



*Latte fermentato con *Lactobacillus helveticus*  
contenente lactononadecapeptide  
migliora la funzione cognitiva in adulti sani di mezza età*

*Questo studio randomizzato in doppio cieco, controllato con placebo è stato condotto per determinare gli effetti di una bevanda a base di latte fermentato con *Lactobacillus* sulla funzione cognitiva di adulti sani di mezza età. Sulla base delle diverse valutazioni effettuate sui partecipanti allo studio, i risultati ottenuti hanno evidenziato un miglioramento dell'attenzione e della memoria differita.*



della popolazione mondiale, avevano un'età pari o superiore a 60 anni. Si stima che questo numero raggiungerà 1,4 miliardi entro il 2030 e 2,1 miliardi entro il 2050 (ONU 2015). Questo aumento della popolazione anziana sarà probabilmente accompagnato da un aumento del deterioramento cognitivo e della demenza. Nel 2010, circa 35,6 milioni di persone in tutto il mondo erano affetti da demenza e questo numero è previsto che possa raddoppiare ogni 20 anni, arrivando a 65,7 milioni nel 2030 e a 115,4 milioni nel 2050. Il morbo di Alzheimer è la causa più comune di demenza e contribuisce al 60-70% dei casi di demenza (WHO 2012). Gli inibitori della colinesterasi (donepezil, galantamina e rivastigmina) sono farmaci approvati per la malattia di Alzheimer, che stabilizzano o rallentano il declino a livello cognitivo, funzionale, comportamentale e dello stato clinico globale. Tuttavia, questi farmaci hanno effetti avversi, come nausea, vomito, diarrea, vertigini e perdita di peso (Hansen *et al.*, 2008). Pertanto, cibi che aumentino la funzione cognitiva senza effetti negativi sarebbero vantaggiosi per la prevenzione di questi disturbi. Ricerche scientifiche hanno cercato di identificare cibi in grado di migliorare la funzione cognitiva, con molti ingredienti alimentari, come gli acidi arachidonico e docosaesaenoico (Kotani *et al.*, 2006), astaxantina (Satoh *et al.*, 2009) e Colostrinin® (Leszek *et al.*, 1999) che sono stati esaminati e hanno dimostrato di migliorare la funzione cognitiva nei volontari coinvolti nei vari studi. Un aumento della consapevolezza dell'effetto che l'alimentazione ha sulla salute fisica e mentale ha accresciuto l'interesse per l'uso del latte e di altri prodotti caseari per prevenire o migliorare il declino cognitivo e la demenza senile (Camfield *et al.*, 2011). Uno studio prospettico di coorte della popolazione giapponese ha mostra-

\* Kazuhito Ohsawa  
 \*\* Fumiya Nakamura  
 \*\* Naoto Uchida  
 \*\*\* Seiichi Mizuno  
 \*\*\*\* Hidehiko Yokogoshi

**M**an mano che la fertilità diminuisce e l'aspettativa di vita aumenta, la percentuale di anziani è in aumento in tutto il mondo. Nel 2015, 901 milioni di persone, pari al 12%

to che l'aumento di assunzione di latte e latticini riduceva il rischio di demenza, specialmente nella malattia di Alzheimer (Ozawa *et al.*, 2014). In uno studio cross-section condotto negli Stati Uniti, l'assunzione di latticini era associata a un miglioramento delle prestazioni cognitive (Crichton *et al.*, 2012). L'evidenza attuale suggerisce che il consumo regolare di latticini a basso contenuto di grassi come parte di una dieta equilibrata possa avere effetti positivi sulla salute neurocognitiva durante l'invecchiamento (Crichton *et al.*, 2010). Si dice che il latte contenga numerosi peptidi che influenzano le funzioni fisiologiche cruciali, tra cui la secrezione degli ormoni, la difesa immunitaria, l'assorbimento dei nutrienti e la neurotrasmissione (Clare e Swaisgood 2000). La supplementazione con un complesso polipeptidico ricco di prolina per 12 mesi ha migliorato la disfunzione cognitiva nei pazienti con malattia di Alzheimer con demenza da lieve a moderata (Leszek *et al.*, 1999). In uno studio precedente, il siero del latte acido Calpis, una bevanda ottenuta dalla fermentazione di acqua e latte in polvere con *Lactobacillus helveticus* e *Saccharomyces cerevisiae*, si è dimostrato efficace contro la compromissione della memoria indotta da scopolamina nei topi (Ohsawa *et al.*, 2015), e il principale componente efficace è stato identificato come il peptide, Asn-Ile-Pro-Pro-Leu-Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro-Glu (NIPPLTQTPVVPFQLQPE, lactononadecapeptide) (Ohsawa *et al.*, 2017). Dal momento che il siero di latte acido, che contiene lactononadecapeptide a concentrazioni che vanno da 0,01 a 0,1 mg/kg, migliora la compromissione della memoria indotta da scopolamina nei topi (Ohsawa *et al.*, 2015, 2017), è possibile che alimenti contenenti diversi milligrammi di lactononadecapeptide possano

essere efficaci per prevenire i disturbi neurodegenerativi, come il morbo di Alzheimer, e migliorare l'apprendimento e la memoria nell'uomo.

Mentre la funzione cognitiva negli animali viene valutata utilizzando test comportamentali, la funzione cognitiva umana viene valutata utilizzando test neuropsicologici. Questi test possono essere dei rapidi strumenti di screening, che possono essere completati in meno di 1 minuto, oppure valutazioni neuropsicologiche formali che richiedono diverse ore per essere completate (Woodford e George 2007). Pertanto, la scelta appropriata del test neuropsicologico dipende dal tempo e dallo scopo della valutazione. Il test RBANS (*Repeatable Battery for the Assessment of Neuropsychological Status*) è un utile strumento di screening per valutare le prestazioni cognitive generali, in particolare perché è stato progettato per essere utilizzato per valutare adulti sani e individui che possono avere demenza moderatamente grave (Randolph *et al.*, 1998). Pertanto, il test RBANS può essere più sensibile per rilevare le menomazioni rispetto ad altri test standard, come il *Mini-Mental State Examination* (MMSE), il *Delirium Rating Scale* (DRS) e la scala di memoria *Wechsler III* (WMS-III) (Strauss *et al.* 2006).

