

Подвійне сліпе, рандомізоване, плацебо-контрольоване перехресне клінічне дослідження ефектів гідролізату альфа-s1 казеїну на порушення сну

Автори: Хьон Джин Кім, Джієон Кім, Сеунгйон Лі, Босіл Кім, Ендзин Квон, Джі Їн Лі, Мін Юн Чун, Чан Юн Лі, Одрі Бул'є, Секван Ох та Хьянґ Вун Лі

1 Sleep Center, EwhaWomans University Mokdong Hospital, Seoul 07985, Korea

2 Departments of Neurology, EwhaWomans University School of Medicine and Ewha Medical Research Institute, Seoul 07804, Korea

3 Departments of Medical Science, Ewha Womans University School of Medicine and Ewha Medical Research Institute, Seoul 07804, Korea

4 INGREDIA Co., Ltd., CEDEX, 62000 Arras, France

5 Departments of Molecular Medicine, EwhaWomans University School of Medicine and Ewha Medical Research Institute, Seoul 07804, Korea

* Correspondence: leeh@ewha.ac.kr; Tel.: +82-22-650-2673; Fax: +82-22-650-5958

y Director, Epilepsy and Sleep Center, EwhaWomans University Mokdong Hospital, 1071, Anyangcheon-ro, Yangcheon-gu, Seoul, 07985, Korea.

z Professor, Department of Neurology, EwhaWomans University School of Medicine and Ewha Medical Research Institute, 25, Magokdong-ro 2-gil, Gangseo-gu, Seoul 07804, Korea.

Анотація: Це дослідження оцінювало ефекти гідролізату альфа-s1 казеїну (АСН; Lactium®) на суб'єктивні та об'єктивні профілі сну у вибірці з громади корейців з низькою якістю сну. Ми провели подвійне сліпе рандомізоване перехресне дослідження з 48 учасниками (середній вік $49,0 \pm 1,7$ років, 65% жінок), у яких спостерігався легкий або помірний ступінь порушення сну. Протягом перших чотирьох тижнів вводилися АСН або плацебо, а в точно такому ж порядку проводився відповідний препарат після чотиритижневого періоду виведення. Шкали порушення сну, денного функціонування, та психіатричні аспекти показали подібну тенденцію до покращення як під час фази АСН, так і під час фази плацебо без значних групових відмінностей. Загальний сприйнятий профіль сну в щоденниках сну значно покращився під час фази АСН, що виявилось в збільшенні загального часу сну та ефективності сну (SE), а також у зменшенні затримки сну та прокидання після початку сну (WASO). Цікаво, що актиграфія продемонструвала значне збільшення SE після безперервного використання АСН протягом чотирьох тижнів, що було значно кращим у порівнянні з двотижневим використанням. Показники полісомнографії продемонстрували подібну тенденцію без статистично значущих групових відмінностей. Наші результати свідчать про те, що очищений АСН добре переноситься і може покращити якість сну, з накопиченням сприятливий ефект при тривалому прийомі.

Ключові слова: гідролізат альфа-s1 казеїну; Lactium®; харчові добавки; клінічне дослідження; порушення сну; безсоння; якість сну

1. Вступ

Порушення сну, яке є поширеною скаргою серед населення, може суттєво вплинути на фізичне та психічне здоров'я людей і збільшити соціальне навантаження через небажані помилки чи нещасні випадки. Згідно з повідомлень, поширеність симптомів безсоння складає до 48% на заході країни, що становлять більше однієї п'ятої населення (22,8%) Кореї; ця невідповідність може бути зумовлена відмінностями в дослідницьких критеріях і культурному середовищі [1–3].

В даний час когнітивно-поведінкова терапія є першою лінією лікування розладів безсоння; однак, снодійні засоби широко використовуються і часто їм надають перевагу [4]. Медикаментозне лікування може бути швидким і простим підходом до полегшення проблем, пов'язаних зі сном, хоча воно часто викликає залежність від прийому ліків або рецидив безсоння після припинення лікування [5,6]. Крім того, пацієнти можуть відчувати побічні ефекти звичайних індукторів сну, які варіюються від ранкової сонливості до марення або випадкових травм [7,8]. Тому був значний інтерес до розвитку альтернативних методів

лікування, такі як втручання в режим харчування або спеціальні поживні добавки, які можуть покращити загальну якість життя пацієнтів з безсонням шляхом зниження ризику надмірного або неправильного використання та уникнення побічних ефектів снодійних [9–11]. Триптофан і вітаміни групи В традиційні добре відомі дієтичні компоненти, які є попередниками серотоніну, проміжного продукту для вироблення мелатоніну [12,13]. Доведено, що триптофан має прямий благотворний вплив на гомеостатичну регуляцію сну не тільки у суб'єктів з безсонням, але й у тих, хто не спить було виявлено, що порушення посилюють сонливість і скорочують затримку сну [14]. Більш того, на відміну від фотоперіодично регульованого виробництва мелатоніну в гіпофізі, вивільнення з шлунково-кишкового тракту Мелатонін ентерохромними клітинами, очевидно, регулюється споживанням їжі, особливо після навантаження триптофаною [15].

Клінічні та епідеміологічні дослідження неодноразово демонстрували коморбідність і двонаправленість природи порушень сну та психіатричні аспекти [16–18]. Є поширені, загальновідомі нейробіологічні механізми (тобто нейротрансмітери та структури мозку), пов'язані як з психічними розладами і безсонням. Один з найбільш широко визнаних медіаторів у патофізіології тривожних розладів є система гамма-аміномасляної кислоти (ГАМК), яка також є мішенню традиційних снодійних препаратів, через переважну взаємодію з α_2/α_3 and α_1 ГАМК_A-рецепторами [19,20]. Це припускає, що лікування, яке може полегшити тривогу, може надати підтримку особам, які борються з скарги на сон. Останнім часом багато натуральних речовин рослинного походження, таких як екстракт валеріани (*Valeriana spp.*), екстракту меліси (*Melissa officinalis*), екстракту пасифлори (*Passiflora incarnata*), хмелю екстракт (*Humulus lupulus*) покращує порушення сну з можливими механізмами пов'язані з системою ГАМК [21–24].

Повідомлялося, що **гідролізат казеїну альфа-s1 (АСН)**, один із основних компонентів молочного білка, виявляє антистресову дію на додаток до контролю артеріального тиску, імунного контролю та антитромбозної дії [25–28]. Зокрема, було показано, що біологічно активний декапептид (S1-казеїн (f91–100) або -казозепін), який спочатку вважався здатним виявляти зв'язок з рецепторами ГАМК_A, має два гнучких тирозинових ароматичних кільця зі структурою, подібною до класичних ароматичних бензодіазепінових кілець, таким чином демонструючи анксиолітичний ефект [29–31]. Нещодавно одна дослідницька група показала, що дозозалежна дія АСН на внутрішньоклітинний приплив іонів хлориду пригнічувався спільним введенням бікукуліну *in vitro*, що означає, що АСН впливає на рецептори ГАМК_A. Крім того, пероральний прийом 150 мг/кг АСН мишами продемонстрував значну різницю в тестах на стимуляцію сну, викликаних пентобарбіталом, і активності повільної електроенцефалографії (EEG), що свідчить про його вплив на центральну нервову систему [32]. Нещодавно наша група продемонструвала, що експресія білка субодиниці рецептора ГАМК_A в гіпоталамусі щурів підвищувалася при введенні 300 мг/кг АСН, що призводило до значного посилення загального сну та тета-хвилі EEG під час сну [33].

