

SPECIALITÀ E PROFESSIONI A COLLOQUIO

Rene e ritmi circadiani: un nuovo mondo?



Roberto Manfredini¹, Ferdinando Carlo Sasso², Marco Pala¹, Alfredo De Giorgi¹, **Fabio Fabbian**¹

(1) Clinica Medica, Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Ferrara

(2) Dipartimento di Medicina Interna e Sperimentale, Seconda Università di Napoli

Abstract

La Cronobiologia è quella branca delle scienze biomediche dedicate allo studio dei ritmi biologici. Tali ritmi esistono ad ogni livello degli organismi viventi e, a seconda della lunghezza del loro ciclo, vengono classificati in tre tipi principali: ritmi circadiani, ultradiani e infradiani. I ritmi circadiani sono quelli più comunemente e largamente studiati. L'orologio circadiano principale (master clock) è stato localizzato nel nucleo soprachiasmatico dell'ipotalamo, ed è regolato dalla luce. Inoltre, il master clock a sua volta sembra possa regolare una serie di orologi periferici attraverso una modulazione di tipo neuroumorale. Orologi circadiani sono stati identificati in praticamente tutti i tipi di cellule dei mammiferi, e sembra che i geni circadiani siano essenziali per la salute cardiovascolare. Disturbi a carico dei ritmi circadiani renali sono stati recentemente considerati essere alla base di alcuni fattori di rischio, quali ipertensione, poliuria ed altri quadri patologici in grado di favorire la fibrosi a livello renale. L'origine di questi ritmi è sempre stata attribuita alla risposta reattiva del rene a modificazioni circadiane nel volume e/o nella composizione dei fluidi extracellulari regolata da cicli attività/riposo e alimentazione/digiuno. Tuttavia, la maggior parte dei ritmi escretori renali persistono a lungo anche in assenza di fattori regolatori ambientali. Queste osservazioni hanno condotto all'ipotesi dell'esistenza di un meccanismo intrinseco, auto mantenuto, in grado di consentire al rene di anticipare svariate variazioni circadiane, prevedibili, dell'omeostasi. Le basi molecolari di questo meccanismo sono rimaste oscure sino alla recente scoperta dell'orologio biologico circadiano dei mammiferi, composto di un complesso sistema di autoregolazione operato da circuiti di feedback trascrizionale/traslazionale, la cui presenza è stata dimostrata anche a livello renale (figura 1).

Parole chiave: cronobiologia, patologie cardiovascolari, rene, ritmi circadiani

The Kidney and Circadian Rhythms: a Whole New World?

Chronobiology is a branch of biomedical sciences devoted to the study of biological rhythms. Biological rhythms exist at any level of living organisms and, according to their cycle length, may be divided into three main types: circadian, ultradian, and infradian rhythms. Circadian rhythms are the most commonly and widely studied. The principal circadian clock is located in the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus, and is supposed to regulate peripheral clocks via neurohumoral modulation. Circadian clocks have been identified within almost all mammalian cell types, and circadian clock genes seem to be essential for cardiovascular health. Disturbance of the renal circadian rhythms is increasingly recognized as a risk factor for hypertension, polyuria, and other diseases and may contribute to renal fibrosis. The origin of these rhythms has been attributed to the reactive response of the kidney to circadian changes in volume and/or in the composition of extracellular fluids regulated by rest/activity and feeding/fasting cycles. However, most of the renal excretory rhythms persist for long periods of time, even in the absence of periodic environmental cues. These observations led to the hypothesis of the existence of a self-sustained mechanism, enabling the kidney to anticipate various predictable circadian challenges to homeostasis. The molecular basis of this mechanism remained unknown until the recent discovery

of the mammalian circadian clock, comprising a system of autoregulatory transcriptional/translational feedback loops, which have also been found in the kidney.

Key words: cardiovascular diseases, chronobiology, circadian rhythms, kidney

Cronobiologia e ritmi biologici

La Cronobiologia è quella branca delle scienze biomediche dedicate allo studio dei ritmi biologici. Tali ritmi esistono ad ogni livello degli organismi viventi e, a seconda della lunghezza del loro ciclo, vengono classificati in tre tipi principali: a) ritmi circadiani (dal latino *circa-diem*, caratterizzati da un periodo di circa 24 ore), b) ritmi ultradiani (periodo inferiore alle 24 ore), e c) ritmi infradiani (periodo superiore alle 24 ore). I ritmi circadiani sono quelli più comunemente e largamente studiati, e sono controllati dagli orologi circadiani. Questi ultimi possono essere definiti come un meccanismo molecolare su base trascrizionale, composto di circuiti feedback sia positive che negative, con un periodo libero (cosiddetto *free-running*) di circa 24 ore [1]. L'orologio circadiano principale (master clock) è stato localizzato nel nucleo soprachiasmatico (NSC), ed è regolato dalla luce. Inoltre, il master clock a sua volta sembra possa regolare una serie di orologi periferici attraverso una modulazione di tipo neuroumorale [1]. Orologi circadiani sono stati identificati in praticamente tutti i tipi di cellule dei mammiferi, compresi cardiomiociti, cellule muscolari lisce vascolari, e anche cellule endoteliali [2] (full text).

