</b>	<b>8.06±7.3</b>	<b>11.9±13.1</b>	<b>8.5±18.9</b>	<b>5.6±8.1</b>

TRT, tempo totale di registrazione, TST, tempo totale di sonno, SE, efficienza del sonno

### RITMO DELLA TEMPERATURA CORPOREA INTERNA

Nella **Figura 19** è rappresentato il ritmo della T<sup>°</sup>cI di tutti i pazienti nelle varie giornate di registrazione.

#### *Condizioni basali (GIORNO 1)*

Tutti i pazienti presentano un ritmo delle 24 ore della temperatura corporea interna significativo in condizioni basali (tabella). Il mesor (VS, media±SD: 36.6±1°C; controlli, media±SD: 36.9± 0.1), l'ampiezza (VS, media±SD: 0.33±0.3 °C; controlli, media±SD: 0.35±0.1), l'acrofase gradi (VS, media±SD: -224±77; controlli, media±SD: 247±15), l'acrofase (VS, media±SD: 14:56±5:08 h:m; VS basali, media±SD: 16:28±1:00), la temperatura corporea minima (T\_min) (VS, media±SD: 36.01±1.4; controlli, media±SD: 36.3±0.2) e la temperatura corporea massima (T\_max) (VS, media±SD: 37.3±0.9; controlli, media±SD: 37.3±0.1) del ritmo circadiano della BcT non mostrano significative differenze tra i pazienti in stato vegetativo e i controlli (**Tabella 7**).

#### *Primo giorno di stimolazione luminosa (GIORNO 2)*

Tutti i pazienti presentano un ritmo delle 24 ore della temperatura corporea interna significativo in corrispondenza del primo giorno di stimolazione luminosa (tabella). Il mesor (VS\_G2, media±SD: 36.7±0.9°C; VS basali, media±SD: 36.6±1°C), l'ampiezza (VS\_G2, media±SD: 0.35±0.19°C; VS basali, media±SD: 0.33±0.3 °C), l'acrofase gradi (VS\_G2, media±SD: -254±102; VS basali, media±SD: -224±77), l'acrofase (VS\_G2, media±SD: 16.56±6.51h:m; VS basali, media±SD: 14:56±5:08 h:m), la T\_min (VS\_G2, media±SD: 36.08±1°C; VS basali, media±SD: 36.01±1.4°C) e la T\_max (VS\_G2, media±SD: 37.5±0.7°C; VS basali, media±SD: 37.3±0.9°C) del ritmo circadiano della BcT non mostrano significative differenze tra le condizioni basali e la prima giornata di stimolazione luminosa nei pazienti in stato vegetativo(**Tabella 8**).

#### *Ultimo giorno di stimolazione luminosa (GIORNO 3)*

Sei pazienti presentano un ritmo delle 24 ore della temperatura corporea interna significativo in corrispondenza del primo giorno di stimolazione luminosa ad eccezione del paziente 1 (tabella). Il mesor (VS\_G3, media±SD: 36.5±1°C; VS basali, media±SD: 36.6±1°C), l'ampiezza (VS\_G3, media±SD: 0.42±0.2°C; VS basali, media±SD: 0.33±0.3 °C), l'acrofase gradi (VS\_G3, media±SD: -247±113; VS basali, media±SD: -

224±77), l'acrofase (VS\_G3, media±SD: 16.28±7.32 h:m; VS basali, media±SD: 14:56±5:08 h:m), la T\_min (VS\_G3, media±SD: 36.3±0.4°C; VS basali, media±SD: 36.01±1.4 °C) e la T\_max (VS\_G3, media±SD: 37.5±0.2°C; VS basali, media±SD: 37.3±0.9°C) del ritmo circadiano della BcT non mostrano significative differenze tra le condizioni basali e l'ultima giornata di stimolazione luminosa nei pazienti in stato vegetativo (**Tabella 9**).

*Primo giorno dopo il termine della stimolazione luminosa (GIORNO 4)*

Tutti i pazienti presentano un ritmo delle 24 ore della temperatura corporea interna significativo in corrispondenza del primo giorno dopo il termine della stimolazione luminosa (tabella). Il mesor (VS\_G4, media±SD: 36.5±1.2°C; VS basali, media±SD: 36.6±1°C), l'ampiezza (VS\_G4, media±SD: 0.34±0.2°C; VS basali, media±SD: 0.33±0.3 °C), l'acrofase gradi (VS\_G4, media±SD: -270±36; VS basali, media±SD: -224±77), l'acrofase (VS\_G4, media±SD: 18±2.25h:m; VS basali, media±SD: 14:56±5:08h:m), la T\_min (VS\_G4, media±SD: 36.3±0.3°C; VS basali, media±SD: 36.01±1.4°C) e la T\_max (VS\_G4, media±SD: 37.5±0.2°C; VS basali, media±SD: 37.3±0.9°C) del ritmo circadiano della BcT non mostrano significative differenze tra le condizioni basali e la prima giornata dopo il termine della stimolazione luminosa nei pazienti in stato vegetativo (**Tabella 10**).

*Confronto tra giorni di registrazione*

L'analisi della varianza intraindividuale (ANOVA) tra i giorni di registrazione non ha evidenziato differenze significative per nessuna delle variabili esaminate (mesor, ampiezza, acrofase in gradi, T\_min e T\_max).

**CORRELAZIONE TRA SONNO E TEMPERATURA CORPOREA INTERNA**

In fase di elaborazione.

**Tabella 7:** Analisi della ritmicità della T°CI col metodo del single cosinor in condizioni basali (**giorno 1**) in 8 pazienti in stato vegetativo e in 8 controlli

	Mesor (°C)	Ampiezza (°C)	Acrofase gradi	Acrofase (h:m)	T_min	T_max
Pz 1: M, 24 aa	37.04	0.19	-203	13:32	36,6	37,45
Pz 2: F, 34 aa	37.23	0.24	-282	18:49	36,81	37,72
Pz 3: M, 28 aa	34.96	0.04	-199	13:19	34,7	35,38
Pz 4: F, 38 aa	37.15	0.38	-316	21:04	36,55	37,67
Pz 5: M, 37 aa	36.80	0.50	-205	13:42	35,96	37,51
Pz 6: F, 47	35.04	0.91	-191	12:47	33,28	36,92
Pz 7: M, 20 aa	38.11	0.04	-84	5:36	37,83	38,47
Pz 8: M, 30 aa	36.9	0.35	-312	20:51	36,39	37,45
<b>Pazienti totali</b>	<b>36.6±1</b>	<b>0.33±0.2</b>	<b>-224±77</b>	<b>14:56±5.08</b>	<b>36.01±1.4</b>	<b>37.3±0.9</b>
<b>Controlli</b>	<b>36.9±0.1</b>	<b>0.35±0.1</b>	<b>-247±15</b>	<b>16:28±1:00</b>	<b>36.3±0.2</b>	<b>37.3±0.1</b>

**Tabella 8:** Analisi della ritmicità della T°CI col metodo del single cosinor in corrispondenza del primo giorno di stimolazione luminosa (**giorno 2**) in 8 pazienti in stato vegetativo

	<b>Mesor (°C)</b>	<b>Ampiezza (°C)</b>	<b>Acrofase gradi</b>	<b>Acrofase (h:m)</b>	<b>T_min</b>	<b>T_max</b>
Pz 1: M, 24 aa	37.38	0.11	-340	22:34	36,9	37,77
Pz 2: F, 34 aa	37.14	0.30	-256	17:06	36,33	37,56
Pz 3: M, 28 aa	35.77	0.70	-12	00:48	34,8	37,13
Pz 4: F, 38 aa	37.06	0.12	-298	19:54	36,76	37,35
Pz 5: M, 37 aa	36.86	0.42	-265	17:44	36,12	37,45
Pz 6: F, 47	34.98	0.29	-261	17:27	34,07	36,12
Pz 7: M, 20 aa	37.88	0.37	-272	18:10	37,19	38,63
Pz 8: M, 30 aa	37.05	0.49	-329	21:59	36,49	38,1
<b>Pazienti totali giorno 2</b>	<b>36.7±0.9</b>	<b>0.35±0.19</b>	<b>-254±102</b>	<b>16.56±6.51</b>	<b>36.08±1</b>	<b>37.5±0.7</b>
<b>Pazienti condizioni basali</b>	<b>36.6±1</b>	<b>0.33±0.3</b>	<b>-224±77</b>	<b>14:56±5.08</b>	<b>36.01±1.4</b>	<b>37.3±0.9</b>

**Tabella 9:** Analisi della ritmicità della T°cI col metodo del single cosinor in corrispondenza dell'ultimo giorno di stimolazione luminosa (**giorno 3**) in 7 pazienti in stato vegetativo

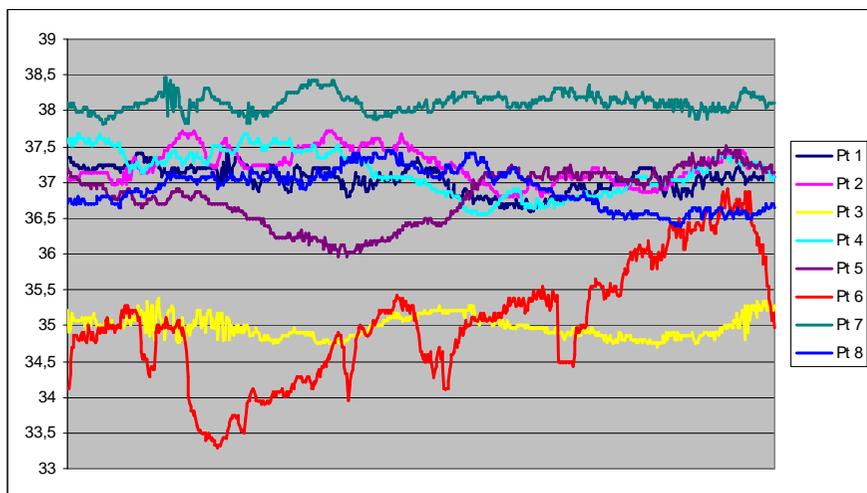
	<b>Mesor (°C)</b>	<b>Ampiezza (°C)</b>	<b>Acrofase gradi</b>	<b>Acrofase (h:m)</b>	<b>T_min</b>	<b>T_max</b>
Pz 1: M, 24 aa	37.08	-	-	-	36,76	37,4
Pz 2: F, 34 aa	37.22	0.36	-297	19:52	36,49	37,77
Pz 3: M, 28 aa	-	-	-	-	-	-
Pz 4: F, 38 aa	34.20	0.55	-34	2:19	36,65	37,61
Pz 5: M, 37 aa	37.0	0.65	-254	16:59	36,07	37,99
Pz 6: F, 47	37.14	0.06	-342	22:48	36,87	37,45
Pz 7: M, 20 aa	36.59	0.48	-228	15:16	35,75	37,29
Pz 8: M, 30 aa	36.7	0.45	-332	22:11	35,75	37,61
<b>Pazienti totali giorno 3</b>	<b>36.5±1</b>	<b>0.42±0.2</b>	<b>-247±113</b>	<b>16.28±7.32</b>	<b>36.3±0.4</b>	<b>37.5±0.2</b>
<b>Pazienti condizioni basali</b>	<b>36.6±1</b>	<b>0.33±0.3</b>	<b>-224±77</b>	<b>14:56±5.08</b>	<b>36.01±1.4</b>	<b>37.3±0.9</b>