Lo studio presentato esamina l'effetto di una bevanda a base di *L. helveticus* fermentato contenente lactononadecapeptide sulla funzione cognitiva in adulti sani di mezza età con dimenticanza au-

toidentificata o identificata da un parente stretto o da un conoscente, utilizzando la versione giapponese dei RBANS test (Yamashima *et al.*, 2002).

## Materiali e metodi

### Partecipanti

Questo studio è stato approvato dal Human Ethical Trial Committee della Shiba Palace Clinic (1 agosto 2013), e il consenso informato scritto è stato ottenuto da tutti i partecipanti in conformità con la Dichiarazione di Helsinki. I partecipanti erano 61 uomini e donne giapponesi sani di età compresa tra i 50 e i 70 anni con dimenticanza autoidentificata o identificata da un parente stretto o da un conoscente. I criteri di inclusione erano (1) un punteggio totale RBANS al basale di 29-52 e (2) una differenza nel punteggio totale inferiore a 10 punti tra il test di screening e il test di riferimento prima dell'assunzione. I criteri di esclusione erano (1) la presenza di un'allergia al latte o alla soia; (2) anamnesi medica o trattamento per ictus, emorragia subaracnoidea, infarto cerebrale, emorragia cerebrale e lesione alla testa con contusione cerebrale; (3) consumo di sigarette eccessivo auto-segnalato, consumo abituale di alcool o abitudine alimentare estremamente irregolare; (4) anamnesi o trattamento per epatite; (5) grave anemia; (6) anamnesi o terapia per infarto, epilessia, diabete, disfunzione tiroidea, emodialisi, uremia o anuria; (7) sintomi attesi di febbre da fieno durante il periodo dello studio; (8) storia di un test neu-

|                    | Unità di misura | Bevanda placebo | Bevanda test |
|--------------------|-----------------|-----------------|--------------|
| Calorie            | Kcal            | 43,7            | 40,9         |
| Umidità            | g               | 178,1           | 179,1        |
| Proteine           | g               | 3,0             | 3,0          |
| Grassi             | g               | 0               | 0            |
| Carboidrati        | g               | 8,0             | 7,1          |
| Ceneri             | g               | 0,9             | 0,8          |
| NIPPLTQTPVVPFQLQPE | mg              | non rilevato    | 2,4          |

Tabella 1. Composizione delle bevande testate (190 g)

ropsicologico in un ospedale; (9) partecipazione ad altre ricerche cliniche; (10) uso di farmaci che potevano influenzare il test; (11) uso di integratori alimentari che potevano influenzare il test; (12) consumo di bevande a base di acido lattico o di yogurt per più di tre giorni in una settimana; e (13) altri relativi a problemi di salute giudicati dagli investigatori tali da poter interferire con la partecipazione.

#### Progettazione dello studio

Lo studio, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, è stato condotto tra settembre 2013 e marzo 2014. I partecipanti sono stati assegnati in modo casuale al gruppo placebo o test da una persona non direttamente coinvolta nello studio utilizzando una sequenza di numeri casuali generata dal computer. Nel processo di assegnazione dei partecipanti, sono stati presi in considerazione fattori di fondo per evitare la distribuzione parziale in termini di punteggio totale di base e cinque punteggi indice di RBANS, età e sesso. Ai partecipanti è stato chiesto di consumare una bottiglia (190 g per flacone) della bevanda test o placebo una volta al giorno prima di colazione per otto settimane. Inoltre, hanno ricevuto istruzioni quali non cambiare le abitudini quotidiane, come la dieta e il tempo di sonno, tranne per prendere il prodotto di prova a un'ora fissa durante il giorno.

#### Bevande per la supplementazione

Il latte fermentato con *Lactobacillus helveticus* è stato preparato facendo fermentare latte scremato con una coltura iniziale contenente *L. helveticus* CM4. In breve, il latte scremato pastorizzato è stato inoculato con una coltura di avviamento al 3%, fermentato a 27 °C per 19 ore e pastorizzato. Il latte fermentato con *L. helveticus* contiene

lo 0,0027% (p/p) di lactononadecapeptide. Stabilizzatore, dolcificante e aroma sono stati aggiunti per preparare la bevanda test. La bevanda in esame conteneva 2,4 mg di lactononadecapeptide per flacone (circa 190 g). Stabilizzatore, dolcificante e aromi sono stati aggiunti al latte scremato ricostituito per preparare anche la bevanda placebo, che aveva la stessa proporzione di solidi non grassi (SNF), gusto, composizione e aspetto, incluso il colore, della bevanda di prova. Le composizioni di entrambe le bevande sono mostrate nella Tabella 1.