Il ruolo principale degli orologi biologici cellulari è rappresentato dalla cosiddetta *anticipazione*, ovvero la capacità di percepire l'ora del giorno e provvedere a rapide e adeguate risposte alle specifiche richieste che di volta in volta si presentano. Si è visto come questo meccanismo giochi un ruolo di particolare importanza nel mantenere la stabilità (omeostasi) delle condizioni interne. Il corretto funzionamento degli orologi circadiani endogeni consente all'organismo di anticipare eventuali modificazioni ambientali e modificare temporaneamente le proprie funzioni fisiologiche e comportamentali in maniera adeguata. L'*anticipazione* rappresenta un'informazione critica e garantisce un vantaggio di selezione, il che spiega perchè oltre il 10% dell'intero genoma cardiaco murino sia circadiano-dipendente [3]. Analogamente, la rottura dei ritmi può portare a molteplici conseguenze [4] (full text), dato che i geni degli orologi circadiani sembrano essere indispensabili per la salute cardiovascolare. Recentemente, si è infatti osservato come topi resi knockout per *bmal1* o topi mutanti per *clock* mostravano una alterazione delle normali risposte protettive dell'endotelio agli insulti vascolari, caratterizzati da una intensificazione del processo di remodelling patologico ed una predisposizione alla trombosi vascolare [5] (full text).

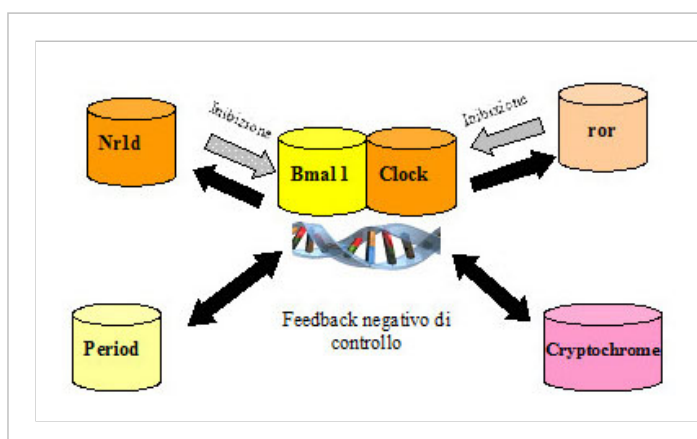


Figura 1. Meccanismi trascrizionali dell'orologio circadiano. Il complesso Bmal1/Clock regola l'espressione delle proteine Period, Cryptochrome, retinoic acid orphan receptor (ror) e Nr1d1, che a loro volta modulano con feedback l'espressione di Bmal1/Clock.

Desincronizzazione dei ritmi biologici e patologie

È oggi un argomento di stretta attualità e di notevoli studi il fatto che una desincronizzazione a diversi tipi cellulari (es, cardiomiociti, cellule endoteliali) possano contribuire alla patogenesi delle patologie cardiovascolari [6] (full text). Studi sperimentali su modelli animali, ad esempio, hanno mostrato come l'alterazione del ritmo circadiano non solo è in grado di provocare una patologia cardiaca, ma anche di aggravare o scatenare preesistenti sottostanti condizioni cardiovascolari. Topi esposti ad un ritmo distruttivo di 20 ore (anziché 24) andavano incontro a completa alterazione del loro ciclo e comportamento sonno-veglia oltre che a una marcata progressione della patologia cardiovascolare (ad esempio, ipertrofia miocitaria e fibrosi) [7] (full text).

Per quanto riguarda l'uomo, dato che l'orologio biologico centrale è regolato dalla luce, è possibile che alterazioni del ciclo luce/buio possano avere conseguenze sugli orologi biologici, sia centrale che periferici. Ad esempio, il ripristino delle oscillazioni del gene clock all'interno del cardiomiocito richiede 5-8 giorni dopo inversione dello shift luce/buio [8] (full text). Le modificazioni degli andamenti e delle abitudini giornaliere umane che hanno fatto seguito all'introduzione della luce artificiale elettrica, e il possibile disturbo operato sui ritmi circadiani, potrebbe essere responsabile della progressione della malattia cardiovascolare [9] e altresì spiegare il significativamente maggior rischio di sviluppare una malattia cardiovascolare da parte dei lavoratori turnisti [10]. Tra l'altro, sembra che anche una limitata deprivazione da sonno e disturbo del ritmo circadiano facente seguito il passaggio allora legale, possa avere ripercussioni a breve termine sul rischio cardiovascolare. Uno studio svedese ha infatti osservato come l'incidenza di infarto miocardico fosse significativamente aumentata nei primi tre giorni feriali dopo il passaggio all'ora legale in primavera [11] (full text).

Variabilità temporale delle patologie cardiovascolari

Ma l'insorgenza di una patologia acuta cardiovascolare è casuale (nell'arco del giorno, o del mese o della stagione dell'anno) o invece presente dei periodi temporali ben definiti?