**Tabella 10:** Analisi della ritmicità della T<sup>°</sup>cI col metodo del single cosinor in corrispondenza del primo giorno successivo alla sospensione della stimolazione luminosa (**giorno 4**) in 6 pazienti in stato vegetativo

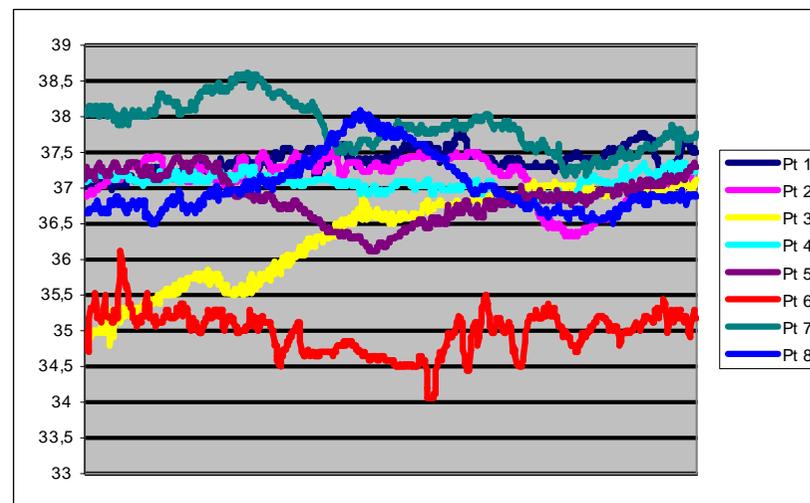
	<b>Mesor (°C)</b>	<b>Ampiezza (°C)</b>	<b>Acrofase gradi</b>	<b>Acrofase (h:m)</b>	<b>T_min</b>	<b>T_max</b>
Pz 1: M, 24 aa	37.19	0.08	-304	20:20	36,87	37,61
Pz 2: F, 34 aa	37.20	0.31	-313	20:53	36,49	37,88
Pz 3: M, 28 aa	-	-	-	-	-	-
Pz 4: F, 38 aa	34.02	0.53	-227	15:09	36,44	37,19
Pz 5: M, 37 aa	-	-	-	-	-	-
Pz 6: F, 47	37.07	0.14	-252	16:51	36,65	37,45
Pz 7: M, 20 aa	36.67	0.40	-237	15:50	36,02	37,19
Pz 8: M, 30 aa	36.8	0.58	-288	19:12	35,86	37,67
<b>Pazienti totali giorno 4</b>	<b>36.5±1.2</b>	<b>0.34±0.2</b>	<b>-270±36</b>	<b>18±2.25</b>	<b>36.3±0.3</b>	<b>37.5±0.2</b>
<b>Pazienti condizioni basali</b>	<b>36.6±1</b>	<b>0.33±0.3</b>	<b>-224±77</b>	<b>14:56±5.08</b>	<b>36.01±1.4</b>	<b>37.3±0.9</b>

**Figura 19:** Ritmo della T°cI di tutti i pazienti nelle varie giornate di registrazione

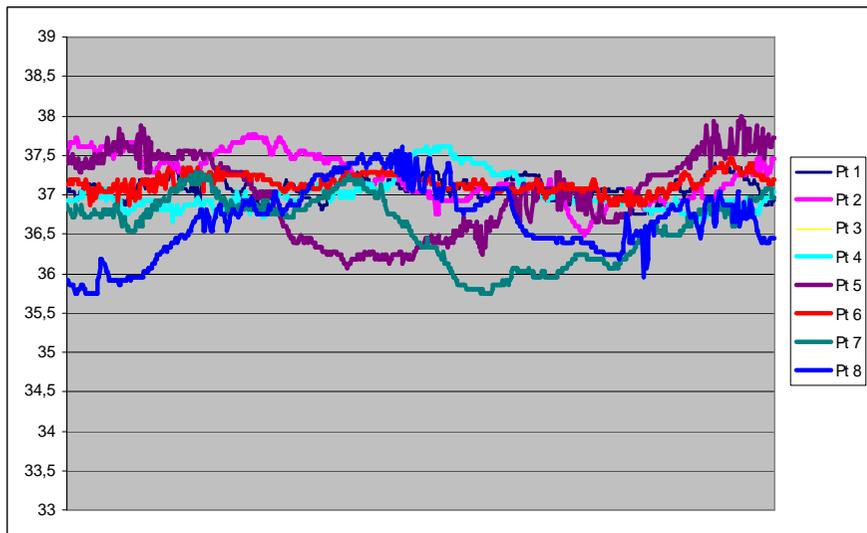
**Giorno 1**



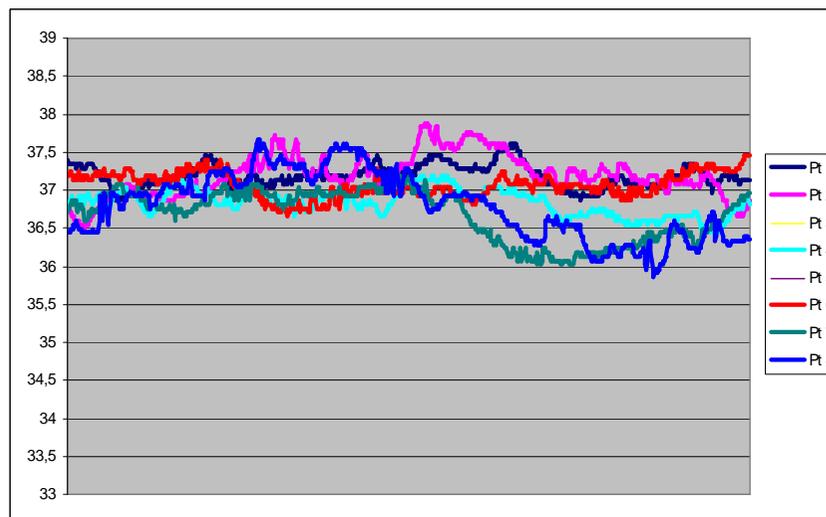
**Giorno 2**



**Giorno 3**



**Giorno 4**





## **METODO- PARTE SPERIMENTALE 2**

### **ETICA**

Questo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell’Ospedale Maggiore di Bologna nel dicembre 2008. Il consenso informato firmato è stato richiesto a tutti i familiari dei pazienti partecipanti allo studio e ai controlli. La raccolta ed il trattamento dei dati personali sono state condotte senza violare la riservatezza del soggetto, nella misura permessa dalla legge (Legge 675/96) e dalle regolamentazioni italiane applicabili.

### **POPOLAZIONE**

Sono stati inclusi nello studio pazienti in stato vegetativo secondo i criteri della “Multi-Society Task force on PSV” (**Allegato 1**) o in stato di minima coscienza secondo i criteri dell’American Academy of Neurology (**Allegato 2**) ricoverati presso la Casa dei Risvegli “Luca De Nigris” - Presidio Ospedaliero Bellaria-Maggiore – Bologna, in condizioni cliniche stabili. Il reclutamento del campione si è svolto da gennaio 2008 a luglio 2008.

Ogni paziente è stato valutato mediante l’esame obiettivo neurologico (EON) e le scale di valutazione dello stato di coscienza e/o vigilanza, della responsività, dell’abilità cognitiva, del livello funzionale dei soggetti: LCF (Levels of Cognitive Functions) (**Allegato 3**) e DRS (Disability Rating Scale) (**Allegato 4**).

Si sono mantenuti stabili in terapia i farmaci ritenuti necessari per l’assistenza del paziente.

2) E’ stato incluso nello studio anche un gruppo di soggetti sani di controllo paragonabili per sesso e per età.

Criteri esclusione dei soggetti di controllo:

Sono stati esclusi dallo studio: (1) lavoratori turnisti (per la nota alterazione dei ritmi circadiani in questa categoria di lavoratori), (2) soggetti che avessero effettuato un viaggio nel mese precedente al test che comportasse il volo attraverso più di un fuso orario, (3) soggetti che assumevano terapie farmacologiche in grado di interferire con la sintesi della MLT (beta-bloccanti, alfa-bloccanti, calcio-antagonisti, benzodiazepine e

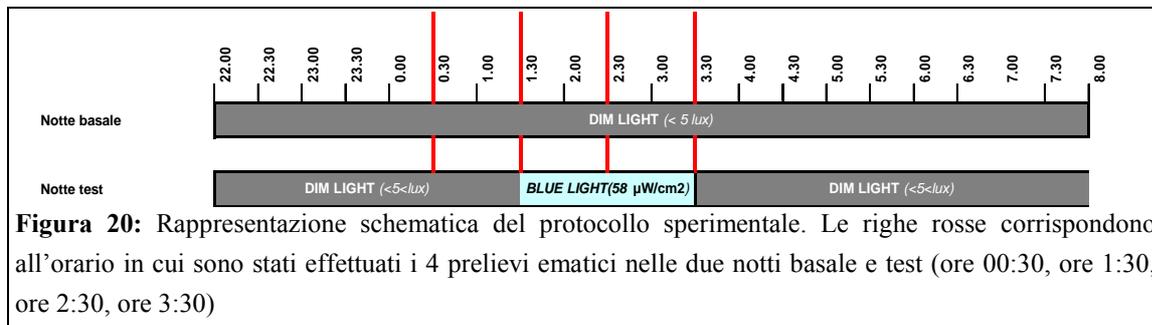
altri farmaci ipnotici, antidepressivi della classe degli inibitori delle monoaminossidasi, antidepressivi triciclici e inibitori della ricaptazione della serotonina, antiepilettici, antinfiammatori e neurolettici) [32].