Однак клінічно значущих наукових доказів покращення сну на людях мало. У попередніх клінічних випробуваннях молоко, збагачене гідролізатом казеїну, позитивно впливало на якість сну та денної дисфункції, а чотиритижневий курс добавки зменшив затримку сну (SL) [34–36]. Це дослідження було проведено для вивчення впливу чотиритижневого очищеного АСН на різні профілі сну у вибірці дорослих корейців із легкими та помірними симптомами безсоння. Крім того, ми оцінювали безпеку АКГ за допомогою суб'єктивних та об'єктивних методів.

Матеріали та методи

2.1. Учасники

Учасники, які відчували незручний сон, були набрані за допомогою онлайн і оффлайн оголошення за допомогою кадрового агентства. Шістдесят учасників віку від 20 до 65 років,

які мали явно низьку суб'єктивну якість сну, як виміряно Піттсбурзьким дослідженням Індекс якості сну (PSQI > 5), були скринінговані [37].

Критерії виключення включали: (1) Важке безсоння на основі індексу тяжкості безсоння (ISI \geq 22) [38]; (2) анамнез захворювання, що впливає на якість сну, наприклад нарколепсія, обструктивне апное сну (OSA), синдром неспокійних ніг (RLS), синдром періодичних рухів кінцівок (PLMS) або психіатричний розлади, включаючи депресію; (3) події, які можуть спричинити сильний стрес протягом 2 тижнів після першого візиту (наприклад, смерть чоловіка/дружини, сімейні проблеми, правові проблеми, фінансова криза або імміграція); (4) історія вживання ліків, які можуть вплинути на режим сну, в тому числі продуктів для здоров'я або східних трав, протягом 1 місяця після першого візиту; (5) поточне застосування гормональної терапії; (6) запої (>140 г/тиждень, 2,5 пляшки/тиждень алкоголю, 2,5 шоти/день); (7) інтенсивне куріння (>10 сигарет/день); (8) високий вміст кофеїну прийом (>10 склянок/добу); (9) графік роботи, який спричиняє нерегулярний сон (наприклад, нічна зміна); (10) історія подорожей в інший часовий пояс протягом 1 місяця після першого візиту; (11) надзвичайно низький або високий індекс маси тіла (ІМТ \leq 18 кг/м² або \geq 35 кг/м²); (12) алергічна реакція на молоко, молочковмісна в анамнезі їжа або будь-який із компонентів тестованого продукту та плацебо; (13) історія клінічних випробувань участь протягом 1 місяця після першого візиту; (14) вагітна або годує грудьми; і (15) осіб, які були визнані несумісними з протоколом тестування. Один учасник був виключений через використання снодійного, а 11 учасників відкликали свою згоду перед рандомізацією. Таким чином, 48 учасників були включені до етапу рандомізації (мал. 1). Це дослідження було схвалено Інституційною наглядовою радою (IRB) Ewha Womans Університетська лікарня Мокдонг і була зареєстрована в Інформаційній службі клінічних досліджень (CRIS; номер дослідження KCT000).

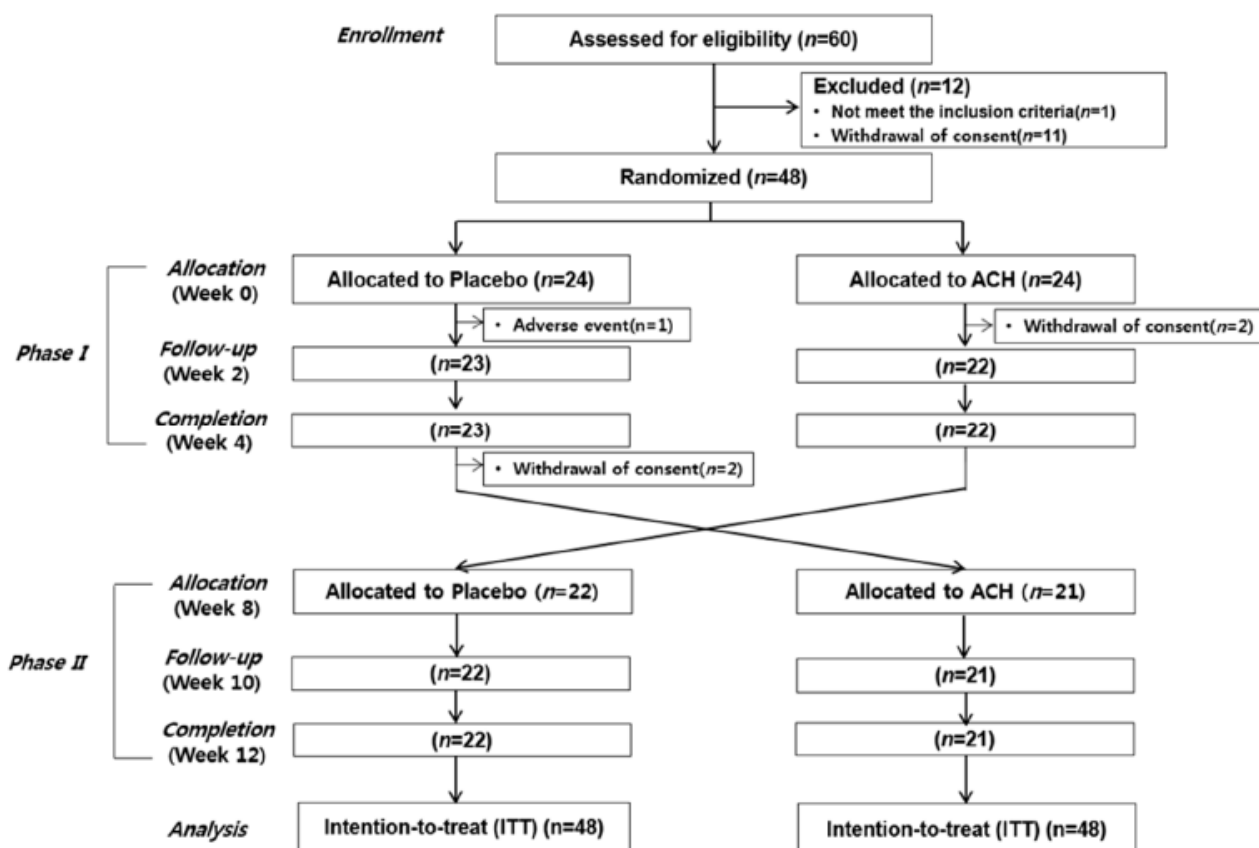


Figure 1. Study protocol. ACH, alpha-s1 casein hydrolysate.

2.2. Вивчати дизайн

Ми провели подвійне сліпе, рандомізоване, плацебо-контрольоване перехресне дослідження. Тривалість цього дослідження для 48 учасників становила 12 тижнів. Протягом перших 4 тижнів фази I вводили або тест, або капсулу плацебо; після 4-тижневого періоду

вмивання аналогічна капсула вводилася протягом 4 тижнів фази II точно так само. Двадцять чотири учасники були випадковим чином розподілені до кожної тестової та контрольної груп для фази I. Поки ми перевірили історію алергії, один учасник контрольної групи був відсторонений через несприятливий результат подія. Два учасники тестової групи відкликали свою згоду після першої рандомізації. Два учасники завершили фазу I в контрольній групі, але відкликали свою згоду під час періоду вмивання. Нарешті, 43 учасники пройшли фазу I та II дослідження. Для оцінки безпеки було проведено вимірювання життєво важливих ознак і звичайні аналізи крові. Крім того, людям було дозволено зберігати свої звички протягом усього періоду дослідження, але молочні продукти та продукти з високим вмістом триптофану були обмежені. З цією метою ми надали список продуктів які потрібно уникати (додаткова таблиця S1), і ми перевірили відповідність шляхом опитування щоденників дієти.