Va detto che l'apparato cardiovascolare è organizzato secondo un ordine temporale, con le principali funzioni settate su una variabilità di tipo circadiano. Queste variazioni, predicibili nel tempo, nello status fisiologico dell'apparato cardiovascolare da una parte possono dare origine a una particolare suscettibilità dell'essere umano ad andare incontro ad eventi morbosi o mortali. Dall'altra, i meccanismi patologici cardiovascolari stessi presentano modificazioni temporali in grado di scatenare un quadro patologico acuto [12].

Una serie importante di evidenze negli ultimi due decenni ha mostrato come l'insorgenza degli eventi cardiovascolari acuti non è distribuita a caso bensì presenta e rispetta precise connotazioni temporali, nell'arco del giorno, della settimana, del mese e dell'anno.

Si deve al gruppo di Harvard la prima dimostrazione di una spiccata preferenza mattutina per l'insorgenza dell'infarto miocardico acuto (IMA) [13]. È stato stimato che l'incidenza di IMA nelle ore mattutine sia del 40% superiore rispetto alle altre fasce orarie, e che circa il 28% degli infarti e il 22% delle morti cardiache improvvise nelle ore del mattino (che rappresentano, rispettivamente, circa il 9% e 7% di tutti gli infarti e le morti improvvise) siano attribuibili a questo cosiddetto *morning excess* [14]. Il rischio relativo di IMA nelle ore del mattino è 1.4, ma è addirittura triplo nelle prime tre ore che fanno seguito al risveglio (periodo in cui si verifica il 25% di tutti gli infarti) [15]. Va anche detto che gli IMA ad insorgenza mattutina sono anche più frequentemente fatali [16]. Un discorso a parte meritano i

soggetti diabetici, dove questo andamento ritmico è ridotto o addirittura assente [17] ([full text](#)).

Anche per lo stroke è stato dimostrato un andamento del tutto simile caratterizzato dal picco mattutino, indipendente da fattori quali sesso, età, presenza di fattori di rischio, tipo di stroke e sede anatomica dello stesso [18]. Non solo lo stroke ischemico, ma anche quello emorragico si comporta alla stessa maniera [19], probabilmente per via di una serie di eventi potenzialmente trigger assolutamente comuni [20]. Sempre nelle ore del mattino vanno a posizionarsi altre importanti emergenze cardiovascolari, quali la rottura/dissezione di aneurismi dell'aorta [21] ([full text](#)) [22], la tromboembolia polmonare [23], e persino la cardiomiopatia TakoTsubo [24]. A latere, non essendo oggetto del presente approfondimento sul versante circadiano, anche una ben nota variabilità stagionale, con picco per lo più invernale, possiede una ricchissima serie di evidenze, anche da parte del nostro gruppo, per la serie di patologie precedenti [25], [26], [27], [28], [29], [30], [31].

Funzione renale e ritmi circadiani

Già nella seconda metà del XIX secolo, Edward Smith pubblicava la prima evidenza sperimentale sull'esistenza di oscillazioni circadiane nella escrezione renale dell'urea e dell'acqua [32]. Studi successivi mostravano come sodio, potassio, cloro ed altri principali elettroliti presentassero patterns escretori di tipo circadiano [33]. Dato che la maggior parte dei ritmi escretori veniva mantenuta anche nei pazienti renotrapiantati [34], la conclusione era che sia fattori umorali che fattori renali ancora non identificati contribuivano entrambi a generare i ritmi stessi. L'analisi dei fattori circolanti rivelava poi come i livelli ematici di vasopressina, aldosterone e numerosi altri ormoni responsabili del mantenimento del bilancio idrico ed elettrolitico mostrassero essi stessi variazioni di tipo circadiano [35]-[36] ([full text](#)). Nel soggetto sano, anche il filtrato glomerulare (GFR) presenta un ritmo circadiano [37], che non dipende però direttamente da modificazioni della pressione arteriosa o dalla gittata cardiaca. In caso di patologia nefrosica il ritmo del GFR è invertito, e ciò è prevalentemente dovuto a meccanismi ormonali piuttosto che a effetti emodinamici [38] ([full text](#)). Fino a pochi anni fa, si riteneva che questi meccanismi ormonali venissero regolati principalmente dalle modificazioni circadiane del volume e o della composizione dei fluidi extracellulari prodotti dai ritmi attività/riposo o da quelli dei pasti. La prova dell'esistenza di un meccanismo renale intrinseco restava irrisolta per via della difficoltà di poterlo dissociare dagli effetti dei fattori circadiani circolanti. La scoperta del sistema temporale circadiano, sommariamente descritto in precedenza, ha consentito un grande passo in avanti nella conoscenza sulla origine dei ritmi escretori renali, ed attualmente è noto che almeno una parte dei ritmi ormonali viene sostenuta da un meccanismo autogenerato e automantenente guidato dall'orologio biologico circadiano già al momento della sintesi e/o del release di tali ormoni [39]. Dato che l'equilibrio omeostatico è continuamente messo alla prova da modificazioni ambientali, si ritiene che il ruolo dell'orologio circadiano consista nell'aggiustamento anticipativi delle vie omeostatiche in rapporto con i cicli ambientali di 24 ore. Il rene rappresenta l'organo principale per la regolazione della composizione e del volume dei liquidi extracellulari, e sia il flusso plasmatici renale, il GFR e il riassorbimento/secrezione tubulare sono caratterizzati da forti oscillazioni circadiane. Infine, si è visto che il rene stesso possiede un orologio biologico intrinseco potenzialmente coinvolto nel controllo trascrizionale/traslazionale di migliaia di geni del transcriptoma renale [40]. L'orologio circadiano renale è coinvolto nel generare questi ritmi sia attraverso meccanismi circadiani esterni (fattori umorali, temperatura corporea) che intrinseci all'orologio circadiano renale stesso [41]. Alcuni geni circadiani, ad esempio Per1 e Clock, giocano proprio un