Ai controlli è stato richiesto di mantenere un ciclo sonno-veglia regolare nella settimana che ha preceduto le valutazioni basale e test.

Ai soggetti arruolati sono state inoltre vietate un'eccessiva esposizione alla luce, un eccessivo esercizio fisico [33] e il consumo di caffeina, alcool, banane e cioccolato nelle 24 ore che hanno preceduto le due valutazioni per la nota interferenza con la sintesi di MLT [32].

### PROTOCOLLO DI STUDIO

Il protocollo sperimentale si è articolato in due notti, schematizzate in **Figura 20**.



La prima notte, definita notte basale, prevedeva il dosaggio della melatonina in condizioni basali senza stimolazione luminosa. Tale notte di controllo è stata prevista sia per determinare le concentrazioni basali della melatonina sia per ottenere dei valori di riferimento di controllo intraindividuale per ogni singolo partecipante da paragonare ai valori ottenuti nella notte con stimolazione luminosa. In base ai dati di letteratura infatti vi è una forte variabilità interindividuale nell'ampiezza del ritmo, tanto che in alcuni soggetti, in particolare anziani con disturbi del sonno, la secrezione notturna è scarsa o assente, mentre invece nello stesso soggetto l'ampiezza e la forma del ritmo di secrezione sono altamente riproducibili giorno per giorno.

La notte basale in tutti i casi ha preceduto quella test, con un intervallo tra le due valutazioni variabile tra 1 e 20 giorni.

#### 1. Notte basale

Il soggetto è rimasto sdraiato in condizioni di oscurità (illuminazione ambientale <5 lux) dalle 10 pm alle 3:30 am. Al soggetto in studio è stato richiesto di

rimanere sdraiato, per eliminare l'effetto dei cambiamenti posturali sul pattern di secrezione della MLT [32]. Per assicurare che si realizzasse una condizione di buio completo il soggetto ha indossato maschera paraluce (**Figura 21**) nel periodo di buio sia nella notte basale che nella notte test. All'inizio della notte è stato posizionato un catetere venoso periferico e sono stati effettuati 4 prelievi di sangue per il dosaggio della MLT alle ore 12:30 pm, 1:30 am, 2:30 am e 3:30 am. Durante tale valutazione basale ai soggetti è stato permesso di dormire, in quanto la produzione di MLT è indipendente dallo stato di veglia-sonno [35-37].



**Figura 21:** Immagine della maschera paraluce

## 2. Notte test

Il soggetto è rimasto sdraiato in una stanza buia (illuminazione ambientale <5 lux) dalle 22 all'1:30 am e durante tale periodo gli è stato permesso, come nella notte di valutazione basale, di dormire qualora ne avesse sentito il bisogno. Dall'1:30 am alle 3:30 am il soggetto è stato quindi esposto ad una luce blu riflessa dal soffitto. Durante la stimolazione luminosa i partecipanti erano posizionati in posizione supina. Per garantire una stimolazione luminosa efficace è stato richiesto ai controlli di fissare ad occhi aperti il soffitto su cui veniva proiettata la luce blu per tutta la durata dell'esposizione, in quanto è stato dimostrato che la soppressione della MLT è significativamente ridotta se l'esposizione alla luce avviene ad occhi chiusi [38]. I pazienti in stato vegetativo erano lasciati liberi di dormire.

I prelievi di sangue (16 ml) sono stati quindi immediatamente centrifugati (per 15 min a 3000 rpm), e il plasma ottenuto successivamente aliquotato e quindi conservato a -80°C. La MLT è stata dosata sulle aliquote di plasma o di siero in duplicato con una metodica di Radio-Immuno-Assay (RIA) (*Melatonin Direct RIA-KIPL3300; Pantec –Biosource Europe S.A.*) con limite di sensibilità del dosaggio di 2pg/ml. Il coefficiente di

variabilità intra-dosaggio utilizzato è del 12.3% e il coefficiente di variabilità inter-dosaggio del 16.2%.

### *Caratteristiche della sorgente luminosa*

La luce monocromatica utilizzata in questo studio era riflessa sul soffitto da due apparecchi di illuminazione (Lampada Sivra-Guzzini®) a luce indiretta posti ai due lati del letto. La superficie del soffitto illuminata omogeneamente (di dimensioni pari a 100 cm x 150 cm), esattamente sopra il letto, era ad una distanza di 1,95 m dagli occhi del soggetto disteso nel letto (**Figura 2**). Ciascuna lampada è dotata di 38 LEDs per una potenza complessiva di 38 Watt con emissione di luce monocromatica a 470 nm. I valori di illuminamento sulla cornea del soggetto in studio (espressi in *lux*) sono stati misurati con Luxmetro Minolta CL-200 tarato secondo la curva di visibilità standard CIE per la luce bianca (36 *lux*) e i valori di luminanza (espressi in  $cd/m^2$ ) attraverso un luminanzometro. La sorgente emittente la luce (rappresentata dal soffitto in questo disegno sperimentale) ha un valore di irradianza di  $58 \mu W/cm^2$  (per l'emissione a 470 nm).

### *VALUTAZIONE QUANTITATIVA DELLA SOPPRESSIONE DELLA MELATONINA CON LA LUCE*

Non essendoci in letteratura un accordo sul metodo di quantificazione della soppressione della MLT, sono stati considerati diversi punteggi, adattandoli da quelli utilizzati in studi precedenti.

❖ ***Punteggio di soppressione normalizzato alla notte di controllo*** (“*Control adjusted Melatonin suppression score*” o *caMSS*):

Data l'estrema variabilità del profilo di secrezione individuale della MLT, ma la notevole riproducibilità nello stesso soggetto [32, 39] i punteggi percentuali di soppressione della MLT sono stati normalizzati per i valori di MLT di quel soggetto nella notte basale (*control-adjusted*) sottraendo la variazione percentuale della notte di controllo alla variazione percentuale ottenuta nella notte di esposizione alla luce [40, 41].

1. **caMSS :  $100 \times \{[(PostL - PreL)/PreL] - [(PostB - PreB)/PreB]\}$  in cui:**

$$PreB = [(1^{\circ}B + 2^{\circ}B)/2]$$

$$PostB = [(3^{\circ}B + 4^{\circ}B)/2]$$

$$PreL = [(1^{\circ}L + 2^{\circ}L)/2]$$

$$\text{PostL} = [(3^\circ\text{L} + 4^\circ\text{L})/2]$$

Lo stesso punteggio è stato calcolato ad una e a due ore di esposizione alla luce (caMSS 1h e caMSS2h) con le seguenti formule:

2. **caMSS 1h:**  $100 \times \{[(3^\circ\text{L} - \text{PreL})/\text{PreL}] - [(3^\circ\text{B} - \text{PreB})/\text{PreB}]\}$
3. **caMSS 2h:**  $100 \times \{[(4^\circ\text{L} - \text{PreL})/\text{PreL}] - [(4^\circ\text{B} - \text{PreB})/\text{PreB}]\}$

Inoltre, per evitare la sottostima del valore pre-esposizione che si avrebbe in soggetti con un pattern di secrezione della MLT bifasico è stato utilizzato un punteggio che prende in considerazione il valore di MLT immediatamente precedente l'inizio dell'esposizione alla luce, successivamente calcolato ad un'ora e a due ore di esposizione con le seguenti formule:

4. **caMSS bis:**  $100 \times \{[(\text{PostL} - 2^\circ\text{L})/2^\circ\text{L}] - [(\text{PostB} - 2^\circ\text{B})/2^\circ\text{B}]\}$
5. **caMSS 1h bis:**  $100 \times \{[(3^\circ\text{L} - 2^\circ\text{L})/2^\circ\text{L}] - [(3^\circ\text{B} - 2^\circ\text{B})/2^\circ\text{B}]\}$
6. **caMSS 2h bis:**  $100 \times \{[(4^\circ\text{L} - 2^\circ\text{L})/2^\circ\text{L}] - [(4^\circ\text{B} - 2^\circ\text{B})/2^\circ\text{B}]\}$

❖ **Percentuale di soppressione o “Suppression rate”:** tale punteggio considera la sola variazione percentuale dei valori di MLT dopo esposizione alla luce rispetto agli stessi valori della notte basale, partendo comunque dal medesimo presupposto teorico della riproducibilità dei valori nello stesso individuo [42].

7. **Suppression rate:**  $100 \times \{[(\text{PostB}) - (\text{PostL})]/(\text{PostB})\}$

❖ **Luce netto:** tale punteggio tiene conto della sola variazione percentuale nella notte di esposizione alla luce, senza normalizzazione per la notte basale.

8. **Luce netto:**  $100 - [(100 \times (\text{PostL}/2^\circ\text{L})]$

#### ANALISI STATISTICA

Le differenze tra i gruppi sono state analizzate con appropriati test parametrici e non parametrici (Student's *t*-test). Le variabili sono state considerate significativamente differenti se  $p < 0.05$ .

I livelli plasmatici della melatonina (MLT) sono espressi come percent-change score:

$$100 \times (3.30 \text{ am MLT} - 23.30 \text{ am MLT}) / 23.30 \text{ am MLT}$$

Tali punteggi percentuali verranno control-adjusted sottraendo la variazione percentuale della notte di controllo per ogni punteggio di esposizione [40].

Verrà quindi verificata la distribuzione normale dei dati ottenuti ed effettuata quindi un'analisi di varianza (ANOVA) per analizzare le differenze dei punteggi ottenuti intra ed interindividuali.

## RISULTATI- PARTE SPERIMENTALE 2

### CAMPIONE DELLO STUDIO

Sono stati reclutati 6 pazienti (4 maschi e 2 femmine; età media 33±9 anni) e 9 controlli (5 maschi e 4 femmine; età media 34 ±9 anni).

### CARATTERISTICHE CLINICHE DEL CAMPIONE

In **Tabella 11** sono riportate le principali caratteristiche cliniche del campione dei pazienti. Al momento della valutazione tutti i pazienti erano in uno stato vegetativo in accordo ai criteri della “Multi-Society Task force on PSV” [1]. In tutti i pazienti l’eziologia dello stato vegetativo era post-traumatica. La distanza media dal trauma nel momento della registrazione era di 8±5 mesi (min 4 mesi; max 18 mesi).