2.3. Перевірені продукти

Bovine ACH (Lactium®, Ingredia, Arras, Франція) був тестовим продуктом, який використовувався на етапі тестування, в той час як продукт плацебо, який використовувався в контрольній фазі, був стійким до мальтодекстрину (Novarex Co., Ltd., Чонджу, Корея). На основі аналізу безпеки під час досліджень на тваринах було розраховано безпечну кількість споживання 300 мг/день Lactium® для цього дослідження. Тестова капсула складалася з 75% АСН (300 мг), 24% мальтодекстрину і 1% діоксиду кремнію. АСН складався з 2,2% (6,6 мг) S1-казеїну (f91-100), який було виявлено за допомогою високоефективної рідинної хроматографії та фотометричної діодної матриці. Капсула плацебо складалася з 99% мальтодекстрину та 1% діоксиду кремнію. Капсули були не відрізняються один від одного ні за масою (400 мг), ні за морфологією. Учасників попросили приймати або тест, або капсулу плацебо щодня за годину до сну.

2.4. Оцінка кількості та якості сну

2.4.1. Шкали опитувальників сну та настрою

Ми постійно стежили за суб'єктивною якістю сну та психіатричними характеристиками учасників через опитування, що складається з різних наборів анкет з інтервалом у 2 тижні. Ми використовували PSQI (Пітсбурзький індекс якості сну) та ISI (Індекс тяжкості безсоння) на етапі моніторингу та етапі скринінгу для проведення оцінки сну, включаючи симптоми безсоння. Суб'єктивну надмірну денну сонливість (EDS) вимірювали за допомогою сонливості Ерворт Sleepiness Шкала (ESS), широко використовувана анкета з 8 пунктів щодо ймовірності засинання учасників у різних ситуаціях [39]. Ми також оцінювали симптоми втоми учасників за допомогою втоми Шкала тяжкості (FSS) [40]. Симптоми депресії та тривоги вимірювалися за допомогою депресії Бека Інвентаризація (BDI) та Інвентаризація тривоги Бека (BAI) відповідно; вищі бали відображали вищі рівні симптомів [41,42].

2.4.2. Щоденник сну

Учасників попросили записувати у щоденник сну протягом 8 тижнів щодо часу, коли вони лягали спати та прокидалися, щоб визначити час у ліжку (TIB), час, необхідний для засипання (SL), суб'єктивний загальний час сну (TST), кількість і час кожного пробудження після початку сну (WASO), причини таких зривів та їх відчуття вранці. Щоденні дані щоденника сну були усереднені за один тиждень, і ефективність сну (SE) розраховували як відсоток TST порівняно із загальним TIB.

2.4.3. Актиграфія

Учасники використовували актиграфію на недомінуючій руці протягом 8 тижнів запису як для фази I, так і для фази II (Actiwatch-2 або Actiwatch Spectrum PRO, Philips Respironics, Murrysville, PA, США). Вимірюваними змінними були TIB, SL, TST, SE та WASO. Було встановлено стандарт для звичайного SE на 85%.

2.4.4. Полісомнографія (PSG)

Table 1. Demographic characteristics of participants.

Variables	N = 48
Age (year)	49.0 ± 11.9
Gender (male/female)	17/31
Menopause	24/31 (77.4%)
Postmenopausal period (month)	72.0 ± 57.2
Sleep disturbance duration (month)	57.6 ± 91.3
Pittsburgh Sleep Quality Index	11.4 ± 1.9
Insomnia Severity Index	13.2 ± 3.8
Family history of insomnia	6 (12.5%)
Caffeine amount (servings/day)	1.2 ± 1.3
Alcohol drinker	31 (64.6%)
Alcohol amount (g/week)	29.9 ± 37.4
Smoker	2 (4.2%)
Smoking amount (cigarettes/day)	0.3 ± 1.1
Anthropometric measures	
Body weight (kg)	60.3 ± 10.9
Body mass index (kg/m ²)	22.8 ± 2.8
Waist circumference (cm)	80.0 ± 7.9
Neck circumference (cm)	33.9 ± 2.8
Vital signs	
Systolic blood pressure (mmHg)	119.4 ± 12.8
Diastolic blood pressure (mmHg)	74.5 ± 12.1
Pulse rate (beats/min)	71.2 ± 12.3
Body temperature (°C)	36.4 ± 0.3

Data are mean ± SD (standard deviation) or number of answers (%).

PSG на всю ніч проводили до та після кожної фази у 24 пацієнтах, які погодилися залишитися на одну ніч у лабораторії сну, щоб пройти тест на сон у лікарні. PSG використав Грасса Телефактор (Beehive Horizon, Монреаль, Квебек, Канада), включаючи 6 каналів EEG (F3-A2, F4-A1, C3-A2, C4-A1, O1-A2, O2-A1), 1 щелепний електроміограф (EMG) канал, 4 електроокулограми (EOG) канали (LE-A2, RE-A1, SO-A2, IO-A2), 2 канали датчика дихання (грудний і живіт), 1 кисневий канал монітора насичення, електрокардіограма (ECG), 2 канали EMG передньої великогомілкової кістки та положення канал моніторингу. Дані PSG були проаналізовані відповідно до стандартних рекомендацій США Академія медицини сну (AASM) [43].

2.5. Статистичні методи

Розмір вибірки був оцінений у 48 пацієнтах, що дало 80% потужності для виявлення ефекту (коефіцієнт Коена $d = 0,47$) з двобічним t-тестом на рівні значущості 0,05. Передбачувана зміна мети TST базувався на раніше опублікованих даних [44]. Був проведений аналіз намірів до лікування (ІТТ) залучення всіх рандомізованих учасників. Тест на нормальність був проведений для аналізу ненормального розподіленіх даних після перетворення на нормальний розподіл. На початковому етапі характеристики учасників були описані як середнє значення та стандартне відхилення (SD) для безперервних змінних і частота для категоріальні змінні. Т-критерій Стьюдента застосовувався для порівняння комплаєнсу та безпеки (життєві показники, звичайні аналізи крові) між групами АСН і плацебо. Для оцінки сну та психіатричного профілю, була застосована лінійна модель змішаних ефектів із групою, часом, груповим часом, послідовністю та періодом як фіксовані ефекти та учасник як випадковий ефект. Статистичний аналіз проводили за допомогою версії SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Кері, Північна Кароліна, США). Двостороннє значення $p < 0,05$ вважалося значущим. Виправлене значення p (або значення q) також було розраховано за допомогою підходу Сторі щодо частоти помилкових відкриттів (FDR) (95% довірчий інтервал), щоб виправити численні порівняння.

3. Результати

3.1. Демографічні характеристики

Демографічні характеристики 48 учасників, які були зараховані на момент рандомізація представлена в таблиці 1. Середній вік становив $49,0 \pm 11,9$ років. Було 17 чоловіків та 31 жінка. Середня тривалість порушення сну учасників становила $57,6 \pm 13,2$ місяця, а їх базові показники PSQI (Піттсбурзький індекс якості сну) та ISI (Індекс тяжкості безсоння) становили $11,4 \pm 1,9$ та $13,2 \pm 3,8$ відповідно. Після виключень і програшів до аналізу загалом підійшли 43 учасники. Відповідність груп АСН і плацебо була вище 90%, і не було значної різниці між двома групами ($94,0 \pm 6,6$ і $90,0 \pm 16,4$, відповідно $p = 0,136$).