ruolo importante nei meccanismi di regolazione interno/esterno, esempio luce e pasti, al fine di resettare i ritmi circadiani a livello renale [41].

Orologio molecolare e controllo omeostatico del bilancio idro-elettrolitico

Acqua

È noto da tempo che la produzione di urina segue un ben definito ritmo circadiano caratterizzato dalla massima escrezione nel corso della fase di attività, e che questo ritmo persiste per alcuni giorni sia che il ritmo dei pasti sia completamente sovvertito o che venga mantenuto costante nelle 24 ore [42] (full text). In corso di restrizione idrica, il volume dell'acqua escreta si riduce rapidamente e il ritmo scompare, segno che il meccanismo di conservazione dell'acqua è dominante su quello anticipatorio circadiano. Il coinvolgimento dell'orologio molecolare nella gestione renale dell'acqua è stato recentemente studiato in topi knockout per il gene *Clock* [43] (full text). Si è visto che alcuni geni giocano un ruolo chiave nel riassorbimento da parte del nefrone distale e anche il dotto collettore mostra andamenti circadiani di espressione di mRNA. Il topo knockout per *Clock* (triplo knockout per i fattori trascrizionali *dbp/hlf/tef*) mostra alterazioni significative nella espressione renale di alcuni regolatori cardine del bilancio di acqua e sodio (recettore V2 per la vasopressina, aquaporin-2, aquaporin-4, α ENaC). Dal punto di vista funzionale, la perdita dell'orologio porta ad un fenotipo complesso, caratterizzato da un parziale diabete insipido, disregolazione dei ritmi dell'escrezione di sodio, e importante riduzione della pressione arteriosa [43] (full text).

Sodio

L'escrezione urinaria del sodio e dei principali elettroliti procede in parallelo con le oscillazioni del flusso plasmatici renale e del GFR. Tuttavia l'ampiezza di oscillazione del ritmo del sodio è nettamente maggiore, a significare il ruolo predominante della componente tubulare. L'aldosterone è il principale regolatore del trasporto di sodio e contribuisce al controllo della pressione arteriosa e della funzione cardiaca. Questo ormone specificamente funziona in modo da aumentare il riassorbimento renale di sodio attraverso la regolazione della subunità α del canale epiteliale del sodio (α ENaC) [43] (full text). Il gene circadiano *Period 1* gioca un ruolo importante proprio in questa complessa regolazione [44]. Anche l'enzima del tubulo renale NHE3, addetto al ruolo di scambiatore Na^+/H^+ , gioca un ruolo determinante nel mantenimento della regolazione elettrolitica e dell'equilibrio acido-base. L'espressione di questo gene nel rene segue un ritmo circadiano direttamente regolato da geni clock attivi su elementi di E-box presenti nella sua regione promotrice [45]. Recentemente è stato osservato come, nel rene di topo, NHE3 mRNA risultava fortemente espresso nella striscia interna della midollare esterna e più debolmente nella corteccia. Evidenti oscillazioni circadiane sono state dimostrate nelle parti ascendenti spesse e in quelle sottili discendenti dell'ansa di Henle, ma non a livello dei dotti collettori. Le variazioni circadiane di questa molecola a livello della midollare renale fanno probabilmente parte del complesso meccanismo alla base delle variazioni circadiane della secrezione urinaria di elettroliti [46] (full text). Sempre nel topo (sperimentalmente mantenuto ad alimentazione ad libitum oppure a digiuno), anche la espressione di E-caderina e claudin-4 mostra un ritmo circadiano, e le variazioni dinamiche dei livelli di queste proteine coincidono con quelle della escrezione di sodio [47] (figura 2).

Potassio

L'escrezione di potassio è caratterizzata da oscillazioni circadiane altamente stabili, in grado di persistere anche oltre le 24 h di digiuno. L'andamento circadiano della escrezione di po-

tassio è prevalentemente determinata da modificazioni circadiane della secrezione di K⁺ a livello del dotto collettore corticale e in quantità minore da variazioni del flusso urinario [48]. Studi sperimentali su ratti surrenectomizzati, che ricevevano o meno terapia sostitutiva con aldosterone o desametasone, hanno mostrato come le variazioni circadiane della escrezione di potassio rimanessero immutate [49].