#### Analisi LC-MSMS

La quantità di lactononadecapeptide nelle bevande test e placebo è stata confermata utilizzando un sistema ACQUITY UPLC/TQD (Waters Corporation, Milford, MA) dotato di una colonna ACQUITY UPLC BEH (1,7 mm, 2,1 50 mm, Waters Corporation, Milford, MA). Il peptide standard NIPPLTQTPV-VPPFLQPE (purezza > 95%) e il peptide standard interno NIP [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>, <sup>15</sup>N]P[<sup>13</sup>C<sub>5</sub>, <sup>15</sup>N]LTQTPV-VPPFLQPE (purezza > 90%) sono stati acquistati dal Peptide Institute, Inc. (Osaka, Giappone). Il peptide standard è stato dissolto in acetonitrile al 20% + acido formico allo 0,1% a 20, 40, 80, 160 e 320 nM per generare una curva di calibrazione. Il peptide standard interno (IS) per compensare effetti matrice è stato sciolto in acetonitrile al 20% a 400 nM. I campioni di bevande (200 µL) sono stati miscelati con acido tricloroacetico al 10% (100 µL), acetonitrile (200 µL) e acqua (500 µL) per denaturare la proteina e centrifugati a 15.000 rpm per 10 min. Il surnatante (50 µL) è stato miscelato con acetonitrile al 20% + acido formico allo 0,1% (450 µL) e filtrato usando Millex LG (0,20 µm, PTFE). I



## BENESSERE dalla natura!

Con oli essenziali e olio di Neem!



Preparazioni dermo-funzionali utili per favorire la naturale fisiologia della pelle di tutte le specie animali.

### APADERM e APAGEL

L'utilizzo dei prodotti rappresenta un supporto al complessivo **benessere dell'animale contestualmente** agli interventi volti alla gestione di protocolli di prevenzione e trattamento delle patologie della **pelle** e degli **annessi cutanei** (ferite, dermatiti, lesioni, crostosità, rogna, eczemi secchi, piaghe, abrasioni) e di **ospiti indesiderati della cute** (mosche, zanzare, tafani, pappataci, pulci, pidocchi, ecc.).



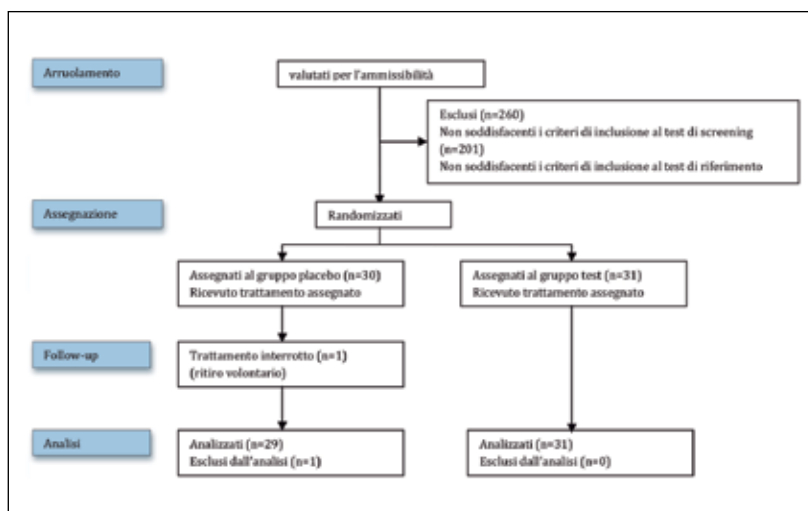
APA-CT Srl

Tel. 0543 705152 - Fax 0543 707315

info@greenvet.com

www.greenvet.com

**Figura 1.**  
CONSORT  
diagramma  
di flusso dei  
partecipanti  
allo studio



campioni filtrati (90  $\mu$ L) o le soluzioni standard di peptidi (90  $\mu$ L) sono stati miscelati con l'IS (10  $\mu$ L) per l'analisi. I campioni preparati (5  $\mu$ L) sono stati iniettati nella colonna, che è stata eluita a 50 °C con il solvente A ( $H_2O$  contenente lo 0,1% di acido formico) e il solvente B (acetonitrile contenente lo 0,1% di acido formico) utilizzando un gradiente lineare del 20-30% B per 3 min e 30-50% B per 1,5 min, erogati a 500  $\mu$ L/min. L'interfaccia di ionizzazione elettrospray (ESI) è stata utilizzata in modalità di ionizzazione positiva. La quantificazione è stata eseguita utilizzando il monitoraggio di molteplici reazioni (MRM) con  $m/z$  696.4  $\rightarrow$  243.1 transizioni per il lactononadecapeptide e  $m/z$  700.5  $\rightarrow$  245.1 per l'IS. Una curva di calibrazione è stata generata sostituendo le aree di picco dei peptidi standard con quella dell'IS. La quantità di lactononadecapeptide nelle bevande test e placebo è stata quantificata utilizzando la curva di calibrazione.

#### Valutazione neuropsicologica

La versione giapponese del test RBANS è stata utilizzata per la valutazione della funzione cognitiva (Yamashima *et al.*, 2002). Questo test è stato utilizzato perché può essere condotto in circa 30 minuti, ma fornisce un'ampia

misura della funzione cognitiva e della memoria. Consiste in due moduli (modulo A e modulo B) a somministrazione ripetuta ed è stato ampiamente utilizzato, quindi questi risultati possono essere paragonati a quelli di altri studi simili. In aggiunta, una versione simile modificata del test è stata preparata per effettuare il test di screening atto a valutare le capacità di apprendimento tra i gruppi. Il test RBANS comprende 12 subtest che contribuiscono a definire i valori dei cinque indici: memoria immediata (apprendimento lista di parole e memoria di prosa), abilità visuospatiale/visuocostruttiva (copia di figura e orientamento di linee), linguaggio (denominazione e fluency semantica), attenzione (memoria di cifre e associazione di simboli a numeri) e memoria differita (rievocazione lista di parole, riconoscimento lista di parole, rievocazione di prosa e rievocazione di figure). I punteggi grezzi dei 12 subtest sono stati convertiti in punteggi indice di subtest basati sull'età e punteggi indice basati

sull'età per le cinque funzioni cognitive. Un punteggio totale è stato calcolato combinando i punteggi non elaborati dei 12 subtest. Per la versione modificata del test di screening, sono stati somministrati il modulo A del RBANS prima dell'assunzione delle bevande (baseline) e la forma B dopo l'intervento.