**Tabella 11** : Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti in SV al momento dell’inclusione nello studio

	V1	V2	V3	V4	V5	V6
<b>sesto</b>	M	M	F	F	M	M
<b>età</b>	28	20	38	47	37	30
<b>LCF</b>	2/8	2/8	2/8	2/8	2/8	2/8
<b>DRS</b>	27/30	24/30	24/30	24/30	22/30	24/30
<b>Durata SV (mesi)</b>	18	5	8	8	6	4
<b>Terapie (mg/die)</b>	-	Levetiracetam: 2000 mg  Olanzapine: 2.5 mg	Levetiracetam: 1500 mg  Amantadine: 400 mg	Levetiracetam: 1000 mg  Olanzapine: 2.5 mg  Amantadine: 300 mg  Dantrolene: 150 mg	<u>Propranolol</u> : 40 mg  Diazepam: 20 mg  Levetiracetam: 1000 mg  Bromocriptine: 15 mg	Olanzapine: 5 mg

### FOLLOW-UP CLINICO DEL CAMPIONE

Degli 6 pazienti inclusi nello studio, 3 pazienti (V1, V4 e V6) non hanno presentato modificazioni del quadro clinico e permangono in uno stato vegetativo (LCF 2). Il paziente 2, a distanza di 2 mesi, dallo studio è progredito in uno stato di MCS (LCF 3) e dopo altri due mesi in uno stato di disabilità grave (LCF 5). Attualmente è in uno stato di disabilità moderata (LCF 7). La paziente 3, a distanza di 5 mesi dallo studio, è progredita verso uno stato di MCS (LCF 3) e a distanza di altri 4 mesi è progredita in uno stato di disabilità grave, in cui permane tuttora (LCF 5). Il paziente 5, a distanza di 4 mesi dallo studio, è progredito in uno stato di MCS (LCF 3) e a distanza di altri 4 mesi è progredito verso uno stato di disabilità grave, in cui permane tuttora (LCF 5).

### CONFRONTO DEI VALORI DI MLT TRA NOTTE BASALE E NOTTE TEST

In tutti i soggetti si è osservata una buona riproducibilità dei valori di MLT plasmatici al punto 1 e 2 nelle due notti. Infatti, confrontando per ciascun soggetto le coppie dei dosaggi corrispondenti nella notte basale e test, non si sono evidenziate differenze significative [ $p=0,12$ ;  $p=0,94$ ]. La stessa analisi statistica (paired t-test) ci mostra che l'esposizione alla luce ha determinato variazioni statisticamente significative [ $p<0,001$ ] dei livelli di MLT, espressione di un effetto di soppressione osservato in gran parte della popolazione analizzata (**Tabella 12**).

	Paired Differences			Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	
<b>mlt1B - mlt1L</b>	-4,9	11,7	3	<b>0,12</b>
<b>mlt2B - mlt2L</b>	-0,2	11,6	3	<b>0,94</b>
<b>mlt3B - mlt3L</b>	20,8	16,8	4,3	<b>0,000</b>
<b>mlt4B - mlt4L</b>	25,5	20,9	5,4	<b>0,000</b>

**Tabella 12:** Paired t-test. Valori medi, deviazioni standard e differenze statistiche dei valori di MLT per orario corrispondente (1-4) nelle notti basale (B) e di esposizione alla luce (L).

### ANALISI DEI PROFILI DI SECREZIONE E SOPPRESSIONE DELLA MLT

#### a) Controlli

Nella tabella di seguito riportiamo i valori di MLT (espressi in pg/ml) della notte basale (B) e della notte test (L) ai diversi orari (1°= 00:30 am; 2°= 1:30 am; 3°= 2:30 am; 4°= 3:30 am) dei soggetti di controllo (**Tabella 13**).

ID	Sesso	Età	MLT B 1°	MLT B 2°	MLT B 3°	MLT B 4°	MLT L 1°	MLT L 2°	MLT L 3°	MLT L 4°
Ctrl1	F	28	69	47	60	53	91	43	19	12
Ctrl2	F	25	40	78	51	48	39	62	15	7
Ctrl3	M	28	23	54	54	76	40	56	18	9
Ctrl4	M	48	16	35	41	48	14	29	11	8
Ctrl5	M	32	32	47	51	60	35	51	19	12
Ctrl6	M	40	19	36	36	33	15	20	6	6
Ctrl7	F	47	51	63	59	52	68	67	23	20
Ctrl8	F	36	10	25	32	61	15	30	23	34
Ctrl9	M	25	63	101	84	88	78	91	44	58

**Tabella 13:** Valori di MLT (pg/ml) della notte basale (B) e della notte test (L) ai diversi orari (1°= 00:30 am; 2°= 1:30 am; 3°= 2:30 am; 4°= 3:30 am) dei soggetti di controllo

Nella notte basale tutti i soggetti hanno presentato un aumento fisiologico dei livelli di MLT. L'analisi della varianza intraindividuale (ANOVA) tra i 4 prelievi in condizioni basali, ha evidenziato differenze significative tra le concentrazioni di MTL nei diversi prelievi ( $p=0.004$ ) a conferma del fatto che si è verificato tale aumento fisiologico dei livelli di MLT. Come atteso per la nota variabilità interindividuale, i valori plasmatici di MLT più elevati sono stati rilevati nei diversi soggetti ad orari differenti [43] (**Figura 22**). Il profilo di secrezione individuale della notte basale (linea blu scuro) e della notte di esposizione alla luce (linea azzurra) sono illustrati da ciascuno dei grafici sottostanti (**Figura 23**).

Come è evidente dai grafici tutti i soggetti hanno presentato una riduzione significativa dei livelli di MLT dopo esposizione alla luce. Nei controlli 8 e 9 il valore di MLT alla 2° ora di stimolazione luminosa (3:30) è leggermente superiore al valore rilevato dopo la prima ora di esposizione alla luce (2:30), tuttavia comunque inferiore al corrispondente valore della notte basale.

#### b) Pazienti in stato vegetativo

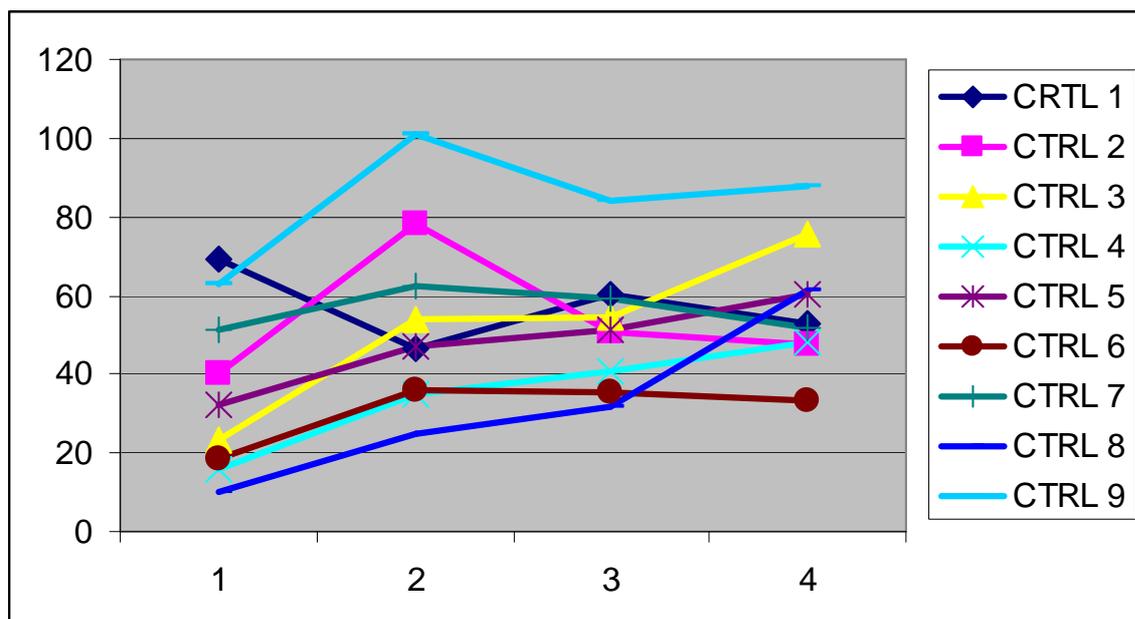
Nella **Tabella 14** riportiamo i valori di MLT (espressi in pg/ml) della notte basale (B) e della notte test (L) ai diversi orari (1°= 00:30 am; 2°= 1:30 am; 3°= 2:30 am; 4°= 3:30 am) dei pazienti.

**Tabella 14:** Valori di MLT (pg/ml) della notte basale (B) e della notte test (L) ai diversi orari (1°= 00:30 am; 2°= 1:30 am; 3°= 2:30 am; 4°= 3:30 am) dei pazienti in SV

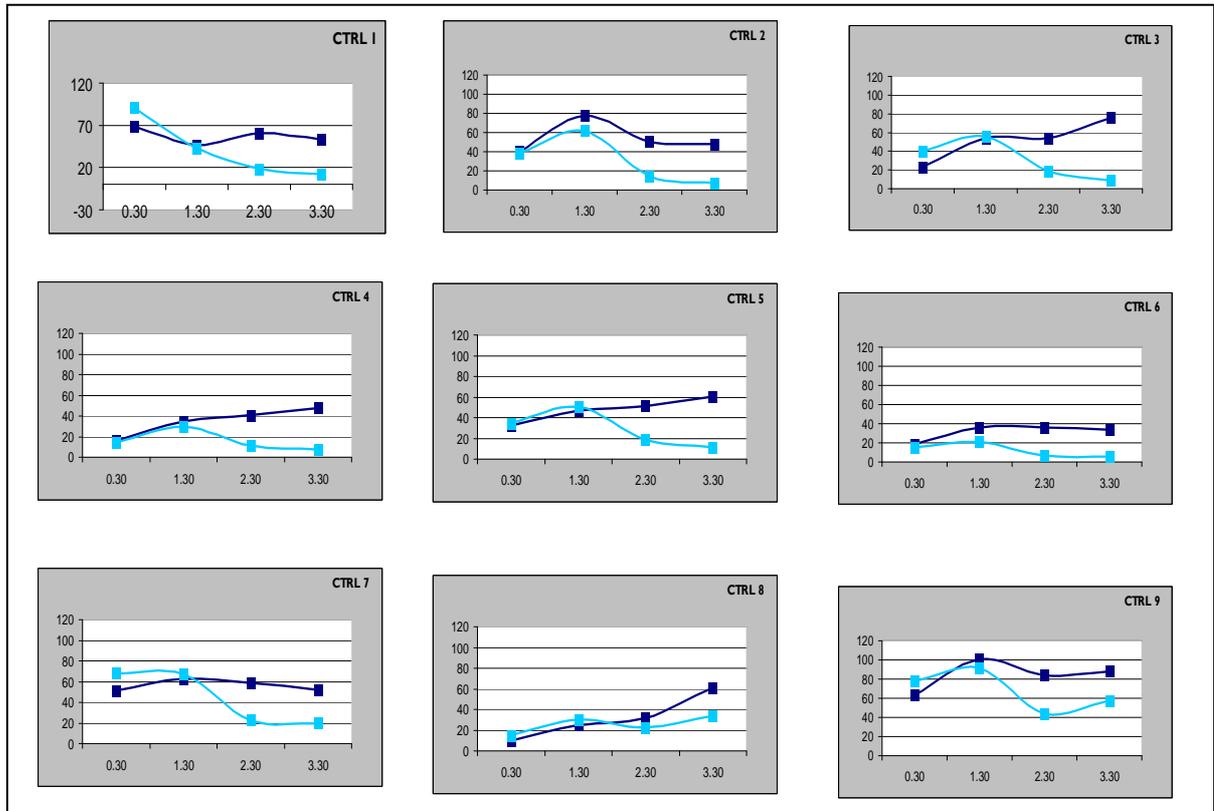
ID	Sesso	Et à	MLT B 1°	MLT B 2°	MLT B 3°	MLT B 4°	MLT L 1°	MLT L 2°	MLT L 3°	MLT L 4°
Pz1	M	28	4	7	6	2	4	2	4	3
Pz2	M	20	89	80	84	78	111	110	82	66
Pz3	F	38	21	20	11	22	11	13	7	8
Pz4	F	47	51	49	52	47	33	61	33	29
Pz5	M	37	6	10	8	3	10	14	10	8
Pz6	M	30	11	10	9	7	15	16	12	15