Calcio/Magnesio/Fosforo

Sono note variazioni circadiane del calcio sia plasmatico che urinario, così come dei suoi regolatori omeostatici, quali calcitonina, paratormone e vitamina D [50] (full text) [51] (full text), nonché per i markers di turnover osseo (idrossiprolina, telopeptide C-terminale del collagene tipo I, osteocalcina) [52], [53], [54]. Variazioni circadiane sono state descritte anche per magnesio e per i fosfati [55] [56] (full text), ma non sono ancora noti gli eventuali meccanismi di controllo dei ritmi endogeni da parte dell'orologio molecolare.

Ritmi circadiani, rene e patologie

Esiste una connessione tra i ritmi circadiani (e le loro alterazioni) a livello renale e patologie? L'argomento è certamente nuovo ed è diventato via via più intrigante dopo le varie acquisizioni in tema di cuore ed apparato cardiovascolare [6] (full text). Certamente, da una parte quadri patologici già ben noti acquisiscono una nuova possibile interpretazione aggiuntiva nella loro fisiopatologia. Ad esempio, analogamente con quanto descritto per i pazienti con diabete mellito [17] (full text), anche quelli portatori di malattia renale cronica (CKD) sembrano non presentare la variabilità circadiana nell'insorgenza dell'infarto miocardico [57]. Dall'altro, la scoperta dell'orologio molecolare anche a livello renale, e le sue possibili alterazioni, stanno fornendo dati, per lo più su modelli sperimentali animali, ma comunque abbastanza inquietanti.

Al primo gruppo appartengono senz'altro l'ipertensione arteriosa ed i disturbi cardiovascolari correlati. Da una parte, l'argomento della ipertensione notturna e della condizione nondipper è troppo nota ai Nefrologi per essere trattata in questa sede se non per un minimo spot a solo titolo esemplificativo. E' noto che pazienti con disfunzione renale richiedono un tempo maggiore per ottenere un calo della pressione arteriosa (PA) nelle ore notturne [58] (full text), e valori pressori notturni elevati sono indipendentemente associati alla microalbuminuria [59] (full text). Si è visto che gli antagonisti recettoriali dell'angiotensina (ARB) sono in grado di ripristinare il ritmo circadiano fisiologico della PA, passando da una condizione nondipper all'andamento dipper, analogamente a quanto ottenibile con la restrizione idrica combinata all'uso di diuretici [60]. Gli ARB sono in grado di aumentare la natriuresi durante il giorno, riducendo la PA notturna e producendo un andamento dipper. Il meccanismo primario con cui gli ARB possono ottenere tale ripristino

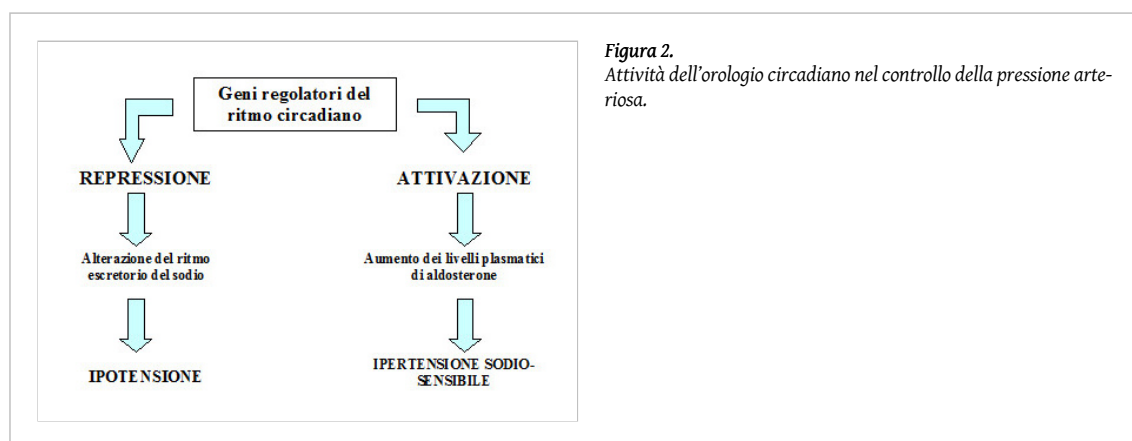


Figura 2.
Attività dell'orologio circadiano nel controllo della pressione arteriosa.

è dato dalla soppressione del riassorbimento tubulare del sodio, con una somiglianza con l'azione dei diuretici [61] (full text). Un altro link interessante è quello con la sindrome metabolica. Un alterato tasso di escrezione di sodio ed acqua nel corso delle ore diurne si assocerebbe ad un aumentato rischio cardiovascolare, dato che alterazioni dei ritmi circadiani potrebbero giocare un ruolo importante sia nell'ipertensione sodio-sensibile che nella riduzione della funzione delle β -cellule. In pazienti con sindrome metabolica, un'alterazione del pattern circadiano dell'escrezione urinaria si associa ad una riduzione del dip notturno dalla PA sistolica e ad una ridotta secrezione insulinica glucosio-indotta [62] (full text).