#### Valutazione soggettiva

Per valutare le differenze nello stato psicologico dei partecipanti nei gruppi placebo e test, è stata utilizzata la versione breve del *Profile of Mood States* (POMS) (Yokoyama 2005). È stata impiegata questa scala perché richiede poco tempo e impegno da parte dei partecipanti, poiché contiene solo 30 punti, può misurare i cambiamenti di umore in brevi periodi di tempo e può essere utilizzata per valutare sia i pazienti che i partecipanti sani. Questo test può essere utilizzato per valutare gli stati d'animo multiformi, mentre la maggior parte degli altri test basati sull'umore misura solo i singoli aspetti dell'umore; per esempio il questionario CES-D sulla depressione (*Centre for Epidemiological Studies Depression Scale*) è progettato solo per valutare la depressione mentre la scala HAD sull'ansia e la depressione (*Hospital Anxiety Scale*) valuta disturbi ansiosi e depressivi. POMS è stato somministrato prima e dopo l'intervento, e i punteggi T dei sei stati d'animo (tensione-ansia, depressione-avvilimento, rabbia-aggressività, vigore-attività, stanchezza-indolenza e confusione-sconcerto) sono stati calcolati utilizzando il metodo standard (Yokoyama 2005).

|                               | Gruppo placebo<br>(n = 29) | Gruppo test<br>(n = 31) | Test              | Valore p |
|-------------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------|----------|
| Età, anni (media $\pm$ DS)    | 57,8 $\pm$ 5,9             | 58,5 $\pm$ 6,5          | t-test di Student | .684     |
| Rapporto tra maschi e femmine | 13/16                      | 13/18                   | Test Chi Quadrato | .972     |

**Tabella 2. Caratteristiche di base dei partecipanti**

|                                               | Prima dell'intervento<br>(baseline) | Valore p prima dell'intervento<br>vs. gruppo placebo | Dopo l'intervento | Valore p prima vs. dopo l'intervento | Valore p dopo l'intervento<br>vs. gruppo placebo |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Punteggio totale</b>                       |                                     |                                                      |                   |                                      |                                                  |
| Gruppo placebo                                | 44,7±5,0                            |                                                      | 46,5±8,2          | .257                                 |                                                  |
| Gruppo test                                   | 44,5±5,1                            | .866                                                 | 48,4±8,1          | .002**                               | .365                                             |
| <b>Memoria immediata</b>                      |                                     |                                                      |                   |                                      |                                                  |
| Gruppo placebo                                | 49,7±8,6                            |                                                      | 48,2±7,7          | .369                                 |                                                  |
| Gruppo test                                   | 47,7±8,5                            | .374                                                 | 46,9±12,5         | .697                                 | .636                                             |
| <b>Abilità visuospatiale/visuocostruttiva</b> |                                     |                                                      |                   |                                      |                                                  |
| Gruppo placebo                                | 38,5±15,1                           |                                                      | 40,7±14,8         | .536                                 |                                                  |
| Gruppo test                                   | 38,0±14,4                           | .898                                                 | 37,5±13,7         | .890                                 | .383                                             |
| <b>Linguaggio</b>                             |                                     |                                                      |                   |                                      |                                                  |
| Gruppo placebo                                | 48,2±6,5                            |                                                      | 51,1±8,9          | .098                                 |                                                  |
| Gruppo test                                   | 48,7±8,3                            | .768                                                 | 51,7±6,7          | .126                                 | .759                                             |
| <b>Attenzione</b>                             |                                     |                                                      |                   |                                      |                                                  |
| Gruppo placebo                                | 49,6±6,7                            |                                                      | 50,8±8,3          | .414                                 |                                                  |
| Gruppo test                                   | 51,4±7,8                            | .361                                                 | 55,6±8,0          | .006**                               | .028*                                            |
| <b>Memoria differita</b>                      |                                     |                                                      |                   |                                      |                                                  |
| Gruppo placebo                                | 40,0±9,3                            |                                                      | 41,6±8,1          | .300                                 |                                                  |
| Gruppo test                                   | 38,2±9,2                            | .457                                                 | 42,9±10,6         | .016*                                | .602                                             |

**Tabella 3.**  
Punteggio totale e cinque punteggi indice di RBANS

I valori indicati indicano  $\pm$  DS - \*p < .05; \*\*p < .01

# PURA BONTÀ A ZERO COMPROMESSI!

**Dal 1978, Probios il biologico etico tra storia, passione e cura della terra**




Non soffermarti alle apparenze.  
**Fai una scelta consapevole,**  
valuta con attenzione ciò che leggi sulla confezione.