Nella notte basale tutti i soggetti hanno presentato livelli di MLT abbastanza sovrapponibili tra i diversi orari, senza l'aumento fisiologico che si è presentato nei controlli. L'analisi della varianza intraindividuale (ANOVA) tra i 4 prelievi in condizioni basali, non ha evidenziato infatti differenze significative tra le concentrazioni di MLT nei diversi prelievi ( $p=0.26$ ). La curva rappresentante il profilo di secrezione appare infatti in tutti i soggetti piatta (**Figura 24**). Il profilo di secrezione individuale della notte basale (linea blu scuro) e della notte di esposizione alla luce (linea azzurra) sono illustrati da ciascuno dei grafici sottostanti (**Figura 25**). Nella notte test, hanno presentato una riduzione dei livelli di MLT in seguito a stimolazione luminosa, i pazienti 1, 2, 3 e 4. Nei restanti due pazienti non si osserva una riduzione dei livelli di MLT.

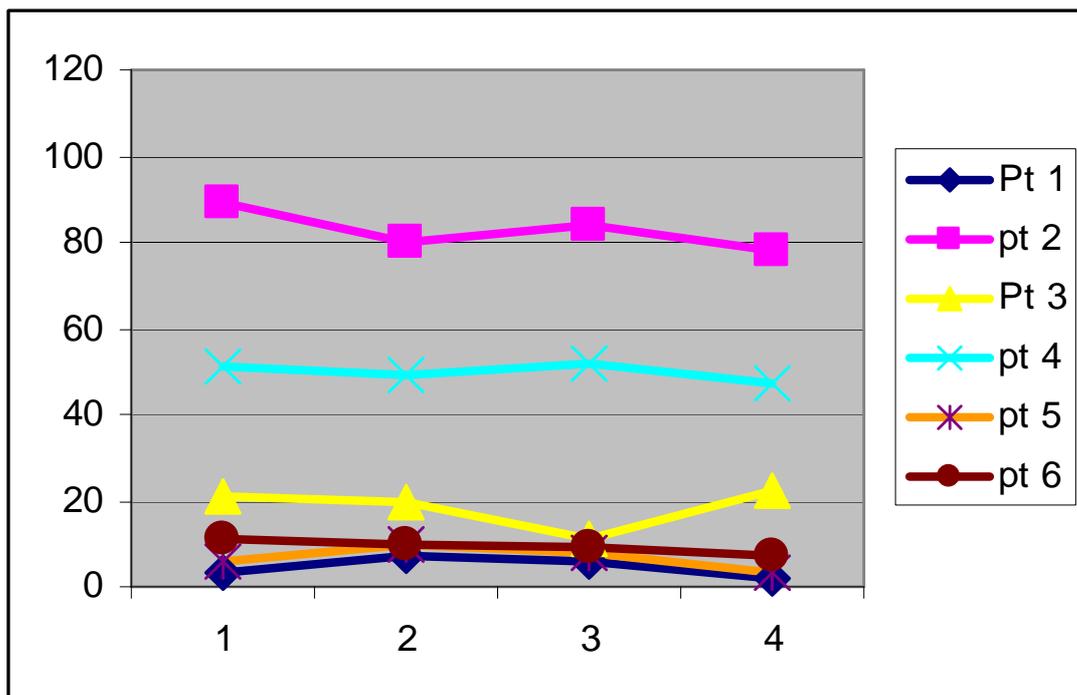
**Figura 22:** Profili della secrezione basale di MLT di tutti i controlli



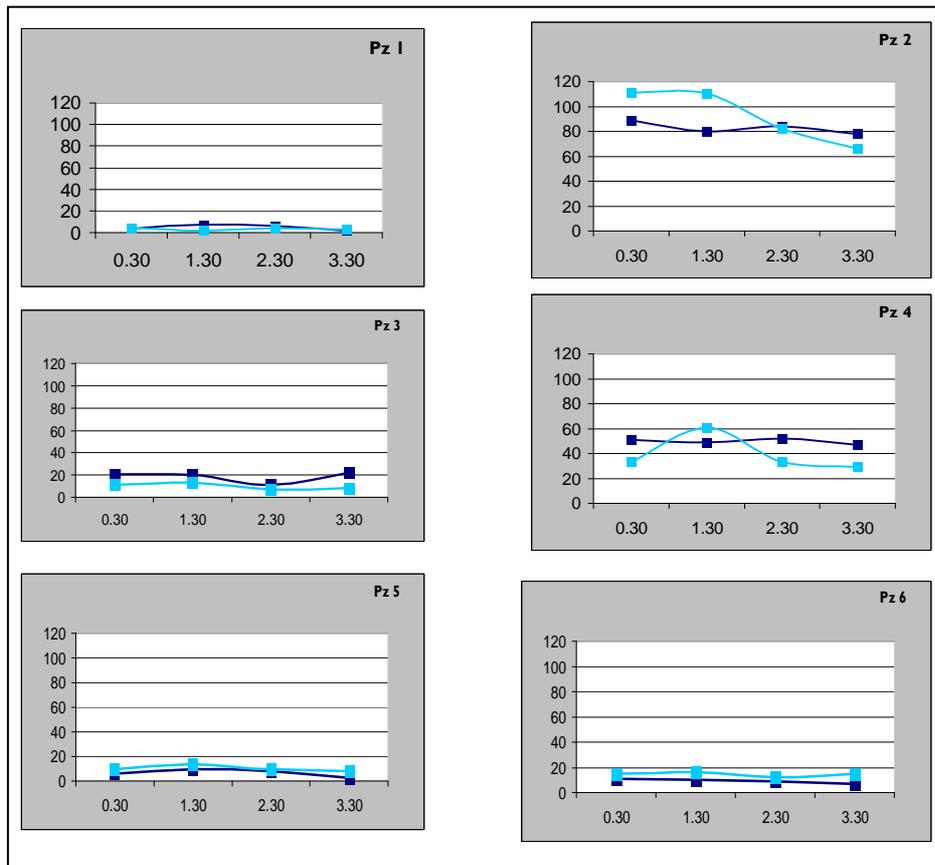
**Figura 23:** Profili individuali dei valori di MLT nella notte basale (linea blu scura) e nella notte test (linea azzurra) nei controlli



**Figura 24:** Profili della secrezione basale di MLT di tutti i pazienti in stato vegetativo



**Figura 25:** Profili individuali dei valori di MLT nella notte basale (linea blu scura) e nella notte test (linea azzurra) nei pazienti in stato vegetativo



Se confrontiamo i valori di MLT della notte basale osservati tra controlli e i pazienti con SV osserviamo che i pazienti in SV presentano livelli di MTL più bassi rispetto ai controlli con una differenza che raggiunge la significatività statistica (independent sample t-test) per i valori rilevati al 4° (ore 3:30) prelievo. Per i valori rilevati al 2° (ore 1:30) e 3° (ore 2:30) prelievo si osserva una tendenza alla significatività (**Tabella 15**).

**Tabella 15:** Test t di Student per i punteggi di MLT basale nel confronto tra controlli e VS

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means			
	Equal variances assumed	F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)
<b>mlt1</b>	assumed	1,626	0,225	0,396	13	0,699
<b>B</b>	not assumed			0,361	7,69	0,728
<b>mlt2</b>	assumed	0,570	0,464	1,801	13	0,095
<b>B</b>	not assumed			1,722	9,21	0,118
<b>mlt3</b>	assumed	5,953	0,030	1,913	13	0,078
<b>B</b>	not assumed			1,667	10,478	0,142
<b>mlt4</b>	assumed	3,363	0,09	2,596	13	<b>0,022*</b>
<b>B</b>						

not assumed

2,300

6,93

0,055

**PUNTEGGI DI SOPPRESSIONE DELLA MLT CON LA LUCE**

Nella tabella sottostante sono riportati i valori medi e le rispettive DS dei singoli punteggi nei due gruppi (**Tabella 16**).

Punteggio medio (±DS)	CTRLs	VS
caMSS	-95,27 (±36,11)	-3,8 (±26,4)
caMSS1h	-80,52 (±19,66)	-11,9 (±16,66)
caMSS2h	-110,02 (±57,18)	4,25 (±44,71)
caMSSbis	-72,83 (±24,21)	-0,76 (±52,03)
caMSS1h bis	-62,09 (±16,74)	-9,84 (±71,36)
caMSS2h bis	-83,56 (±37,66)	4,36 (±59,82)
SuppressionRate	67,12 (±16,67)	-4,32 (±50,95)
lucenetto	60,86 (±23,39)	17,21 (±44,4)

**Tabella 16:** **caMSS:**  $100 \times \frac{((PostL - PreL)/PreL) - ((PostB - PreB)/PreB)}$ ; **caMSS 1h:**  $100 \times \frac{((3L - PreL)/PreL) - ((3B - PreB)/PreB)}$ ; **caMSS 2h:**  $\{100 \times \frac{((4L - PreL)/PreL) - ((4B - PreB)/PreB)}{2}\}$ ; **caMSS bis:**  $(100 \times \frac{((PostL - 2L)/2L) - ((PostB - 2B)/2B)})$ ; **caMSS 1h bis:**  $100 \times \frac{((3L - 2L)/2L) - ((3B - 2B)/2B)}$ ; **caMSS 2h bis:**  $100 \times \frac{((4L - 2L)/2L) - ((4B - 2B)/2B)}$ ; **suppression rate:**  $100 \times \frac{((PostB) - (PostL))}{(PostB)}$ ; **luce netto:**  $100 - \frac{100 \times (PostL/2L)}{((1B+2B)/2)}$ ;  $PostB = \frac{(3B+4B)}{2}$ ;  $PreL = \frac{(1L+2L)}{2}$ ;  $PostL = \frac{(3L+4L)}{2}$ .