Più complessa, e ancora poco conosciuta nelle sue possibili ricadute sull'uomo, è rappresentata dalla desincronizzazione dei ritmi (la cosiddetta *out-of-synch*). Situazioni di disorganizzazione circadiana, quali ad esempio la deprivazione da sonno, il lavoro a turni (*shiftwork*), il jet lag, tutte in grado di alterare i normali ritmi biologici, possono avere impatti anche gravi sulla salute. Ad esempio, studi su modelli animali hanno mostrato devastanti effetti sulla funzione cardiovascolare e renale secondaria alla disorganizzazione dei ritmi ottenuta con una mutazione *short-period* (τ) del sistema circadiano nei criceti [63]. Animali portatori di mutazione puntiforme nel gene regolatorio circadiano, casein kinase-1epsilon, che produce un'anticipazione circadiana con patterns comportamentali frammentati negli eterozigoti $+/\tau$ heterozygotes, vanno incontro a morte in età più precoce a causa di cardiopatia, fibrosi estensiva, gravissima alterazione della funzione contrattile. Inoltre, questi animali presentano grave malattia renale con proteinuria, dilatazione tubulare e apoptosi cellulare. A seguito di cicli di esposizione alla luce appropriati per il loro genotipo (22 h), si assiste a normalizzazione dei pattern comportamentali, inversione del fenotipo cardiorenale con ripristino del normale, e ripresa di normofunzione cardiaca e renale.

Forse questo è ancora davvero un *nuovo mondo*... ma per quanto ancora?

Bibliografia

[1] Edery I Circadian rhythms in a nutshell. *Physiological genomics* 2000 Aug 9;3(2):59-74

[2] Takeda N, Maemura K, Horie S et al. Thrombomodulin is a clock-controlled gene in vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 2007 Nov 9;282(45):32561-7 (full text)

[3] Martino T, Arab S, Straume M et al. Day/night rhythms in gene expression of the normal murine heart. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 2004 Apr;82(4):256-64

[4] Barnard AR, Nolan PM When clocks go bad: neurobehavioural consequences of disrupted circadian timing. *PLoS genetics* 2008 May 30;4(5):e1000040 (full text)

[5] Anea CB, Zhang M, Stepp DW et al. Vascular disease in mice with a dysfunctional circadian clock. *Circulation* 2009 Mar 24;119(11):1510-7 (full text)

[6] Durgan DJ, Young ME The cardiomyocyte circadian clock: emerging roles in health and disease. *Circulation research* 2010 Mar 5;106(4):647-58 (full text)

[7] Martino TA, Tata N, Belsham DD et al. Disturbed diurnal rhythm alters gene expression and exacerbates cardiovascular disease with rescue by resynchronization. *Hypertension* 2007 May;49(5):1104-13 (full text)

[8] Durgan DJ, Trexler NA, Egbejimi O et al. The circadian clock within the cardiomyocyte is essential for responsiveness of the heart to fatty acids. *The Journal of biological chemistry* 2006 Aug 25;281(34):24254-69 (full text)

[9] Manfredini R, Portaluppi F Night shift and impaired endothelial function: circadian out-of-synch may play a role. *International journal of cardiology* 2012 Jan 12;154(1):94-5

[10] Knutsson A, Bøggild H Shiftwork and cardiovascular disease: review of disease mechanisms. *Reviews on environmental health* 2000 Oct-Dec;15(4):359-72

[11] Janszky I, Ljung R Shifts to and from daylight saving time and incidence of myocardial infarction. *The New England journal of medicine* 2008 Oct 30;359(18):1966-8 (full text)

[12] Portaluppi F, Manfredini R, Fersini C et al. From a static to a dynamic concept of risk: the circadian epidemiology of cardiovascular events. *Chronobiology international* 1999 Jan;16(1):33-49

[13] Muller JE, Stone PH, Turi ZG et al. Circadian variation in the frequency of onset of acute myocardial infarction. *The New England journal of medicine* 1985 Nov 21;313(21):1315-22

[14] Cohen MC, Rohtla KM, Lavery CE et al. Meta-analysis of the morning excess of acute myocardial infarction and sudden cardiac