**WWW.PROBIOS.IT**  
SEGUICI SU    

**Tabella 4.**  
**Punteggi indice**  
**dei subtest di**  
**RBANS**

|                                          | Prima<br>dell'intervento<br>(baseline) | Valore <i>p</i> prima<br>dell'intervento<br>vs. gruppo placebo | Dopo l'intervento | Valore <i>p</i> prima<br>vs. dopo<br>l'intervento | Valore <i>p</i> dopo<br>l'intervento<br>vs. gruppo placebo |
|------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| <b>Apprendimento lista di parole</b>     |                                        |                                                                |                   |                                                   |                                                            |
| Gruppo placebo                           | 48,7±7,0                               | .600                                                           | 44,7±8,4          | .006**                                            | .936                                                       |
| Gruppo test                              | 47,8±6,1                               |                                                                | 44,9±11,4         | .184                                              |                                                            |
| <b>Memoria di prosa</b>                  |                                        |                                                                |                   |                                                   |                                                            |
| Gruppo placebo                           | 51,0±10,5                              | .398                                                           | 53,0±6,5          | .403                                              | .283                                                       |
| Gruppo test                              | 48,6±11,5                              |                                                                | 50,6±10,0         | .364                                              |                                                            |
| <b>Copia di figura</b>                   |                                        |                                                                |                   |                                                   |                                                            |
| Gruppo placebo                           | 28,4±21,7                              | .677                                                           | 24,6±17,8         | .435                                              | .303                                                       |
| Gruppo test                              | 26,0±23,1                              |                                                                | 29,3±17,6         | .483                                              |                                                            |
| <b>Orientamento di linee</b>             |                                        |                                                                |                   |                                                   |                                                            |
| Gruppo placebo                           | 45,8±14,0                              | .953                                                           | 47,9±13,4         | .561                                              | .095                                                       |
| Gruppo test                              | 45,7±10,9                              |                                                                | 42,4±11,7         | .233                                              |                                                            |
| <b>Denominazione</b>                     |                                        |                                                                |                   |                                                   |                                                            |
| Gruppo placebo                           | 49,9±8,6                               | .012*                                                          | 50,1±13,0         | .956                                              | .385                                                       |
| Gruppo test                              | 54,3±3,9                               |                                                                | 52,4±6,9          | .191                                              |                                                            |
| <b>Fluenza semantica</b>                 |                                        |                                                                |                   |                                                   |                                                            |
| Gruppo placebo                           | 48,2±6,4                               | .988                                                           | 51,3±8,6          | .083                                              | .867                                                       |
| Gruppo test                              | 48,2±8,8                               |                                                                | 51,6±6,8          | .090                                              |                                                            |
| <b>Memoria di cifre</b>                  |                                        |                                                                |                   |                                                   |                                                            |
| Gruppo placebo                           | 51,8±9,0                               | .524                                                           | 54,9±9,8          | .058                                              | .741                                                       |
| Gruppo test                              | 53,4±11,2                              |                                                                | 55,9±11,6         | .307                                              |                                                            |
| <b>Associazione di simboli a numeri</b>  |                                        |                                                                |                   |                                                   |                                                            |
| Gruppo placebo                           | 49,5±6,8                               | .464                                                           | 49,9±7,9          | .773                                              | .027*                                                      |
| Gruppo test                              | 51,0±8,0                               |                                                                | 54,8±8,5          | .009*                                             |                                                            |
| <b>Rievocazione lista di parole</b>      |                                        |                                                                |                   |                                                   |                                                            |
| Gruppo placebo                           | 44,9±7,9                               | .346                                                           | 42,2±8,5          | .156                                              | .975                                                       |
| Gruppo test                              | 42,5±10,8                              |                                                                | 42,2±10,6         | .828                                              |                                                            |
| <b>Riconoscimento di lista di parole</b> |                                        |                                                                |                   |                                                   |                                                            |
| Gruppo placebo                           | 47,8±8,9                               | .682                                                           | 42,7±10,7         | .036                                              | .674                                                       |
| Gruppo test                              | 46,7±11,3                              |                                                                | 43,8±10,0         | .178                                              |                                                            |
| <b>Rievocazione di prosa</b>             |                                        |                                                                |                   |                                                   |                                                            |
| Gruppo placebo                           | 50,3±10,0                              | .271                                                           | 49,8±7,6          | .766                                              | .658                                                       |
| Gruppo test                              | 47,2±11,7                              |                                                                | 48,7±11,1         | .492                                              |                                                            |
| <b>Rievocazione di figure</b>            |                                        |                                                                |                   |                                                   |                                                            |
| Gruppo placebo                           | 37,2±13,5                              | .947                                                           | 44,3±8,0          | .002**                                            | .258                                                       |
| Gruppo test                              | 37,5±1,9                               |                                                                | 46,7±8,3          | .0004***                                          |                                                            |

I valori indicati indicano ± DS - \**p* < .05; \*\**p* < .01; \*\*\**p* < .001

### Analisi statistica

Tutti i valori misurati sono rappresentati come media e deviazione standard. Le differenze nelle caratteristiche di base dei partecipanti tra i gruppi placebo e test sono state valutate utilizzando il *t*-test di Student o il test Chi Quadrato. Le differenze nei punteggi RBANS prima e dopo l'intervento sono state valutate usando *t*-test accoppiati, e i confronti tra i gruppi placebo e test sono stati valutati utilizzando il *t*-test di Student. Le differenze nei punteggi T POMS prima e dopo l'intervento sono state valutate usando il test dei ranghi con segno di Wilcoxon e i confronti tra i gruppi placebo e test sono stati valutati mediante il test *U* di Mann-Whitney. Le differenze nei valori sono state

considerate significative quando il valore *p* era inferiore a .05. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando EZR (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Giappone), un'interfaccia utente grafica per R (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). EZR è una versione modificata del programma R con funzioni statistiche aggiunte frequentemente utilizzate in biostatistica (Kanda 2013).

### Risultati

**Flusso dei soggetti partecipanti**  
Una panoramica delle sessioni di test è sintetizzata nel diagramma di flusso della Figura 1. Sono stati valutati 321 soggetti con la versione modificata di RBANS e suc-

cessivamente il Modulo A dell'RBANS è stato somministrato a 120 soggetti con un punteggio totale RBANS di 29 - 52 nel test di riferimento. Di conseguenza, sono stati ammessi 69 soggetti, ma 8 di essi si sono ritirati. In totale, 61 soggetti selezionati sono stati casualmente distribuiti nei gruppi di trattamento, con 30 assegnati al gruppo placebo e 31 al gruppo test. Entro l'endpoint, un partecipante del gruppo placebo si è ritirato per circostanze personali.