3.2. Шкали опитувальників сну та настрою

Відмінності в симптомах порушення сну, денному функціонуванні та психіатричних характеристиках представлені в таблиці 2. Фаза АСН показала поступове зниження показника PSQI (Піттсбурзький індекс якості сну), який був $8,79 \pm 0,43$ через два тижні та $8,51 \pm 0,43$ через чотири тижні, порівняно з вихідним показником $9,79 \pm 0,42$. Під час фази плацебо PSQI також знизився від вихідного рівня до кінця фази таким чином, зміни в обох групах були в бік покращення сну ($p = 0,211$). Дискомфорт уві сні індекс (вимірний ISI (Індекс тяжкості безсоння)) був подібним, зі значним впливом часу ($p < 0,001$), хоча не було статистично значуща загальна різниця порівняно з фазою плацебо ($p = 0,523$).

Функціонування учасників у денний час також поступово покращувалося протягом чотирьох тижнів прийому період; однак суттєвих відмінностей між фазами не було (ESS, $p = 0,324$; FSS, $p = 0,854$). Що стосується показників депресії та тривоги, учасники продемонстрували подібну тенденцію до покращення під час обох фаз АСН і плацебо без суттєвих групових відмінностей (BDI, $p = 0,912$; BAI, $p = 0,924$).

Table 2 Differences in sleep disturbance symptoms, daytime functioning, and psychiatric aspects between control (placebo) and test (alpha-s1 casein hydrolysate (ACH)) phases.

Variables	Placebo		ACH		p-Value †		
					Group	Time	Group × Time
Pittsburgh Sleep Quality Index							
Week 0	10.14	± 0.42	9.79	± 0.42	0.668	<0.001 **	0.211
Week 2	8.23	± 0.42	8.79	± 0.43			
Week 4	8.41	± 0.42	8.51	± 0.43			
Insomnia Severity Index							
Week 0	12.15	± 0.73	12.08	± 0.73	0.406	<0.001 **	0.523
Week 2	9.75	± 0.73	10.50	± 0.74			
Week 4	9.44	± 0.73	10.04	± 0.74			
Epworth Sleepiness Scale							
Week 0	6.30	± 0.58	6.72	± 0.58	0.920	0.039	0.324
Week 2	6.10	± 0.58	5.91	± 0.59			
Week 4	6.02	± 0.58	5.67	± 0.59			
Fatigue Severity Scale							
Week 0	31.60	± 1.64	32.55	± 1.65	0.276	0.462	0.854
Week 2	31.00	± 1.65	32.64	± 1.67			
Week 4	30.67	± 1.65	31.29	± 1.67			
Beck Depression Inventory							
Week 0	11.65	± 1.25	12.37	± 1.26	0.464	0.008 *	0.912
Week 2	11.49	± 1.26	12.28	± 1.27			
Week 4	10.41	± 1.26	10.79	± 1.27			
Beck Anxiety Inventory							
Week 0	8.04	± 1.11	7.71	± 1.11	0.363	0.362	0.924
Week 2	8.41	± 1.11	7.72	± 1.12			
Week 4	7.70	± 1.11	7.09	± 1.12			

Data are least square (LS) mean ± standard error of mean (SEM). † p-value, linear mixed-effects model was used to analyze the effects of group, time, and group × time for four weeks. * q-value < 0.05 and ** q-value < 0.01, Storey's positive false discovery rate (pFDR) was calculated to account for multiple testing.

3.3. Суб'єктивний і об'єктивний моніторинг профілю сну

Моніторинг профілю сну під час дослідження проводився як за допомогою суб'єктивних (щоденник сну), так і об'єктивні (актиграфічні) методи; ці результати

представлені в таблицях 3 і 4. ТІВ знижувався як у фазі плацебо, так і в АСН, трохи більше протягом періоду плацебо, без статистичної значущості (щоденник сну, $p = 0,465$; актиграфія $p = 0,656$). TST (суб'єктивний загальний час сну) збільшився, а SL (час, необхідний для засипання) знизився під час тестової фази АСН, що вказує на тенденцію до значного покращення кількості сну; навпаки, погіршення тенденція спостерігалася під час фази плацебо-контролю за обома показниками. Статистично значущий відмінності спостерігалися в оцінці щоденника сну, але не в оцінці актиграфії (TST, $p < 0,001$, $q < 0,001$ проти $p = 0,270$; SL, $p < 0,001$, $q < 0,001$ порівняно з $p = 0,063$). Співвідношення учасників із тенденцією до покращення кількості сну також було вищим у фазі АСН порівняно з фазою плацебо як за показниками щоденника сну, так і за показниками актиграфії.

Table 3. Comparison of sleep parameters between control (placebo) and test (ACH) groups.

Variables	Placebo		ACH		p-Value †		
	Week 0	Week 4	Week 0	Week 4	Group	Time	Group × Time
TIB (min)							
Sleep diary	470.4 ± 12.1	455.9 ± 12.4	464.5 ± 12.2	459.5 ± 12.2	0.883	0.134	0.465
Actigraphy	432.6 ± 17.0	412.0 ± 17.1	431.5 ± 17.1	424.0 ± 17.5	0.737	0.342	0.656
TST (min)							
Sleep diary	395.7 ± 10.0	361.0 ± 10.3	385.3 ± 10.1	422.7 ± 10.1	<0.001 **	0.796	<0.001 **
Actigraphy	362.8 ± 16.5	347.8 ± 16.6	360.1 ± 16.6	376.1 ± 17.0	0.414	0.971	0.270
SL (min)							
Sleep diary	33.2 ± 4.4	50.5 ± 4.6	39.5 ± 4.5	18.3 ± 4.5	0.011 *	0.598	<0.001 **
Actigraphy	4.4 ± 1.5	5.5 ± 1.5	7.0 ± 1.5	2.8 ± 1.6	0.975	0.288	0.063
SE (%)							
Sleep diary	84.9 ± 1.3	79.4 ± 1.3	83.3 ± 1.3	92.1 ± 1.3	<0.001 **	0.108	<0.001 **
Actigraphy	83.3 ± 0.9	84.3 ± 1.0	83.6 ± 0.9	88.0 ± 1.0	0.013 *	<0.001 **	0.007 *
WASO (min)							
Sleep diary	15.7 ± 3.4	29.6 ± 3.6	17.0 ± 3.5	11.9 ± 3.5	0.039	0.097	<0.001 **
Actigraphy	53.2 ± 3.8	49.2 ± 3.9	55.6 ± 3.9	38.9 ± 3.9	0.228	0.002 *	0.053
Awake (N)							
Sleep diary	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.001 **	0.216	0.077
Actigraphy	16.1 ± 1.1	15.2 ± 1.1	15.6 ± 1.1	12.6 ± 1.2	0.157	0.024	0.240