- death. *The American journal of cardiology* 1997 Jun 1;79(11):1512-6
- [15] Willich SN, Löwel H, Lewis M et al. Association of wake time and the onset of myocardial infarction. Triggers and mechanisms of myocardial infarction (TRIMM) pilot study. TRIMM Study Group. *Circulation* 1991 Dec;84(6 Suppl):VI62-7
- [16] Manfredini R, Boari B, Bressan S et al. Influence of circadian rhythm on mortality after myocardial infarction: data from a prospective cohort of emergency calls. *The American journal of emergency medicine* 2004 Nov;22(7):555-9
- [17] Rana JS, Mukamal KJ, Morgan JP et al. Circadian variation in the onset of myocardial infarction: effect of duration of diabetes. *Diabetes* 2003 Jun;52(6):1464-8 (full text)
- [18] Casetta I, Granieri E, Fallica E et al. Patient demographic and clinical features and circadian variation in onset of ischemic stroke. *Archives of neurology* 2002 Jan;59(1):48-53
- [19] Casetta I, Granieri E, Portaluppi F et al. Circadian variability in hemorrhagic stroke. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2002 Mar 13;287(10):1266-7
- [20] Manfredini R, Boari B, Smolensky MH et al. Circadian variation in stroke onset: identical temporal pattern in ischemic and hemorrhagic events. *Chronobiology international* 2005;22(3):417-53
- [21] Mehta RH, Manfredini R, Hassan F et al. Chronobiological patterns of acute aortic dissection. *Circulation* 2002 Aug 27;106(9):1110-5 (full text)
- [22] Manfredini R, Boari B, Gallerani M et al. Chronobiology of rupture and dissection of aortic aneurysms. *Journal of vascular surgery* 2004 Aug;40(2):382-8
- [23] Gallerani M, Manfredini R, Ricci L et al. Sudden death from pulmonary thromboembolism: chronobiological aspects. *European heart journal* 1992 May;13(5):661-5
- [24] Citro R, Previtali M, Bovelli D et al. Chronobiological patterns of onset of Tako-Tsubo cardiomyopathy: a multicenter Italian study. *Journal of the American College of Cardiology* 2009 Jul 7;54(2):180-1
- [25] Manfredini R, Boari B, Smolensky MH et al. Seasonal variation in onset of myocardial infarction--a 7-year single-center study in Italy. *Chronobiology international* 2005;22(6):1121-35
- [26] Manfredini R, Manfredini F, Boari B et al. Seasonal and weekly patterns of hospital admissions for nonfatal and fatal myocardial infarction. *The American journal of emergency medicine* 2009 Nov;27(9):1097-103
- [27] Manfredini R, Boari B, Manfredini F et al. Seasonal variation in occurrence of aortic diseases: the database of hospital discharge data of the Emilia-Romagna region, Italy. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2008 Feb;135(2):442-4
- [28] Gallerani M, Boari B, Smolensky MH et al. Seasonal variation in occurrence of pulmonary embolism: analysis of the database of the Emilia-Romagna region, Italy. *Chronobiology international* 2007;24(1):143-60
- [29] Manfredini R, Gallerani M, Boari B et al. Seasonal variation in onset of pulmonary embolism is independent of patients' underlying risk comorbid conditions. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2004 Jan;10(1):39-43
- [30] Gallerani M, Boari B, de Toma D et al. Seasonal variation in the occurrence of deep vein thrombosis. *Medical science monitor* : international medical journal of experimental and clinical research 2004 May;10(5):CR191-6
- [31] Dentali F, Ageno W, Rancan E et al. Seasonal and monthly variability in the incidence of venous thromboembolism. A systematic review and a meta-analysis of the literature. *Thrombosis and haemostasis* 2011 Sep;106(3):439-47
- [32] Smith E (Ed) *Health and Disease as Influenced by the Daily, Seasonal, and Other Cyclical Changes in the Human System*. Walton and Maberly: London, 1861.
- [33] Koopman MG, Krediet RT, Arisz L et al. Circadian rhythms and the kidney. A review. *The Netherlands journal of medicine* 1985;28(10):416-23
- [34] Koene R, van Liebergen F, Wijdeveld P et al. Normal diurnal rhythm in the excretion of water and electrolytes after renal transplantation. *Clinical nephrology* 1973 Jul-Aug;1(4):266-70
- [35] Pasqualetti P, Festuccia V, Collacciani A et al. Circadian rhythm of arginine vasopressin in hepatorenal syndrome. *Nephron* 1998;78(1):33-7
- [36] Hurwitz S, Cohen RJ, Williams GH et al. Diurnal variation of aldosterone and plasma renin activity: timing relation to melatonin and cortisol and consistency after prolonged bed rest. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 2004 Apr;96(4):1406-14 (full text)
- [37] Koopman MG, Koomen GC, Krediet RT et al. Circadian rhythm of glomerular filtration rate in normal individuals. *Clinical science (London, England : 1979)* 1989 Jul;77(1):105-11
- [38] Voogel AJ, Koopman MG, Hart AA et al. Circadian rhythms in systemic hemodynamics and renal function in healthy subjects and patients with nephrotic syndrome. *Kidney international* 2001 May;59(5):1873-80 (full text)
- [39] Firsov D, Bonny O Circadian regulation of renal function. *Kidney international* 2010 Oct;78(7):640-5
- [40] Firsov D, Tokonami N, Bonny O et al. Role of the renal circadian timing system in maintaining water and electrolytes homeostasis. *Molecular and cellular endocrinology* 2012 Feb 5;349(1):51-5
- [41] Wu T, Ni Y, Dong Y et al. Regulation of circadian gene expression in the kidney by light and food cues in rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 2010 Mar;298(3):R635-41
- [42] MILLS JN, STANBURY SW Persistent 24-hour renal excretory rhythm on a 12-hour cycle of activity. *The Journal of physiology* 1952 May;117(1):22-37 (full text)
- [43] Zuber AM, Centeno G, Pradervand S et al. Molecular clock is involved in predictive circadian adjustment of renal function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009 Sep 22;106(38):16523-8 (full text)
- [44] Gumz ML, Stow LR, Lynch IJ et al. The circadian clock protein Period 1 regulates expression of the renal epithelial sodium channel in mice. *The Journal of clinical investigation* 2009 Aug;119(8):2423-34
- [45] Saifur Rohman M, Emoto N, Nonaka H et al. Circadian clock genes directly regulate expression of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 in the kidney. *Kidney international* 2005 Apr;67(4):1410-9
- [46] Nishinaga H, Komatsu R, Doi M et al. Circadian expression of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 in the mouse renal medulla. *Biomedical research (Tokyo, Japan)* 2009 Apr;30(2):87-93 (full text)