Nella tabella sottostante sono riportati i valori dei diversi punteggi di soppressione nei soggetti di controllo e nei pazienti in stato vegetativo (**Tabella 17**).

Se consideriamo, in conformità con studi precedenti, un valore di suppression rate (vedi metodi) superiore al 33% quale indice di risposta positiva al test di soppressione della MLT con la luce, tre dei 6 pazienti VS (V1, V2, V5 e V6) presentano una mancata soppressione alla stimolazione luminosa [44].

Il confronto mediante test t di Student dei diversi punteggi di soppressione nel gruppo di controllo e nel gruppo di pazienti in stato vegetativo ha rilevato differenze significative in tutti i parametri indagati, come illustrato in tabella (**Tabella 18**).

Nella **Figura 26** vi è il confronto tra il valore medio del Suppression Rate dei controlli e quello dei controlli. Da tale grafico si conferma il fatto che tutti i controlli hanno presentato una soppressione in seguito a stimolazione luminosa, mentre i pazienti in stato vegetativo presentano un valore medio negativo con un'ampia deviazione standard, che depone per una scarsa soppressione al test di stimolazione luminosa.

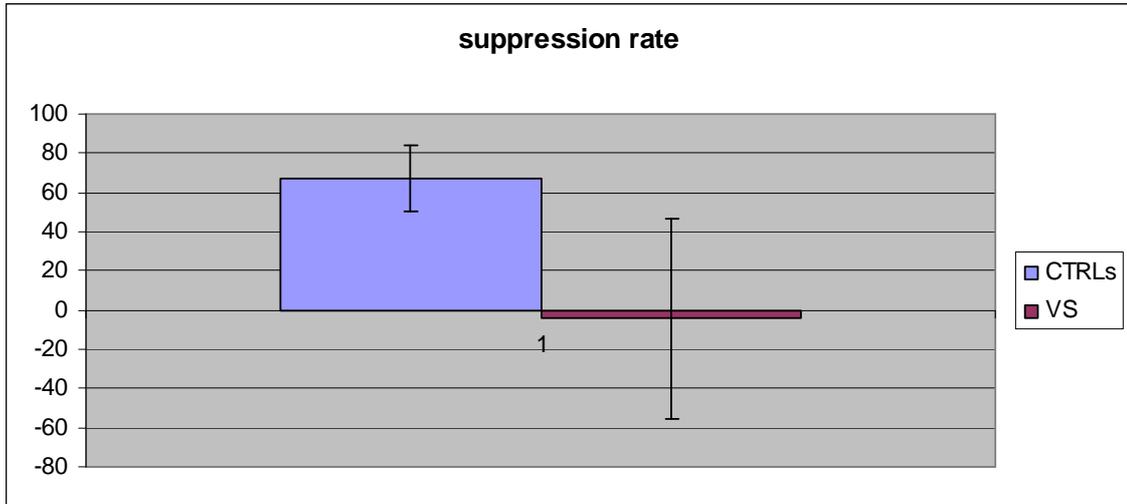
**Tabella 17:** Punteggi di soppressione nei soggetti di controllo e nei pazienti in stato vegetativo

ID	caMSS	caMSS I ora	caMSS II ora	caMSS bis	caMSS I ora bis	caMSS II ora bis	Suppression Rate	luce netto
CTRL1	-74,75	-75,87	-73,63	-85,19	-84,94	-85,44	72,80	64,23
CTRL2	-61,30	-56,45	-66,15	-45,38	-41,31	-49,46	77,68	82,28
CTRL3	-139,88	-102,15	-177,60	-95,66	-67,34	-123,97	78,67	75,19
CTRL4	-129,33	-106,98	-151,69	-93,88	-77,45	-110,31	78,16	67,05
CTRL5	-105,35	-84,87	-125,84	-88,74	-71,46	-106,02	72,48	69,86
CTRL6	-94,04	-97,26	-90,81	-67,95	-70,27	-65,63	83,20	71,74
CTRL7	-66,25	-69,81	-62,69	-57,11	-60,09	-54,13	61,72	68,47
CTRL8	-142,00	-80,96	-203,05	-92,42	-51,12	-133,72	38,68	5
CTRL9	-44,52	-50,37	-38,68	-29,10	-34,82	-23,39	40,70	43,96
V1	36,23	3,45	69,00	98,32	137,36	117,84	<b>7,65</b>	-70,63
V2	-28,68	-25,49	-31,88	-30,42	-36,46	-33,44	<b>8,74</b>	32,88
V3	-15,83	9,26	-40,91	2,52	-49,26	-23,37	53,12	41,28
V4	-31,94	-33,92	-29,96	-51,42	-45,60	-48,51	36,92	48,43
V5	6,25	-16,67	29,17	-8,57	27,14	9,29	<b>-63,64</b>	35,71
V6	10,91	-8,29	30,11	-15,00	23,75	4,38	<b>-68,75</b>	15,63

**Tabella 18:** Test t di student per i punteggi di soppressione nel confronto tra controlli e VS

Punteggio	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means			
	Equal variances	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
caMSS	assumed	1,142	0,305	-5,304	13	0,000
	not assumed			-5,662	12,80	0,000
caMSSI h	assumed	0,158	0,698	-7,009	13	0,000
	not assumed			-7,260	12,08	0,000
caMSS2h	assumed	0,760	0,399	-4,111	13	0,001
	not assumed			-4,330	12,53	0,001
caMSSbis	assumed	1,177	0,298	-3,652	13	0,003
	not assumed			-3,171	6,463	0,017
caMSSI hbis	assumed	8,171	0,013	-2,942	13	0,011
	not assumed			-2,413	5,369	0,057
caMSS2hbis	assumed	0,272	0,610	-3,518	13	0,004
	not assumed			-3,202	7,656	0,013
SuppressionRate	assumed	10,72	0,006	3,964	13	0,002
	not assumed			3,318	5,72	0,017
lucenetto	assumed	1,329	0,270	2,502	13	0,026
	not assumed			2,212	6,874	0,063

**Figura 26:** Confronto tra i valori medi di Suppression Rate dei controlli e dei pazienti in stato vegetativo





## **CONCLUSIONI**

La prima parte sperimentale del nostro studio era incentrata nella valutazione dei ritmi circadiani dei pazienti in stato vegetativo, in particolare del ciclo sonno-veglia e del ritmo della temperatura corporea interna in condizioni basali e in seguito a stimolazione luminosa. Dalla nostra esperienza è emersa una difficoltà nella lettura delle fasi del sonno e nella sua classificazione. Un limite del nostro studio è sicuramente l'assenza di una registrazione video-EEG, che avrebbe potuto fornirci informazioni sul comportamento del paziente durante la registrazione. L'analisi delle caratteristiche polisonnografiche della veglia dei nostri pazienti ha evidenziato un'attività theta-delta frammentata a ritmi rapidi in 7 pazienti, mentre nei restanti due pazienti (pz 6 e pz 7) era ben strutturata in un'attività alfa. In tutti i pazienti, ad eccezione del paziente 3, era inoltre possibile identificare uno stato di veglia quieta, caratterizzata dalla comparsa di movimenti oculari lenti dell'addormentamento pur mantenendo un tracciato elettroencefalografico di veglia. Tale veglia quieta poteva precedere la comparsa di fasi di sonno leggero o comparire in maniera random nel corso della giornata e potrebbe essere espressione di oscillazioni del livello di vigilanza, che spesso non riescono a concretizzarsi in un sonno vero e proprio. Nei due pazienti con attività di veglia ben strutturata erano presenti anche elementi caratteristici della fase 2 di sonno NREM (fusi del sonno e K-complessi) ben definiti, mentre nei restanti pazienti erano presenti solo abbozzi di tali elementi. Le fasi di sonno profondo erano nella gran parte dei pazienti caratterizzate dalla permanenza di ritmi rapidi frammentati ad onde lente polimorfe. La fase REM era ben strutturata sia per le caratteristiche elettroencefalografiche (tracciato di bassa ampiezza, a volte frammentato ad onde aguzze) sia per la presenza di movimenti oculari rapidi. Nei pazienti in cui è stato possibile indagare l'attività del muscolo miloideo, per l'assenza di artefatti tecnici, era presente anche la fisiologica atonia.

Dall'analisi dei dati polisonnografici emerge la presenza di alterazioni del ciclo sonno-veglia nei pazienti in stato vegetativo in condizioni basali. Ad eccezione del paziente 1 e del paziente 3, in cui il sonno è distribuito maggiormente nelle ore diurne, e della paziente 6 che presenta una fase anticipata di sonno dalle ore 21 alle ore 3, nei restanti pazienti il sonno tende a concentrarsi nelle ore notturne (ore 23-7). In tutti i pazienti non si osserva un'organizzazione del sonno in cicli ben caratterizzati per l'alternanza di sonno NREM e REM, ma la presenza di un sonno molto frammentato per la comparsa random delle varie fasi del sonno e per continui e talora prolungati risvegli (spesso

causati da fattori esterni come cambio di postura). Nella maggioranza dei pazienti è inoltre possibile identificare addormentamenti in fase REM sia notturni che diurni. Solo nel paziente 3 non è stato possibile identificare fasi REM.