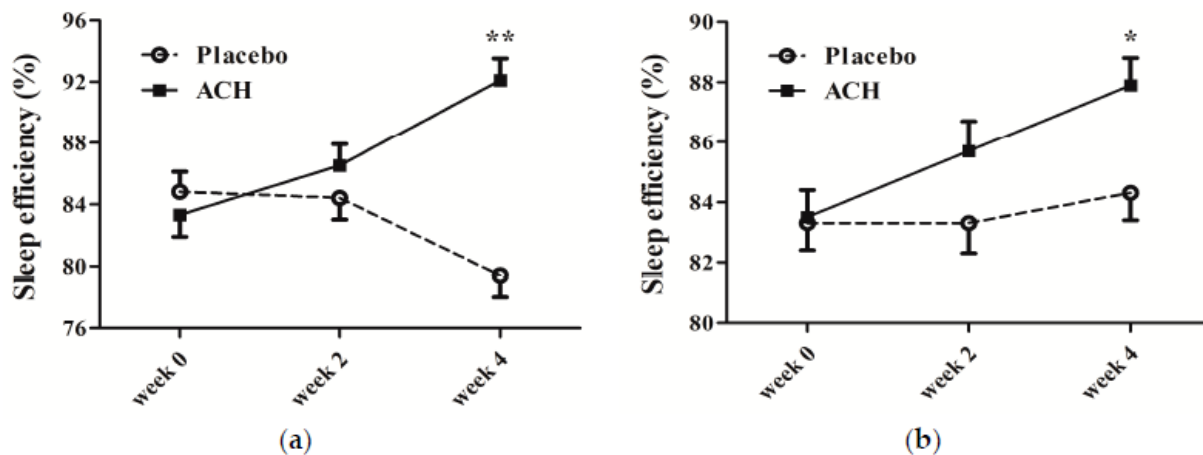
Data are LS mean ± SEM. † p-value, linear mixed-effects model was used to analyze the effects of group, time, and group × time for four weeks. * q-value < 0.05 and ** q-value < 0.01, pFDR was calculated as to account for multiple testing. TIB, time in bed; TST, total sleep time; SL, sleep latency; SE, sleep efficiency; WASO, wake after sleep onset.

Table 4. Ratio of participants with improved sleep parameters in control (placebo) and test (ACH) phases.

Variables	Sleep Diary			Actigraphy		
	Placebo	ACH	p-Value †	Placebo	ACH	p-Value †
Increased TST	24%	79%	<0.001 **	41%	61%	0.073
Decreased SL	30%	67%	0.001 **	29%	46%	0.119
Increased SE	24%	85%	<0.001 **	63%	85%	0.031
Decreased WASO	32%	51%	0.096	61%	67%	0.597
Decreased Awakes	43%	54%	0.355	56%	64%	0.465

Data are answered numbers (%). † p-value, chi-square test was used to analyze group difference. * q-value < 0.05 and ** q-value < 0.01, pFDR was calculated to account for multiple testing.

SE (ефективність сну) було значно покращено під час тестової фази порівняно з контрольною фазою за обома показниками (рис. 2). Ефект не був очевидним протягом перших двох тижнів ($p = 0,067$ за щоденником сну та $p = 0,066$ за актиграфією), але певне покращення SE було помітним після безперервного застосування АСН протягом чотирьох тижнів ($p < 0,001$, $q < 0,001$ за щоденник сну та $p = 0,007$, $q = 0,016$ за актиграфією). Співвідношення учасників із підвищеним SE також було вищим у фазі АСН порівняно з фазою плацебо (85% проти 24%, $p < 0,001$, $q < 0,001$ за щоденником сну; 85% проти 63%, $p = 0,031$, $q = 0,078$ за актиграфією).



Малюнок 2. Порівняння впливу тривалості прийому АСН на ефективність сну.

(а) Щоденник сну показав постійне покращення ефективності сну для групи фази АСН порівняно з поступовою погіршення для групи плацебо. Групова різниця в ефективності сну з часом стала значною коли АСН вводили протягом чотирьох тижнів ($p < 0,001$, $q < 0,001$ протягом 0–4 тижнів), що не досягло статистична значущість після двох тижнів використання ($p = 0,067$ протягом 0–2 тижнів).

(б) Актиграфія показала, що ефективність сну не показала чітких відмінностей між фазами АСН і плацебо; однак значний ефект покращення був очевидним лише після безперервного застосування АСН протягом чотирьох тижнів ($p = 0,066$ протягом 0–2 тижнів проти $p = 0,007$, $q = 0,016$ протягом 0–4 тижнів). * q -значення $< 0,05$ і ** q -значення $< 0,01$, $rFDR$ було розраховано для групи \times різниці в часі за лінійною моделлю змішаних ефектів для врахування множин.

Показники порушення сну, визначені WASO (кількість і час кожного пробудження після початку сну), і кількість пробуджень показали тенденцію до зниження під час фази тестування; це також вказує на покращення якості сну (WASO, $p < 0,001$, $q < 0,001$ за щоденником сну проти $p = 0,053$ за актиграфією; кількість пробуджень, $p = 0,077$ за щоденником сну проти $p = 0,240$ за актиграфією). Співвідношення учасників із порушеннями сну було нижчим у фазі тестування, ніж у фазі плацебо за обома показниками

3.4. Заходи PSG (полісомнографія)

24 учасники, які виконували нічні вимірювання PSG до та після кожної фази, були жінками в постменопаузі. Більшість показників PSG показали подібні зміни в групах АСН і плацебо від вихідного рівня до кінця лікування (додаткова таблиця S2). TST (суб'єктивний загальний час сну) і SE (ефективність сну) були збільшені в обох фазах, трохи більше протягом періоду АСН, без статистичної значущості (TST, $p = 0,729$; SE, $p = 0,599$). SL (час, необхідний для засипання) і WASO зменшилися в обох фазах, трохи більше протягом періоду АСН; однак особливої статистичної значущості не було (SL, $p = 0,437$; WASO (мін), $p = 0,551$). Кількість пробуджень та індекс збудження не виявили істотної різниці між фазами. Загальна структура сну показала, що загальний відсоток сну без швидких рухів очей (NREM) зменшився, а сну з швидкими рухами очей (REM) збільшився після тестової та контрольної фаз без істотних відмінностей (NREM, $p = 0,483$; REM, $p = 0,440$). Зокрема, відсоток стадії 2 сну відносно збільшився після фази АСН, тоді як відсоток повільного сну (SWS) збільшився після фази плацебо (стадія 2, $p = 0,116$; SWS, $p = 0,156$). Також не було суттєвих групових відмінностей між початковим і кінцевим показниками полісомнографічних показників, таких як індекс апное-гіпноное (АНІ) та індекс PLM ($p = 0,661$ і $p = 0,749$ відповідно).

3.5. Оцінка безпеки

Під час початкової фази в групі плацебо було зареєстровано одну побічну подію (свербіж і кропив'янка). Жоден учасник, віднесений до групи АСН під час фаз I і II, не повідомив про побічні ефекти.

Щоб оцінити безпеку АСН, ми оцінили гематологічні профілі на додаток до життєво важливих ознак до та після кожної контрольної та тестової фази (додаткова таблиця S3). Введення АСН не вплинуло на життєві ознаки або лабораторні дослідження.

4. Обговорення

Сон є одним із найважливіших і життєво важливих біологічних процесів, необхідний для підтримки фізичного здоров'я та психічної стабільності. Позбавлення сну погіршує денну працездатність і погіршує якість життя, а безсоння зараз є серйозною проблемою для охорони здоров'я в усьому світі, спричиняючи метаболічні, серцево-судинні та нейродегенеративні захворювання [13]. Це дослідження було проведено, щоб дослідити вплив молочного продукту зі спеціально очищеним інгредієнтом АСН на різні профілі сну у дорослих корейців із поганою якістю сну, ґрунтуючись на відомому анксиолітичному ефекті продукту [26,28]. Відомо, що стрес і тривога, зокрема, викликають зміни в ритмі сну/неспання та впливають як на кількість, так і на якість сну, включаючи SE (ефективність сну) та архітектуру [45–47].