### Caratteristiche dei partecipanti

La Tabella 2 mostra le caratteristiche dei soggetti partecipanti alla valutazione di base. Non ci sono state differenze significative tra i gruppi placebo e test per età, sesso, punteggio totale o cinque

punteggi indice di RBANS (Tabella 3). C'era invece una differenza significativa nei punteggi indice dei subtest per il test "Picture naming" tra i gruppi placebo e intervento (Tabella 4). Al contrario, non vi erano differenze significative nei punteggi POMS tra i due gruppi (Tabella 5).

#### *Effetto del latte fermentato con *L. helveticus**

Il punteggio totale, i punteggi dei cinque indici e dei 12 indici dei sottotest di RBANS sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard nelle Tabelle 3 e 4. Il *t*-test appaiato è stato utilizzato per valutare le differenze nei punteggi RBANS misurati prima e dopo l'intervento, e il *t*-test di Student è stato impiegato per confrontare i punteggi RBANS tra il gruppo placebo e il gruppo test. C'è stato un miglioramento statisticamente significativo nel punteggio totale, nel punteggio di attenzione e nel punteggio di memoria differita nel gruppo test dopo otto settimane ( $p = .002$ ,  $p = .006$  e  $p = .016$ , rispettivamente). Nel gruppo placebo, non vi è stato alcun miglioramento significativo nel punteggio totale o nei cinque punteggi indice di RBANS. C'è stata una differenza significativa nel punteggio di at-

tenzione tra i gruppi placebo e test dopo otto settimane ( $p = .028$ ). Tra i 12 subtest, il gruppo test ha mostrato miglioramenti significativi nel punteggio di associazione simboli-numeri e nel punteggio di rievocazione di figure ( $p = .009$  e  $p = .0004$ , rispettivamente), mentre il gruppo placebo ha migliorato significativamente i punteggi di rievocazione di figure dopo otto settimane ( $p = .002$ ). C'è stata una differenza significativa nel punteggio di associazione simboli-numeri tra i gruppi placebo e test dopo otto settimane ( $p = .027$ ).

I punteggi T del *Profile of Mood States*, una misura degli stati d'animo soggettivi, sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard nella Tabella 5. Non ci sono state differenze significative nei punteggi T tra il gruppo placebo e il gruppo test. Al contrario, il punteggio dello stato confusionale è migliorato significativamente nei gruppi placebo e test dopo otto settimane ( $p = .021$  e  $p = .032$ , rispettivamente). Non sono stati osservati effetti collaterali come vertigini o altri sintomi neurologici, gastrointestinali o cutanei né nel gruppo placebo né nel gruppo di test.

#### **Discussione**

In questo lavoro sono stati studiati

gli effetti di una bevanda a base di latte fermentato con *L. helveticus* contenente lactononadecapeptide sulla funzione cognitiva in adulti sani di mezza età. La funzione cognitiva è stata valutata utilizzando la versione giapponese del test neuropsicologico RBANS prima e dopo l'assunzione della bevanda con latte fermentato con *L. helveticus* (Yamashima *et al.*, 2002). Il test RBANS è stato progettato come un breve test per identificare e caratterizzare la demenza negli anziani. Poiché il test consiste in due diversi moduli, può essere ripetuto in occasioni separate (Randolph *et al.*, 1998) per monitorare la progressione della malattia o per valutare gli effetti dell'intervento terapeutico. Il punteggio totale può essere utilizzato per monitorare il deterioramento o il miglioramento della funzionalità cognitiva, in quanto è la misura più stabile, ben convalidata e generale sul test RBANS (Gary 2009). Il punteggio totale, e possibilmente l'indice di attenzione, sono stati proposti come punteggi primari da considerare nel valutare i cambiamenti nel tempo, grazie alla buona attendibilità del coefficiente test-retest (Strauss *et al.*, 2006).

Nel presente studio, il punteggio

|                                   | Prima dell'intervento (baseline) | Valore p prima dell'intervento vs. gruppo placebo | Dopo l'intervento | Valore p prima vs. dopo l'intervento | Valore p dopo l'intervento vs. gruppo placebo |
|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>Tensione - ansia</b>           |                                  |                                                   |                   |                                      |                                               |
| Gruppo placebo                    | 54,8 $\pm$ 6,5                   | .528                                              | 53,3 $\pm$ 6,4    | .127                                 | .356                                          |
| Gruppo test                       | 56,9 $\pm$ 9,5                   |                                                   | 55,3 $\pm$ 8,3    |                                      |                                               |
| <b>Depressione - avvillimento</b> |                                  |                                                   |                   |                                      |                                               |
| Gruppo placebo                    | 59,5 $\pm$ 5,2                   | .829                                              | 57,7 $\pm$ 6,2    | .086                                 | .241                                          |
| Gruppo test                       | 60,7 $\pm$ 8,0                   |                                                   | 60,6 $\pm$ 8,5    |                                      |                                               |
| <b>Rabbia - aggressività</b>      |                                  |                                                   |                   |                                      |                                               |
| Gruppo placebo                    | 56,8 $\pm$ 5,3                   | .499                                              | 57,2 $\pm$ 7,2    | .722                                 | .265                                          |
| Gruppo test                       | 58,7 $\pm$ 7,7                   |                                                   | 59,5 $\pm$ 8,0    |                                      |                                               |
| <b>Vigore - attività</b>          |                                  |                                                   |                   |                                      |                                               |
| Gruppo placebo                    | 53,0 $\pm$ 9,1                   | .689                                              | 53,6 $\pm$ 10,0   | .974                                 | .807                                          |
| Gruppo test                       | 53,7 $\pm$ 8,2                   |                                                   | 53,3 $\pm$ 7,2    |                                      |                                               |
| <b>Stanchezza - indolenza</b>     |                                  |                                                   |                   |                                      |                                               |
| Gruppo placebo                    | 56,5 $\pm$ 8,2                   | .894                                              | 56,2 $\pm$ 7,9    | .603                                 | .272                                          |
| Gruppo test                       | 56,9 $\pm$ 8,6                   |                                                   | 58,8 $\pm$ 9,5    |                                      |                                               |
| <b>Confusione - sconcerto</b>     |                                  |                                                   |                   |                                      |                                               |
| Gruppo placebo                    | 62,4 $\pm$ 7,7                   | .841                                              | 59,0 $\pm$ 6,0    | .021*                                | .953                                          |
| Gruppo test                       | 62,7 $\pm$ 8,6                   |                                                   | 60,3 $\pm$ 8,6    |                                      |                                               |