Dal confronto coi controlli è inoltre emersa una riduzione del tempo totale di sonno e un'efficienza del sonno ridotta nei pazienti rispetto ai controlli con tendenza alla significatività ( $p=0.07$ ). Tali dati diventano significativi se si analizza solo il sonno notturno ( $p=0.005$ ). Un'altro dato emerso dal confronto coi controlli è il fatto che i nostri pazienti tendono a presentare più fasi di sonno 1 rispetto alle altre fasi di sonno NREM. La percentuale di sonno 1 è infatti risultata significativamente superiore nei pazienti rispetto ai controlli sia per quanto riguarda il sonno delle 24 ore ( $p=0.01$ ) sia per quanto riguarda il sonno notturno ( $p=0.01$ ) e diurno ( $p=0.05$ ), mentre invece il tempo trascorso in fase 2 e 3 e la percentuale di fase 2 sono risultati inferiori nei pazienti rispetto ai controlli in tutti e tre i periodi di analisi. Durante il sonno notturno anche il tempo trascorso in fase REM è risultato inferiore nei pazienti rispetto ai controlli con tendenza alla significatività ( $p=0.08$ ). L'analisi della varianza intraindividuale (ANOVA) tra i giorni di registrazione ha evidenziato differenze significative solo per le variabili del tempo totale di sonno ( $p=0.04$ ) e del tempo trascorso in fase REM ( $p=0.02$ ) durante le ore diurne.

Per quanto riguarda il ritmo della temperatura corporea interna si confermano i dati di letteratura [9] della presenza di un normale ritmo delle 24 ore nei pazienti in stato vegetativo in condizioni basali e in seguito a stimolazione luminosa.

Per quanto riguarda la stimolazione luminosa effettuata nelle ore notturne per 4 ore e per 7 giorni, essa sembra non determinare modificazioni nel ritmo della temperatura corporea e scarsi effetti sul ciclo sonno-veglia. Determina infatti un aumento del tempo totale di sonno e del tempo trascorso in fase REM, ma solo delle ore diurne, mentre non sembrerebbe incidere sui parametri del sonno notturno e delle 24 ore. Un limite del nostro studio è quello che non è stato possibile quantificare quanto stimolo luminoso raggiungesse effettivamente la retina dei pazienti. I pazienti erano infatti lasciati liberi di dormire con conseguente chiusura degli occhi durante la stimolazione luminosa. In tal caso, infatti, come dimostrato da Hatonen e coll., la quantità di luce che arriva alla retina sarebbe significativamente ridotta [38] con conseguente minore stimolazione. Studi successivi dovrebbero essere effettuati per stabilire quali sono i parametri ideali per ottenere effetti maggiori (periodo del giorno migliore, durata giornaliera di esposizione, durata del periodo di stimolazione, parametri di stimolazione).

In conclusione dai nostri dati emerge un normale ritmo della temperatura corporea interna, mentre si osserva un'alterazione del ciclo sonno veglia che appare disorganizzato. In particolare, i pazienti in stato vegetativo mostrano una riduzione del tempo totale di sonno notturno e un incremento della fase 1 di sonno NREM a discapito delle altre fasi di sonno NREM. Da segnalare numerosi addormentamenti in fase REM sia diurni che notturni.

Il numero esiguo di pazienti non ci permette di trarre conclusioni definitive riguardo alla correlazione tra i quadri polisonnografici dei pazienti e l'outcome clinico, anche se non sembrerebbero esserci chiare correlazioni. Sicuramente il paziente 7, che attualmente è in una fase di disabilità moderata, presentava fasi di veglia e fasi di sonno ben strutturate, con rappresentazione di tutte le fasi di sonno e di una buona efficienza del sonno notturno. In tale paziente inoltre la stimolazione luminosa aveva determinato un incremento del tempo totale di sonno, soprattutto diurno. La paziente 4, che è attualmente in uno stato di disabilità moderata, presentava invece un pattern di sonno con prevalenza delle sole fasi di sonno leggero, a discapito delle fasi di sonno profondo e REM. L'altro paziente che è attualmente in uno stato di disabilità moderata, presentava un pattern ipnico con fasi di sonno ben strutturate, ma con un tempo totale di sonno REM ridotto.

La seconda parte sperimentale di questo studio è stata concepita per studiare le concentrazioni basali di melatonina, comparando pazienti in stato vegetativo a soggetti sani, in quanto il ritmo della melatonina è proprio uno dei marker biochimici più agevoli per investigare i ritmi biologici degli organismi. Inoltre studiando come variano le sue concentrazioni in seguito a stimolazione luminosa (utilizzando una misura funzionale quale il test di soppressione della MLT (TSM) con la luce), è possibile avere informazioni riguardo l'integrità del tratto retino ipotalamico dei pazienti in stato vegetativo.

Dall'analisi dei risultati della notte basale abbiamo osservato che i livelli plasmatici di MLT, ad orari corrispondenti, sono più ridotti nei pazienti in stato vegetativo rispetto ai controlli. Tale riduzione è significativa in corrispondenza dell'ultimo prelievo. A differenza dei controlli infatti in cui si osserva un aumento fisiologico dei livelli di MLT nel corso della notte, nei pazienti in stato vegetativo tale aumento non si verifica e le concentrazioni di MLT rimangono più o meno sovrapponibili nei quattro prelievi. La curva rappresentante il profilo di secrezione individuale appare pertanto piatta in tutti i pazienti a differenza della curva dei controlli. Nella maggior parte dei pazienti si

osservano inoltre livelli bassi di MLT (tra i 4 e i 22 pg/ml), ad eccezione di due pazienti in cui si osservano livelli più alti. L'alterazione del ritmo della melatonina ritrovato nei nostri pazienti è compatibile con l'alterazione del ciclo sonno-veglia che abbiamo ritrovato nella prima parte sperimentale del nostro studio. La riduzione dei livelli basali di MLT nei pazienti in stato vegetativo potrebbe essere legato ad alterazioni anatomiche a carico del circuito deputato alla produzione della melatonina. È d'altra parte possibile che il profilo di secrezione in tali pazienti possa essere ritardato rispetto ai controlli e che nel momento della nostra valutazione non fossero ancora saliti i livelli di MLT.

La stimolazione luminosa ha determinato, come atteso, una riduzione dei livelli plasmatici di MLT significativa nella popolazione di controllo [26, 28]. Nei pazienti in stato vegetativo, tale riduzione si è verificata solo in quattro pazienti (paziente 1, 2, 3 e 4). Se consideriamo però come indicatore di soppressione il punteggio “*suppression-rate*”, che rapporta il valore di MLT (espresso come media del valore ottenuto durante l'esposizione alla luce) al valore medio agli stessi punti nella notte basale, è evidente come tutti i soggetti di controllo presentino una risposta di soppressione alla luce superiore al 33% [44], mentre solo i due pazienti 3 e 4 la presentano superiore al 33%. I pazienti 1 e 2 presentano una risposta di soppressione nettamente inferiore (7,65 e 8,74). Il test è stato condotto utilizzando una luce blu con lunghezza d'onda di 470 nm, tenendo conto dello spettro di azione delle cellule ganglionari della retina intrinsecamente fotosensibili (ipRGCs) [26, 45, 46] in modo tale da ottenere una stimolazione efficace e specifica della via a partenza dalle ipRGCs esprimenti il fotopigmento MPS. La ridotta risposta al TSM in due dei pazienti in stato vegetativo e la assente risposta in altri due pazienti può essere variamente interpretata. Tale mancata risposta potrebbe essere legata ad alterazioni anatomiche del tratto retino-ipotalamico legate al danno cerebrale post-traumatico. Nel paziente 1, 5 e 6 potrebbe inoltre dipendere dai già bassi livelli basali di MTL, che potrebbero impedire di evidenziare l'effetto soppressivo della stimolazione luminosa.

Un limite di questo parte dello studio è sicuramente l'assenza di monitoraggio strumentale dello stato di vigilanza dei soggetti, per cui non è possibile escludere con certezza oscillazioni del livello di vigilanza con conseguente chiusura degli occhi durante la stimolazione luminosa. In tal caso, infatti, come dimostrato da Hatonen e coll., la risposta di soppressione della MLT sarebbe significativamente ridotta [38]. Inoltre, il timing fisso dell'esposizione alla luce utilizzato non assicura che la stimolazione luminosa sia avvenuta in coincidenza del picco notturno di secrezione

della MLT, che come è noto risulta estremamente variabile da soggetto a soggetto [39]. E' possibile che in soggetti che presentano un profilo di secrezione ritardato la risposta di soppressione non sia visibile, in quanto la stimolazione era troppo precoce [42].

Dato lo scarso numero di pazienti, non è possibile trarre conclusioni certe riguardo la correlazione tra concentrazioni basali di MLT e l'outcome dei pazienti. Dall'analisi dei dati emerge però che il paziente 2, che è progredito verso uno stato di MCS dopo appena un mese dallo studio e che attualmente è in uno stato di disabilità moderata, è il paziente che presentava i più elevati livelli di MLT al momento dello studio. E' ormai accertato che la melatonina svolge un ruolo protettivo sulle cellule del sistema nervoso centrale. La MLT e i suoi metaboliti sono infatti dei potenti antiossidanti in virtù della loro abilità di eliminare i radicali liberi e di stimolare l'attività degli enzimi antiossidanti [47]. Queste proprietà rendono la MLT una molecola di grande importanza nella protezione del cervello da danni ossidativi, come si possono verificare in seguito a traumi cranici [48, 49] o spinali, ma anche in seguito a ictus cerebrali [50] e condizioni neuro-degenerative come la sclerosi laterale amiotrofica [51] e la malattia di Parkinson. Per quanto riguarda gli altri pazienti, la paziente 4, che presentava dei livelli di MTL intermedi, non ha presentato modificazioni del quadro clinico. La paziente 3 e il paziente 5, che sono attualmente in uno stato di disabilità grave, presentavano dei livelli di MTL bassi rispetto alla globalità dei controlli. Bisogna tuttavia sottolineare che il paziente 5 era in terapia con  $\beta$  bloccanti, che interferiscono col metabolismo della MLT, e potrebbero avere contribuito ai bassi livelli di MLT. I pazienti 1 e 6 presentavano bassi livelli di MTL e non hanno presentato modificazioni del quadro clinico. Anche i dati relativi al test di soppressione della melatonina sono contrastanti: i pazienti 2 e 5 che hanno presentato un buon outcome hanno presentato rispettivamente un basso e un assente livello di soppressione. Delle due pazienti che hanno presentato un buon livello di soppressione, solo una ha presentato un outcome positivo.

In conclusione, sono necessari ulteriori studi con un aumento del campione per valutare se i dosaggi di MLT potrebbero essere indicatori di un diverso outcome.