Якість сну є складною конструкцією для емпіричної оцінки, і незадоволеність кількістю або якістю сну може бути результатом різних факторів, включаючи труднощі з засипанням або підтриманням сну, раннє ранкове пробудження або невідновним сном [48,49]. Попередні дослідження показали, що PSQI (Піттсбурзький індекс якості сну) є цінним інструментом для оцінки сприйняття якості сну; однак його вимірювання можуть сильно відрізнятися від об'єктивної реальності [50]. PSG (полісомнографія) є золотим стандартом для об'єктивного вимірювання стадій сну та архітектури; однак це обмежений метод у лікарняних чи лабораторних умовах і може не точно відображати звичайні безперервні моделі сну осіб, які чутливі до незнайомого оточення або які вже мають симптоми безсоння. Таким чином, ми спостерігали за моделями поведінки уві сні та відповідними клінічними симптомами, використовуючи актиграфію, а також шкали опитувальників і щоденники сну, щоб всебічно дослідити, чи добавка АСН може допомогти особам із порушеннями сну.

Сильними сторонами цього рандомізованого плацебо-контрольованого дослідження є його подвійний сліпий перехресний дизайн і ретельне дослідження сну суб'єктивними і об'єктивними методами; більше того, було проведено з рафінованою капсулою АСН з відносно високим дозуванням (300 мг/добу). Деякі дослідження підтвердили ефективність АСН без перехресного дизайну, лише з суб'єктивними шкалами симптомів [34,35]. Одне Клінічне дослідження АСН із щоденниками сну та актиграфічними вимірюваннями показав позитивні ефекти щодо TST (загальний час сну) та ефективності; однак їх тестованим компонентом було молоко, збагачене гідролізатом казеїну в поєднанні з іншими інгредієнтами [36]. Це важливо не тільки для того, щоб визначити, чи є конкретний інгредієнт АСН корисним для сну, але також може бути важливим результатом для багатьох дорослих з непереносимістю лактози, які не можуть пити молоко [51].

Наші дані, виміряні за шкалою суб'єктивних симптомів, включаючи PSQI, ISI, ESS, FSS, BDI та BAI, також продемонстрували поступове покращення протягом фази АСН, але не показали статистично значущої різниці порівняно з фазою плацебо. Потенційні ефекти АСН на застосовані шкали суб'єктивних симптомів можуть бути надто незначними, щоб перевищити відповідь плацебо в поточному подвійному сліпому дослідженні з 48 учасниками. Крім того, можливо, що саме поведінка щодо ведення щоденника сну може вплинути на суб'єктивний сон і психіатричні параметри, оскільки це перша стадія клінічного втручання хронічного безсоння [52]. Крім того, оскільки середній період порушення сну наших учасників становив понад шість років (72,0 ± 13,2 місяців), чотиририжневого прийому АСН могло бути недостатньо для досягнення значного результату. Проте ми показали статистично значущу ефективність застосування АСН шляхом покращення сприйманих профілів сну в записах щоденника сну та об'єктивно підтвердили підвищення SE (ефективність сну) за допомогою актиграфічного вимірювання. Крім того, вимірювання PSG (полісомнографія) у підгрупі показало відсутність впливу на параметри первинних розладів сну, таких як апное уві сні або періодичні рухи ногами.

Цікаво, що вплив АСН на SE (ефективність сну) було більш очевидно продемонстровано після чотирьох тижнів споживання порівняно з двома тижнями, що свідчить про те, що АСН може покращити якість сну при застосуванні протягом тривалого періоду без істотних побічних ефектів або проблем з толерантністю. Цей висновок може бути значною перевагою дієтичних добавок порівняно з іншими звичайними снодійними препаратами, які часто виявляють знижений ефект або толерантність після тривалого застосування [53]. Слід розглянути подальші проспективні подальші дослідження з більш розширеними періодами введення для більш конкретної оцінки кумулятивних ефектів АСН без проблем толерантності або залежності.

5. Висновки

Ми провели рандомізоване, плацебо-контрольоване дослідження з подвійним сліпим перехресним дизайном у вибірці дорослих із низькою якістю сну, використовуючи щоденну добавку високостандартизованого АСН (Lactium®) для покращення профілю сну. Режим 300 мг/день АСН протягом чотирьох тижнів зміг значно покращити суб'єктивну кількість і якість сну, засновані на підвищенні TST і SE, а також знизити SL (затримка сну) і WASO. Об'єктивні параметри сну за допомогою актиграфії також показали суттєво підвищений SE, що було більш чітко продемонстровано після безперервного використання протягом чотирьох тижнів порівняно з двома тижнями. Ці результати свідчать про те, що АСН можна безпечно використовувати для допомоги людям із порушеннями сну, особливо при легких або помірних симптомах безсоння.

Скорочення

У цьому рукописі використовуються наступні скорочення:

GABA	ГАМК гамма-аміномасляна кислота
АСН	Гідролізат казеїну alpha-s1
EEG	електроенцефалограма
SL	затримка сну
PSQI	Піттсбурзький індекс якості сну
ISI	індекс тяжкості безсоння
OSA	обструктивне апное сну
RLS	синдром неспокійних ніг
PLMS	синдром періодичних рухів ніг
IMT	індекс маси тіла
IRB	Інституційна ревізійна рада
CRIS	Інформаційна служба клінічних досліджень
EDS	надмірна денна сонливість
ESS	Шкала сонливості Епворта
FSS	Шкала тяжкості втоми
BDI	Інвентаризація депресії Бека
BAI	Інвентаризація тривоги Бека
TIB	час у ліжку
TST	загальний час сну
WASO	пробудження після початку сну
SE	ефективність сну
PSG	полісомнографія
EMG	електроміографія
EOG	електроокулограма
ECG	електрокардіограма
AASM	Американська академія медицини сну
ITT	намір лікувати
SD	стандартне відхилення
SAS	система статистичного аналізу

FDR	частота помилкових виявлень
NREM	нешвидкий рух очей
REM	швидкий рух очей у швидкій фазі
SWS	повільний сон
AHI	Індекс апное-гіпноное

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6643/11/7/1466/s1>, Table S1: List of dairy products and high-tryptophan foods that were restricted during the study, Table S2: Differences of changes in sleep parameters measured by polysomnography (PSG) between control (placebo) and test (alpha-s1 casein hydrolysate (ACH)) phases, Table S3: Analysis of vital signs and laboratory examinations at baseline (week 0) and after 4 weeks of placebo or ACH administration (week 4).

Author Contributions: Conceptualization, H.W.L. and S.O.; methodology, H.W.L. and B.K.; formal analysis, H.W.L., H.J.K., E.K. and J.E.L.; investigation, M.Y.C., C.Y.L., B.K., E.K. and J.E.L.; data curation, J.K., S.L., and B.K.; writing—original draft preparation, H.J.K.; writing—review and editing, H.W.L. and S.O.; visualization, H.J.K., B.K., E.K. and J.E.L.; supervision, H.W.L. and A.B.; project administration, H.W.L.; funding acquisition, H.W.L.

Funding: This study was supported by a grant from the Chungbuk Bio International R&D Project (No. 2014-1-01), and by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science and ICT (MSIT) (No. 2017R1A2A2A05069647 and 2019M3C1B8090803).