**Tabella 5.**  
Punteggi T di POMS

I valori indicati indicano  $\pm$  DS - \* $p < .05$

totale e il punteggio di memoria differita sono significativamente migliorati nel gruppo test dopo un consumo di otto settimane della bevanda a base di latte fermentato con *L. helveticus*. Al contrario, non vi è stato un miglioramento così significativo nel gruppo placebo. Anche il punteggio di attenzione e il punteggio di associazione di simboli a numeri sono notevolmente migliorati nel gruppo test dopo l'assunzione della bevanda a base di *L. helveticus* per otto settimane. I punteggi dell'attenzione e dell'associazione simboli-numeri del gruppo test erano significativamente più alti di quelli del gruppo placebo dopo l'intervento. Il subtest di associazione di simboli-numeri viene utilizzato per valutare l'attenzione nel test RBANS e per valutare vari stati nella scala di intelligenza per adulti Wechsler - quarta edizione (WAIS-IV) e nella scala di intelligenza Wechsler per bambini - quarta edizione (WISC-IV) (Gary 2009). Miglioramenti nel punteggio di associazione simboli-numeri potrebbero indicare miglioramenti nella memoria di lavoro, abilità visuo-motorie, capacità di apprendimento e memoria a breve termine. Il miglioramento del punteggio totale, del punteggio di attenzione, del punteggio di memoria differita e del punteggio di associazione simboli-numeri nel gruppo test indica che la funzione cognitiva, come l'attenzione e la memoria differita, potrebbero essere migliorate dall'assunzione di una bevanda a base di latte fermentato con *L. helveticus*. Pertanto, il latte fermentato con *L. helveticus* contenente lactononadecapeptide potrebbe essere efficace come alimento funzionale per la prevenzione dei disturbi neurodegenerativi, come il morbo di Alzheimer, e per migliorare l'apprendimento e la memoria. Alcuni studi hanno suggerito che l'umore ha impatto su diversi processi cognitivi. L'emozione e la cognizione sono strettamente intrecciate e il complesso comportamento umano emerge dalle

interazioni dinamiche tra processi multipli e reti cerebrali (Brosch *et al.*, 2013). I soggetti depressi che hanno partecipato a un recente studio hanno dimostrato prestazioni più scarse nella memoria immediata e differita, nell'attenzione e nelle abilità visuospatiali/visuocostruttive nel test RBANS (Faust *et al.*, 2017). Pertanto, il metodo POMS è stato utilizzato come valutazione soggettiva per confermare la presenza o l'assenza di differenze nello stato psicologico dei partecipanti tra il gruppo placebo e il gruppo di test. Poiché non vi erano differenze significative nei risultati POMS tra i due gruppi prima e dopo l'intervento, lo stato psicologico dei partecipanti potrebbe non essere associato a miglioramenti nella funzione cognitiva derivanti dall'assunzione di latte fermentato con *L. helveticus*.

Ci sono molte limitazioni che dovrebbero essere osservate. Innanzitutto, questo è stato uno studio con *follow-up* durato otto settimane. È necessario un futuro studio clinico a lungo termine per stabilire meglio l'efficacia del latte fermentato con *L. helveticus* contenente lactononadecapeptide nella prevenzione della disfunzione cognitiva. In secondo luogo, è stata valutata la funzione cognitiva utilizzando solo il test RBANS. Studi futuri dovrebbero confermare l'efficacia del latte fermentato nella prevenzione della disfunzione cognitiva utilizzando altri test neuropsicologici, come MMSE, DRS e WMS-III (Strauss *et al.*, 2006). In terzo luogo, la versione modificata del test RBANS utilizzata per il test di screening non è stata convalidata. Poiché il test di screening modificato è stato utilizzato solo per formare i partecipanti e per valutare gli effetti di apprendimento tra i gruppi, si ritiene che questo non possa aver influenzato i risultati principali. In quarto luogo, non è possibile escludere un effetto apprendimento con il test RBANS. Il punteggio del subtest di rievocazione di figure è significativamente aumentato nel gruppo placebo dopo

otto settimane. Poiché un effetto apprendimento dovrebbe influenzare entrambi i gruppi allo stesso modo, si prevede che un confronto tra i gruppi elimini l'impatto di tale effetto. Tuttavia, l'effetto apprendimento ha reso difficile esaminare le differenze nel punteggio totale tra il gruppo placebo (un aumento medio di 1,8 punti) e il gruppo test (un aumento medio significativo di 3,9 punti).

Uno studio precedente ha mostrato che il siero di latte acido in polvere Calpis (200 e 2000 mg/kg) contenente lactononadecapeptide (0,01 e 0,1 mg/kg) ha migliorato significativamente il deterioramento cognitivo indotto da scopolamina nei topi (Ohsawa *et al.*, 2015; 2017). Il lactononadecapeptide (0,0001-1,0 mg/kg) ha anche ridotto la compromissione della memoria indotta da scopolamina (Ohsawa *et al.*, 2017). Il dosaggio efficace nei topi suggerisce che il consumo di latte fermentato con *L. helveticus* contenente lactononadecapeptide (2,4 mg) potrebbe migliorare la funzione cognitiva in adulti sani di mezza età. I meccanismi mediante i quali questo latte fermentato riduce la compromissione della memoria indotta da scopolamina nei topi e migliora la funzione cognitiva in adulti sani di mezza età, dovrebbe essere determinato in studi futuri.