## **BIBLIOGRAFIA**

1. The Multi-Society task force on PVS. Medical aspects of the persistent vegetative state. *N Engl J Med* 1994; 330: 1499-508.
2. Giacino JT, Ashwal S, Childs N, Cranford R, Jennet B, Katz DI, Kelly JP, Rosenberg JH, Whyte J, Zafonte RD, Zasler RD, Zasler ND. The minimally conscious state. Definition and diagnostic criteria. *Neurology* 2002; 58: 349-353.
3. Isono M, Wakabayashi Y, Fujiki M, Kamida T, Kobayashi H. Sleep cycle in patients in a state of permanent unconsciousness. *Brain Injury* 2002; 16 (8): 705-712.
4. Oksenberg A, Gordon C, Arons E, Sazbon L. Phasic activities of rapid eye movement sleep in vegetative state patients. *Sleep* 2001; 24(6): 703-706.
5. D'Aleo G, Bramanti P, Silvestri R, Saltuari L, Gerstenbrand F, Di Pierri R. Sleep spindles in the initial stages of the vegetative state. *Ital J Neurol Sci* 1994; 15: 347-351.
6. Chèliot-Heraut F, Rubinsztajn R, Estournet B. Prognostic value of evoked potentials and sleep recordings in the prolonged comatose state of children. Preliminary data. *Neurophysiol Clin* 2001; 31: 283-292.
7. Pattoneri P, Tirabassi G, Pelà G, Astorri E, Mazzocchi A, Borghetti A. Circadian blood pressure and heart rate changes in patients in a persistent vegetative state after traumatic brain injury. *The Journal of Clinical Hypertension* 2005; 7 (12): 734-738.
8. Fukudome Y, Abe I, Saku Y, Matsumura K, Sadoshima S, Utunomiya H, Fujishima M. Circadian blood pressure in patients in a persistent vegetative state. *Am J Physiol* 1996; 270 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 39): R1109-R1114.
9. Kropyvnytskyi I, Saunders F, Pols M, Zarowski C. Circadian rhythm of temperature in head injury. *Brain Injury* 2001; 15 (6): 511-518.
10. Dauch WA, Bauer S. Circadian rhythms in the body temperatures of intensive care patients with brain lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1990; 53: 345-347.

11. Duffy JF, Kronauer RE, Czeisler CA. Phase shifting human circadian rhythms: influence of sleep timing, social contact and light exposure. *J Physiol* 1996; 495: 289–297.
12. Campbell SS, Kripke DF, Gillin JC, Hrubovcak JC. Exposure to light in healthy elderly subjects and Alzheimer's patients. *Physiol Behav* 1988; 42: 141–144.
13. Shochat T, Martin J, Marler M, Ancoli-Israel S. Illumination levels in nursing home patients: effects on sleep and activity rhythms. *J Sleep Res* 2000; 9: 373–379.
14. Van Someren EJ, Mirmiran M, Swaab DF. Non-pharmacological treatment of sleep and wake disturbances in aging and Alzheimer's disease: chronobiological perspectives. *Behav Brain Res* 1993; 57: 235–253.
15. Campbell SS, Terman M, Lewy AJ, Dijk DJ, Eastman CI, Boulos Z. Light treatment for sleep disorders: consensus report: V— Age-related disturbances. *J Biol Rhythms* 1995; 10: 151–154.
16. McCurry SM, Reynolds CF, Ancoli-Israel S, Teri L, Vitiello MC. Treatment of sleep disturbances in Alzheimer's disease. *Sleep Med Rev* 2000; 4: 603–628.
17. Lockley SW, Brainard GC, Czeisler CA. High Sensitivity of the Human Circadian Melatonin Rhythm to Resetting by Short Wavelength Light. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 88: 4502.
18. Cajochen C, Munch M, Kobiacka S, Krauchi K, Steiner R, Oelhafen P, Orgul S, Wirz-Justice A. High sensitivity of human melatonin, alertness, thermoregulation and heart rate to short wavelength light. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(3): 1311-6.
19. Ancoli-Israel S, Martin JL, Kripke DF, Marler M, Klauber MR..Effect of light treatment on sleep and circadian rhythms in demented nursing home patients. *J Am Geriatr Soc* 2002; 50: 282–289.
20. Ruger M, Gordijn MCM, Beersma DGM, de Vries B, Daan S. Time-of-day-dependent effects of bright light exposure on human psychophysiology: comparison of daytime and nighttime exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006; 290(5): R1413-20.
21. Lewy AJ, Sack RL, Singer CM, White DM. The phase shift hypothesis for bright light's therapeutic mechanism of action: theoretical considerations and experimental evidence. *Psychopharmacol Bull.* 1987; 23 (3): 349-53.

22. Dawson D, Encel N. Melatonin and sleep in humans. *J Pineal Res.* 1993; 15(1):1-12.
23. Goscinski I, Dembinska-Kiec A, Krupa M, Zdzienicka A, Moskala M. Determination of melatonin concentrations in patients with consciousness disturbances after craniocerebral trauma. Preliminary communication. *Neurol Neurochir Pol.* 2001; 35(1): 63-71.
24. Moskala M, Krupa M, Goscinski I, Traczewski W. Circadian rhythms of melatonin of patients with severe traumatic brain injury. *Neurol Neurochir Pol.* 2004; 38(5): 401-4.
25. Paparrigopoulos T, Melissaki A, Tsekou H, Efthymiou A, Kribeni G, Baziotis N, Geronikola X. Melatonin secretion after head injury: A pilot study. *Brain Inj* 2006; 20(8): 873–878.
26. Thapan K, Arendt J, Skene DJ. An action spectrum for melatonin suppression: evidence for a novel non-rod, non-cone photoreceptor system in humans. *J Physiol.* 2001; 15; 535 (Pt 1): 261-7.
27. Herljevic M, Middleton B, Thapan K, Skene DJ. Light-induced melatonin suppression: age-related reduction in response to short wavelength light. *Exp Gerontol.* 2005; 40(3): 237-42.
28. Brainard GC, Hanifin JP, Greeson JM, Byrne B, Glickman G, Gerner E, Rollag MD. Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor. *J Neurosci.* 2001; 21(16): 6405-12.
29. Halberg F, Reinberg A. Rythmes circadiens et rythmes de basses frequences en physiologie humaine. *J Physiol* 1967; 59 Suppl:117–200.
30. Mojon A, Fernandez JR, Hermida RC. ChronoLab: an interactive software package for chronobiologic time series analysis written for the Macintosh computer. Bioengineering and Chronobiology Laboratories, E.T.S.I. Telecomunicacion, University of Vigo, 1994
31. Rechtschaffen A, Kales A. A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects. Washington: NIH; 1968. Publication 204).
32. Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev.* 2005; 9(1): 11-24.

33. Higuchi S, Motohashi Y, Ishibashi K, Maeda T. Less exposure to daily ambient light in winter increases sensitivity of melatonin to light suppression. *Chronobiol Int.* 2007; 24(1): 31-43.
34. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol.* 2004; 25(3-4): 177-95.
35. Mayeda A, Mannon S, Hofstetter J, Adkins M, Baker R, Hu K, Nurnberger J Jr. Effects of indirect light and propranolol on melatonin levels in normal human subjects. *Psychiatry Res.* 1998; 81(1): 9-17.
36. Morris M, Lack L, Barrett J. The effect of sleep/wake state on nocturnal melatonin excretion. *J Pineal Res.* 1990; 9(2): 133-8.
37. Von Treuer K, Norman TR, Armstrong SM. Overnight human plasma melatonin, cortisol, prolactin, TSH, under conditions of normal sleep, sleep deprivation, and sleep recovery. *J Pineal Res.* 1996; 20(1): 7-14.
38. Hästönen T, Alila-Johansson A, Mustanoja S, Laakso ML. Suppression of melatonin by 2000-lux light in humans with closed eyelids. *Biol Psychiatry.* 1999; 46(6): 827-31.
39. Arendt J, Aldhous M, Wright J. Synchronisation of a disturbed sleep-wake cycle in a blind man by melatonin treatment. *Lancet* 1988; 1: 772-3.
40. Hanifin JP, Stewart KT, Smith P, Tanner R, Rollag M, Brainard GC. High-intensity red light suppresses melatonin. *Chronobiol Int.* 2006; 23(1-2): 251-68.
41. Brainard GC, Hanifin JP, Greeson JM, Byrne B, Glickman G, Gerner E, Rollag MD. Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor. *J Neurosci.* 2001; 21(16): 6405-12.
42. Hébert M, Martin SK, Lee C, Eastman CI. The effects of prior light history on the suppression of melatonin by light in humans. *J Pineal Res.* 2002; 33(4): 198-203.
43. Arendt J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev Reprod.* 1998; 3(1): 13-22.
44. Czeisler CA, Shanahan TL, Klerman EB, Martens H, Brotman DJ, Emens JS, Klein T, Rizzo JF 3rd. Suppression of melatonin secretion in some blind patients by exposure to bright light. *N Engl J Med* 1995; 332(1): 6-11.

45. Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*. 2002; 295(5557): 1070-3.
46. Lucas RJ, Douglas RH, Foster RG. Characterization of an ocular photopigment capable of driving pupillary constriction in mice. *Nat Neurosci*. 2001; 4(6): 621-6.
47. Reiter RJ, Tan D-X, Manchester LC, Tamura H. Melatonin defeats neurally-derived free radicals and reduces the associated neuromorphological and neuron-behavioral damage. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2007; 58, Suppl 6: 5-22.
48. Ates O, Cayli S, Gurses I, Yucel N, Iraz M, Altinoz E, Kocak A, Yologlu S. Effect of pinealectomy and melatonin replacement on morphological and biochemical recovery after traumatic brain injury. *Int J Dev Neurosci*. 2006; 24(6): 357-63.
49. Ozdemir D, Uysal N, Gonenc S, Acikgoz O, Sonmez A, Topcu A, Ozdemir N, Duman M, Semin I, Ozkan H. Effect of melatonin on brain oxidative damage induced by traumatic brain injury in immature rats. *Physiol Res*. 2005; 54(6): 631-7.
50. Chen HY, Chen TY, Lee MY, Chen ST, Hsu YS, Kuo YL, Chang GL, Wu TS, Lee EJ. Melatonin decreases neurovascular oxidative/nitrosative damage and protects against early increases in the blood-brain barrier permeability after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Pineal Res*. 2006; 41(2): 175-82.
51. Weishaupt JH, Bartels C, Polking E, Dietrich J, Rohde G, Poeggeler B, Mertens N, Sperling S, Bohn M, Huther G, Schneider A, Bach A, Sirén AL, Hardeland R, Bahr M, Nave KA, Ehrenreich H. Reduced oxidative damage in ALS by high-dose enteral melatonin treatment. *J Pineal Res*. 2006; 41(4): 313-23.