Acknowledgments: We confirm that we have read the journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines. We wish to thank Novarex Co., Ltd., for support and a grant for this study, especially Jae-Chul Jung and Kyung-Mi Kim for critical review and facilitating manuscript development. The authors also thank Sewon Jeong and Joohee Kim for their advice on in-depth statistical analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analysis, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Chung, K.-F.; Yeung, W.-F.; Ho, F.Y.-Y.; Yung, K.-P.; Yu, Y.-M.; Kwok, C.-W. Cross-cultural and comparative epidemiology of insomnia: The Diagnostic and statistical manual (DSM), International classification of diseases (ICD) and International classification of sleep disorders (ICSD). *Sleep Med.* **2015**, *16*, 477–482. [[CrossRef](#)]
- Cho, Y.W.; Shin, W.C.; Yun, C.H.; Hong, S.B.; Kim, J.; Earley, C.J. Epidemiology of insomnia in Korean adults: Prevalence and associated factors. *J. Clin. Neurol.* **2009**, *5*, 20–23. [[CrossRef](#)]
- Ohayon, M.M. Epidemiology of insomnia: What we know and what we still need to learn. *Sleep Med. Rev.* **2002**, *6*, 97–111. [[CrossRef](#)]
- Kay-Stacey, M.; Attarian, H.J.B. Advances in the management of chronic insomnia. *BMJ* **2016**, *354*, i2123. [[CrossRef](#)]
- Sateia, M.J.; Buysse, D.J.; Krystal, A.D.; Neubauer, D.N.; Heald, J.L. Clinical practice guideline for the pharmacologic treatment of chronic insomnia in adults: An American Academy of Sleep Medicine clinical practice guideline. *J. Clin. Sleep Med.* **2017**, *13*, 307–349. [[CrossRef](#)]
- Victorri-Vigneau, C.; Dailly, E.; Veyrac, G.; Jolliet, P. Evidence of zolpidem abuse and dependence: Results of the French Centre for Evaluation and Information on Pharmacodependence (CEIP) network survey. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2007**, *64*, 198–209. [[CrossRef](#)]
- Chung, S.-D.; Lin, C.-C.; Wang, L.-H.; Lin, H.-C.; Kang, J.-H. Zolpidem use and the risk of injury: A population-based follow-up study. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e67459. [[CrossRef](#)]
- Sithamparanathan, K.; Sadera, A.; Leung, L. Adverse effects of benzodiazepine use in elderly people: A meta-analysis. *Asian J. Gerontol. Geriatr.* **2012**, *7*, 107–111.
- Sarris, J.; Panossian, A.; Schweitzer, I.; Stough, C.; Scholey, A. Herbal medicine for depression, anxiety and insomnia: A review of psychopharmacology and clinical evidence. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2011**, *21*, 841–860. [[CrossRef](#)]
- Zimecki, M.; Kruzal, M.L. Milk-derived proteins and peptides of potential therapeutic and nutritive value. *J. Exp. Ther. Oncol.* **2007**, *6*, 89–106.
- Tan, X.; Alén, M.; Wang, K.; Tenhunen, J.; Wiklund, P.; Partinen, M.; Cheng, S. Effect of six-month diet intervention on sleep among overweight and obese men with chronic insomnia symptoms: A randomized controlled trial. *Nutrients* **2016**, *8*, 751. [[CrossRef](#)]
- Peuhkuri, K.; Sihvola, N.; Korpela, R. Diet promotes sleep duration and quality. *Nutr. Res.* **2012**, *32*, 309–319. [[CrossRef](#)]
- Kyle, S.D.; Morgan, K.; Espie, C.A. Insomnia and health-related quality of life. *Sleep Med. Rev.* **2010**, *14*, 69–82. [[CrossRef](#)]
- Silber, B.; Schmitt, J. Effects of tryptophan loading on human cognition, mood, and sleep. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2010**, *34*, 387–407. [[CrossRef](#)]
- Bubenik, G.A. Gastrointestinal melatonin: Localization, function, and clinical relevance. *Dig. Dis. Sci.* **2002**, *47*, 2336–2348. [[CrossRef](#)]
- Alvaro, P.K.; Roberts, R.M.; Harris, J.K. A systematic review assessing bidirectionality between sleep

disturbances, anxiety, and depression. *Sleep* **2013**, 36, 1059–1068. [[CrossRef](#)]

17. Kim, B.S.; Jeon, H.J.; Hong, J.P.; Bae, J.N.; Lee, J.Y.; Chang, S.M.; Lee, Y.M.; Son, J.; Cho, M.J. DSM-IV psychiatric comorbidity according to symptoms of insomnia: A nationwide sample of Korean adults. *Soc. Psychiatry Psychiatr. Epidemiol.* **2012**, 47, 2019–2033. [[CrossRef](#)]

18. Staner, L. Comorbidity of insomnia and depression. *Sleep Med. Rev.* **2010**, 14, 35–46. [[CrossRef](#)]

19. Shi, Y.; Dong, J.-W.; Zhao, J.-H.; Tang, L.-N.; Zhang, J.-J. Herbal insomnia medications that target GABAergic systems: A review of the psychopharmacological evidence. *Curr. Neuropharmacol.* **2014**, 12, 289–302. [[CrossRef](#)]

20. Mohler, H. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology* **2012**, 62, 42–53. [[CrossRef](#)]

21. Bent, S.; Padula, A.; Moore, D.; Patterson, M.; Mehling, W. Valerian for sleep: A systematic review and meta-analysis. *Am. J. Med.* **2006**, 119, 1005–1012. [[CrossRef](#)]

22. Cases, J.; Ibarra, A.; Feuillere, N.; Roller, M.; Sukkar, S.G. Pilot trial of Melissa officinalis L. leaf extract in the treatment of volunteers suffering from mild-to-moderate anxiety disorders and sleep disturbances. *Mediterr. J. Nutr. Metab.* **2011**, 4, 211–218. [[CrossRef](#)]

23. Ngan, A.; Conduit, R. A double-blind, placebo-controlled investigation of the effects of Passiflora incarnata (Passionflower) herbal tea on subjective sleep quality. *Phytother. Res.* **2011**, 25, 1153–1159. [[CrossRef](#)]

24. Franco, L.; Sánchez, C.; Bravo, R.; Rodriguez, A.; Barriga, C.; Juárez, J. The sedative effects of hops (Humulus lupulus), a component of beer, on the activity/rest rhythm. *Acta Physiol. Hung.* **2012**, 99, 133–139. [[CrossRef](#)]

25. McGregor, R.A.; Poppitt, S.D. Milk protein for improved metabolic health: A review of the evidence. *Nutr. Metab.* **2013**, 10, 46. [[CrossRef](#)]

26. Kim, J.; Desor, D.; Kim, Y.; Yoon, W.; Kim, K.; Jun, J.; Pyun, K.; Shim, I. Efficacy of α -s1-casein hydrolysate on stress-related symptoms in women. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2007**, 61, 536. [[CrossRef](#)]

27. Mizuno, S.; Matsuura, K.; Gotou, T.; Nishimura, S.; Kajimoto, O.; Yabune, M.; Kajimoto, Y.; Yamamoto, N. Antihypertensive effect of casein hydrolysate in a placebo-controlled study in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. *Br. J. Nutr.* **2005**, 94, 84–91. [[CrossRef](#)]

28. Messaoudi, M.; Lefranc-Millot, C.; Desor, D.; Demagny, B.; Bourdon, L. Effects of a tryptic hydrolysate from bovine milk α -S1-Casein on hemodynamic responses in healthy human volunteers facing successive mental and physical stress situations. *Eur. J. Nutr.* **2005**, 44, 128–132. [[CrossRef](#)]