**\* Research & Development Center,  
Kanagawa, Japan**

**\*\* Research & Development Center,  
Ibaraki, Japan**

**\*\*\* Research & Development Headquarters,  
Ibaraki, Japan**

**\*\*\*\* Department of Food and Nutritional  
Sciences, College of Bioscience and  
Biotechnology, Chubu University, Aichi,  
Japan**

## Bibliografia

- Brosch T, Scherer KR, Grandjean D, Sander D. 2013. The impact of emotion on perception, attention, memory, and decision-making. *Swiss Med Wkly*. 143:w13786.
- Camfield DA, Owen L, Scholey AB, Pipingas A, Stough C. 2011. Dairy constituents and neurocognitive health in ageing. *Br J Nutr*. 106:159-174.

- Clare DA, Swaisgood HE. 2000. Bioactive milk peptides: a prospectus. *J Dairy Sci.* 83:1187-1195.
- Crichton GE, Murphy KJ, Bryan J. 2010. Dairy intake and cognitive health in middle-aged South Australians. *Asia Pac J Clin Nutr.* 19:161-171.
- Crichton GE, Elias MF, Dore GA, Robbins MA. 2012. Relation between dairy food intake and cognitive function: The Maine-Syracuse longitudinal study. *Int Dairy J.* 22:15-23.
- Faust K, Nelson BD, Sarapas C, Pliskin NH. 2017. Depression and performance on the repeatable battery for the assessment of neuropsychological status. *Appl Neuropsychol Adult.* 24:350-356.
- Gary GM. 2009. *Handbook of psychological assessment*. 5<sup>th</sup> ed. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Hansen RA, Gartlehner G, Webb AP, Morgan LC, Moore CG, Jonas DE. 2008. Efficacy and safety of donepezil, galantamine and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Clin Interv Aging.* 3:211-225.
- Kanda Y. 2013. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 48:452-458.
- Kotani S, Sakaguchi E, Warashina S, Matsukawa N, Ishikura Y, Kiso Y, Sakakibara M, Yoshimoto T, Guo J, Yamashita T. 2006. Dietary supplementation of arachidonic and docosahexaenoic acids improves cognitive dysfunction. *Neurosci Res.* 56:159-164.
- Leszek J, Inglot AD, Janusz M, Lisowski J, Krukowska K, Georgiades JA. 1999. Colostrin<sup>VR</sup>: a proline-rich polypeptide (PRP) complex isolated from ovine colostrum for treatment of Alzheimer's disease. A double-blind, placebo-controlled study. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 47:377-385.
- Ohsawa K, Uchida N, Ohki K, Nakamura Y, Yokogoshi H. 2015. Lactobacillus helveticus-fermented milk improves learning and memory in mice. *Nutr Neurosci.* 18:232-240.
- Ohsawa K, Uchida N, Ohki K, Yokogoshi H. 2017. Identification of peptides present in sour milk whey that ameliorate scopolamine-induced memory impairment in mice. *Int J Food Sci Nutr.* [Epub ahead of print]. doi: 10.1080/09637486.2017.1324564.
- Ozawa M, Ohara T, Ninomiya T, Hata J, Yoshida D, Mukai N, Nagata M, Uchida K, Shirota T, Kitazono T, Kiyohara Y. 2014. Milk and dairy consumption and risk of dementia in an elderly Japanese population: the Hisayama study. *J Am Geriatr Soc.* 62:1224-1230.
- Randolph C, Tierney MC, Mohr E, Chase TN. 1998. The repeatable battery for the assessment of neuropsychological status (RBANS): preliminary clinical validity. *J Clin Exp Neuropsychol.* 20:310-319.
- Satoh A, Tsuji S, Okada Y, Murakami N, Urami M, Nakagawa K, Ishikura M, Mikiyuki K, Yoshihiko K, Takuji S. 2009. Preliminary clinical evaluation of toxicity and efficacy of a new astaxanthin-rich Haematococcus pluvialis extract. *J Clin Biochem Nutr.* 44:280-284.
- Strauss E, Sherman E, Spreen OA. 2006. *Compendium of neuropsychological tests: administration, norms, and commentary*. New York: Oxford University Press.
- [UN] United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. 2015. World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables. ESA/P/WP.241.
- [WHO] World Health Organization-Alzheimer's Disease International. 2012. Dementia: A Public Health Priority.
- Woodford HJ, George J. 2007. Cognitive assessment in the elderly: a review of clinical methods. *Q J Med.* 100:469-484.
- Yamashita T, Yoshida M, Kumahashi K, Matsui M, Koshino Y, Higashima M, Nagasawa T, Ueki A, Ohtsuka M, Aoki S. 2002. The Japanese version of RBANS (repeatable battery for the assessment of neuropsychological status). *No Shinkei.* 54:463-471.
- Yokoyama K. 2005. *Guide to the POMS short form and cause studies*. Tokyo: Kaneko Shobo, Japan.

# A. MINARDI & FIGLI S.R.L.

Via Boncellino 32 - 48012 Bagnacavallo (Ra) - Tel. 0545 61460 - Fax 0545 60686

## DAL 1930 LAVORAZIONE E COMMERCIO PIANTE OFFICINALI



[www.minardierbe.it](http://www.minardierbe.it)

[info@minardierbe.it](mailto:info@minardierbe.it)