- [47] Yamato M, Ito T, Iwatani H et al. E-cadherin and claudin-4 expression has circadian rhythm in adult rat kidney. *Journal of nephrology* 2010 Jan-Feb;23(1):102-10
- [48] Steele A, deVeber H, Quaggin SE et al. What is responsible for the diurnal variation in potassium excretion? *The American journal of physiology* 1994 Aug;267(2 Pt 2):R554-60
- [49] Rabinowitz L, Wydner CJ, Smith KM et al. Diurnal potassium excretory cycles in the rat. *The American journal of physiology* 1986 May;250(5 Pt 2):F930-41
- [50] el-Hajj Fuleihan G, Klerman EB, Brown EN et al. The parathyroid hormone circadian rhythm is truly endogenous--a general clinical research center study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1997 Jan;82(1):281-6 (full text)
- [51] Rejnmark L, Lauridsen AL, Vestergaard P et al. Diurnal rhythm of plasma 1,25-dihydroxyvitamin D and vitamin D-binding protein in postmenopausal women: relationship to plasma parathyroid hormone and calcium and phosphate metabolism. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 2002 May;146(5):635-42 (full text)
- [52] Mautalen CA Circadian rhythm of urinary total and free hydroxyproline excretion and its relation to creatinine excretion. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1970 Jan;75(1):11-8
- [53] Qvist P, Christgau S, Pedersen BJ et al. Circadian variation in the serum concentration of C-terminal telopeptide of type I collagen (serum CTx): effects of gender, age, menopausal status, posture, daylight, serum cortisol, and fasting. *Bone* 2002 Jul;31(1):57-61
- [54] Gundberg CM, Markowitz ME, Mizruchi M et al. Osteocalcin in human serum: a circadian rhythm. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1985 Apr;60(4):736-9
- [55] Roelfsema F, van der Heide D, Smeenk D et al. Circadian rhythms of urinary electrolyte excretion in freely moving rats. *Life sciences* 1980 Dec 15;27(24):2303-9
- [56] Kemp GJ, Blumsohn A, Morris BW et al. Circadian changes in plasma phosphate concentration, urinary phosphate excretion, and cellular phosphate shifts. *Clinical chemistry* 1992 Mar;38(3):400-2 (full text)
- [57] Itaya H, Takagi T, Sugi K et al. Absence of circadian variation of acute coronary syndrome onset in chronic kidney disease patients. *Cardiovascular revascularization medicine : including molecular interventions* 2011 Nov-Dec;12(6):362-6
- [58] Fukuda M, Mizuno M, Yamanaka T et al. Patients with renal dysfunction require a longer duration until blood pressure dips during the night. *Hypertension* 2008 Dec;52(6):1155-60 (full text)
- [59] Oliveras A, Armario P, Martell-Clarós N et al. Urinary albumin excretion is associated with nocturnal systolic blood pressure in resistant hypertensives. *Hypertension* 2011 Mar;57(3):556-60 (full text)
- [60] Fukuda M, Yamanaka T, Mizuno M et al. Angiotensin II type 1 receptor blocker, olmesartan, restores nocturnal blood pressure decline by enhancing daytime natriuresis. *Journal of hypertension* 2008 Mar;26(3):583-8
- [61] Fukuda M, Wakamatsu-Yamanaka T, Mizuno M et al. Angiotensin receptor blockers shift the circadian rhythm of blood pressure by suppressing tubular sodium reabsorption. *American journal of physiology. Renal physiology* 2011 Nov;301(5):F953-7 (full text)
- [62] Guerrot D, Hansel B, Perucca J et al. Reduced insulin secretion and nocturnal dipping of blood pressure are associated with a disturbed circadian pattern of urine excretion in metabolic syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2011 Jun;96(6):E929-33 (full text)
- [63] Martino TA, Oudit GY, Herzenberg AM et al. Circadian rhythm disorganization produces profound cardiovascular and renal disease in hamsters. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 2008 May;294(5):R1675-83