29. Messaoudi, M.; Lalonde, R.; Schroeder, H.; Desor, D. Anxiolytic-like effects and safety profile of a tryptic hydrolysate from bovine α -s1-casein in rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2009**, 23, 323–330. [[CrossRef](#)]

30. Miclo, L.; Perrin, E.; Driou, A.; Papadopoulos, V.; Boujrad, N.; Vanderesse, R.; Boudier, J.-F.; Desor, D.; Linden, G.; Gaillard, J.-L. Characterization of α -casozepine, a tryptic peptide from bovine α -s1-Casein with benzodiazepine-Like activity. *FASEB J.* **2001**, 15, 1780–1782. [[CrossRef](#)]

31. Lecouvey, M.; Frochot, C.; Miclo, L.; Orlewski, P.; Driou, A.; Linden, G.; Gaillard, J.L.; Marraud, M.; Cung, M.T.; Vanderesse, R. Two-Dimensional 1H-NMR and CD Structural Analysis in a Micellar Medium of a Bovine α -s1-Casein Fragment having Benzodiazepine-Like Properties. *Eur. J. Biochem.* **1997**, 248, 872–878. [[CrossRef](#)]

32. de la Pena, I.J.I.; Kim, H.J.; de la Pena, J.B.; Kim, M.; Botanas, C.J.; You, K.Y.; Woo, T.; Lee, Y.S.; Jung, J.-C.; Kim, K.-M. A tryptic hydrolysate from bovine milk α -s1-casein enhances pentobarbital-Induced sleep in mice via the GABAA receptor. *Behav. Brain Res.* **2016**, 313, 184–190. [[CrossRef](#)]

33. Yayeh, T.; Leem, Y.H.; Kim, K.M.; Jung, J.C.; Schwarz, J.; Oh, K.W.; Oh, S. Administration of α -s1-Casein Hydrolysate Increases Sleep and Modulates GABAA Receptor Subunit Expression. *Biomol. Ther.* **2018**, 26, 268–273. [[CrossRef](#)]

34. Scholey, A.; Benson, S.; Gibbs, A.; Perry, N.; Sarris, J.; Murray, G. Exploring the Effect of Lactium and Zizyphus Complex on Sleep Quality: A Double-Blind, Randomized Placebo-Controlled Trial. *Nutrients* **2017**, 9, 154. [[CrossRef](#)]

35. Saint-Hilaire, Z.d.; Messaoudi, M.; Desor, D.; Kobayashi, T. Effects of a bovine α -S1-Casein tryptic hydrolysate (CTH) on sleep disorder in Japanese general population. *Open Sleep J.* **2009**, 2, 26–32. [[CrossRef](#)]

36. Kiers, J.; Bakker, G.; Bakker-Zierikzee, A.; Smits, M.; Schaafsma, A. Sleep improving effects of enriched milk: A randomised double-blind trial in adult women with insomnia. *Nutrafoods* **2007**, 4, 19–27.

37. Buisse, D.J.; Reynolds, C.F., III; Monk, T.H.; Berman, S.R.; Kupfer, D.J. The Pittsburgh Sleep Quality Index: A new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res.* **1989**, 28, 193–213. [[CrossRef](#)]

38. Bastien, C.H.; Vallières, A.; Morin, C.M. Validation of the Insomnia Severity Index as an outcome measure for insomnia research. *Sleep Med.* **2001**, 2, 297–307. [[CrossRef](#)]

39. Johns, M.W. A new method for measuring daytime sleepiness: The Epworth sleepiness scale. *Sleep* **1991**, 14, 540–545. [[CrossRef](#)]

40. Rosti-Otajärvi, E.; Hämäläinen, P.; Wiksten, A.; Hakkarainen, T.; Ruutiainen, J. Validity and reliability of the Fatigue Severity Scale in Finnish multiple sclerosis patients. *Brain Behav.* **2017**, 7, e00743. [[CrossRef](#)]

41. Lee, E.-H.; Lee, S.-J.; Hwang, S.-T.; Hong, S.-H.; Kim, J.-H. Reliability and validity of the Beck Depression Inventory-II among Korean adolescents. *Psychiatry Investig.* **2017**, 14, 30–36. [[CrossRef](#)]

42. Lee, H.-K.; Lee, E.-H.; Hwang, S.-T.; Hong, S.-H.; Kim, J.-H. Psychometric properties of the beck anxiety inventory in the community-dwelling sample of Korean adults. *Korean J. Clin. Psychol.* **2016**, 35, 822–830.

43. Berry, R.B.; Brooks, R.; Gamaldo, C.E.; Harding, S.M.; Marcus, C.; Vaughn, B. The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events. Rules, Terminology and Technical Specifications; American Academy of

Sleep Medicine: Darien, IL, USA, 2012.

44. Howatson, G.; Bell, P.G.; Tallent, J.; Middleton, B.; McHugh, M.P.; Ellis, J. Effect of tart cherry juice (*Prunus cerasus*) on melatonin levels and enhanced sleep quality. *Eur. J. Nutr.* **2012**, *51*, 909–916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Alfano, C.A.; Patriquin, M.A.; De Los Reyes, A. Subjective–objective sleep comparisons and discrepancies among clinically-anxious and healthy children. *J. Abnorm. Child Psychol.* **2015**, *43*, 1343–1353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ramsawh, H.J.; Stein, M.B.; Belik, S.-L.; Jacobi, F.; Sareen, J. Relationship of anxiety disorders, sleep quality, and functional impairment in a community sample. *J. Psychiatr. Res.* **2009**, *43*, 926–933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Calhoun, P.S.; Wiley, M.; Dennis, M.F.; Means, M.K.; Edinger, J.D.; Beckham, J.C. Objective evidence of sleep disturbance in women with posttraumatic stress disorder. *J. Trauma Stress* **2007**, *20*, 1009–1018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Edinger, J.D.; Bonnet, M.H.; Bootzin, R.R.; Doghramji, K.; Dorsey, C.M.; Espie, C.A.; Jamieson, A.O.; McCall, W.V.; Morin, C.M.; Stepanski, E.J. Derivation of research diagnostic criteria for insomnia: Report of an American Academy of Sleep Medicine Work Group. *Sleep* **2004**, *27*, 1567–1596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Association, A.P. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®); American Psychiatric Pub: Philadelphia, PA, USA, 2013.
50. Landry, G.J.; Best, J.R.; Liu-Ambrose, T. Measuring sleep quality in older adults: A comparison using subjective and objective methods. *Front. Aging Neurosci.* **2015**, *7*, 166. [[CrossRef](#)]
51. Mattar, R.; de Campos Mazo, D.F.; Carrilho, F.J. Lactose intolerance: Diagnosis, genetic, and clinical factors. *Clin. Exp. Gastroenterol.* **2012**, *5*, 113. [[CrossRef](#)]
52. Lund, H.G.; Rybarczyk, B.D.; Perrin, P.B.; Leszczyszyn, D.; Stepanski, E. The discrepancy between subjective and objective measures of sleep in older adults receiving CBT for comorbid insomnia. *J. Clin. Psychol.* **2013**, *69*, 1108–1120. [[CrossRef](#)]
53. Buscemi, N.; Vandermeer, B.; Friesen, C.; Bialy, L.; Tubman, M.; Ospina, M.; Klassen, T.P.; Witmans, M. The efficacy and safety of drug treatments for chronic insomnia in adults: A meta-analysis of RCTs. *J. Gen. Intern. Med.* **2007**, *22*, 1335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]