



Snížení postmenopauzálních příznaků úzkosti a depresí po léčbě izoflavony pocházejícími z extraktu červeného jetele

Markus Lipovac^a, Peter Chedrau^{b,*}, Christine Gruenhut^c, Ana Gocan^c, Maria Stammer^d, Martin Imhof^a

a) Oddělení gynekologie a porodnictví Všeobecné fakultní nemocnice v Korneuburgu, Rakousko

b) Instituto para la Salud de la Mujer, Guayaquil, Ecuador

c) Výzkumné středisko Med XIX, Grinzingerstr. 83, A-1190 Vídeň, Rakousko

d) Oddělení gynekologie a porodnictví Lékařské univerzity ve Vídni, Rakousko

INFORMACE O ČLÁNKU

Historie článku:

Přijat 31. srpna 2009

Přijat v revidované formě 28. října 2009

Schválen dne 30. října 2009

Klíčová slova:

Depresivní nálada

Úzkost

Postmenopauza

Červený jetel (jetel luční)

Izoflavony

ABSTRAKT

Cíl: Hodnocení účinku izoflavonů pocházejících z extraktu červeného jetele (MF11RCE) na příznaky úzkosti a depresí u postmenopauzálních žen.

Metoda: Sto devět postmenopauzálních žen ve věku 40 a více let bylo náhodně rozděleno do dvou skupin, jedné byly dvakrát denně podávány kapsle MF11RCE (80 mg izoflavonů z jetele, skupina A) druhé placebo téhož vzhledu (skupina B) po dobu 90 dnů. Po sedmidenním „promývacím“ intervalu byl proveden v obou případech přechod na druhý léčivý přípravek, který byl podáván dalších 90 dní. Příznaky úzkosti a deprese byly měřeny při vstupním vyšetření, po 90 a 187 dnech pomocí škály úzkosti a deprese (Hospital Anxiety and Depression Scale - HADS) a Zungovy sebehodnotící škály deprese (Zung's Self Rating Depression Scale - SDS).

Výsledky: Po podávání látky MF11RCE došlo ke značnému snížení celkového skóre HADS (rovněž výsledky dílčí škály úzkosti a deprese) a celkového skóre SDS. Tento účinek odpovídal snížení celkového skóre HADS o 76,9 % (76 % u úzkosti a 78,3 % u deprese) a snížení celkového skóre SDS o 80,6 %. Po podávání placebo také poklesly celkové výsledky HADS (rovněž výsledky dílčí stupnice úzkosti a deprese) a SDS v porovnání s hodnotami vstupního vyšetření, ale pouze v průměru o 21,7 %.

Závěr: Izoflavony získané z červeného jetele (MF11RCE) prokázaly svůj účinek na zmírnění příznaků úzkosti a deprese u postmenopauzálních žen.

1. Úvod

Deprese, úzkost a poruchy nálad jsou velmi častými a oslabujícími neduhy se značnými osobními, sociálními i ekonomickými následky [1,2]. Riziko depresivních poruch hrozí více ženám než mužům. Z toho důvodu převládá deprese v životě žen přibližně z 21% ve srovnání s muži, kde dosahuje 13 % [3,4]. Perimenopauzální a postmenopauzální roky jsou obdobím podléhající mnoha stresorům (tj. rodinným, sociálním, pracovním, zdravotním, ekonomickým i sexuálním), které zřejmě v této populaci zvyšují frekvenci výskytu poruch nálad [5–8]. Bylo zjištěno, že klimakterický syndrom (vazomotorické symptomy) má přímou souvislost s prevalencí symptomů náladovosti [9–11] a naopak depresivní symptomy mohou zvyšovat náklady horkosti [12]. Zjištění emocionálních poruch u klimakterických žen je důležitým, avšak obtížným úkolem. Z výsledků měření pomocí řady stupnic pro kvalitu života (QoL) vyplývá, že značné množství klimakterických žen vykazuje úzkostně depresivní symptomy [13–16]. Skutečně u více než 70 % perimenopauzálních žen se projevuje plačtivost, podrážděnost a symptomy sklíčenosti [13], a více než 60 % postmenopauzálních žen trpí úzkostmi, depresemi a ztrátou paměti [16].

Ačkoliv přínosy hormonální léčby (HT) ve zmírnění klimakterického syndromu a prevenci osteoporózy a jiných stavů spojených s vyšším věkem jsou velice dobře známy po celém světě [17], dlouhodobě zajištění účinku je nízké a závisí na řadě faktorů, mimo jiné na poměru rizika a přínosu [18]. V tomto smyslu se používání HT dále omezilo po neočekávaných zjištěních studie Ženské zdravotní organizace (WHI), v níž jeden z režimů podávání HT signifikantně zvýšil riziko kardiovaskulárních příhod a rakoviny prsu [19]. Z těchto důvodů změnili lékaři a pacientky svůj postoj k používání HT k léčbě menopauzy [20,21] a zaměřili svůj zájem na alternativy estrogenů [22,23]. Do této kategorie patří například fytoestrogeny, což jsou molekuly rostlinného původu, zastoupeny hlavně izoflavony, projevující estrogení účinky [24,25]. Ačkoliv jejich aktivita je slabší než u konvenčních estrogenů sloučenin, mají díky své selektivní schopnosti vazby na estrogení receptory příznivý vliv na různé orgány (kosti, vagínu, mozek) při nulovém účinku na dělohu či prsa [26]. Ačkoliv jsou nejrozšířenějším předmětem studií izoflavony extrahované ze sóji, mezi ženami a výzkumnými pracovníky vzrůstá zájem o izoflavony získané z extraktu červeného jetele (*Trifolium pratense*) a které jsou typem fytoestrogenů. Tento směr nyní podporuje experimentální [27–30] i klinický důkazní materiál [31–34].

Ačkoliv bylo zjištěno, že izoflavony z červeného jetele mají příznivý účinek na menopauzální symptomy [33,35], na vaginální [32] a kardiovaskulární zdraví [34], se slibnými ochrannými vlastnostmi [31], dosud nejsou odhaleny účinky izoflavonů (z červeného jetele nebo sóji) na klimakterické poruchy nálad u žen. Cílem této studie tudíž bylo zhodnotit účinek izoflavonů získaných z extraktu červeného jetele (MF11RCE) na úzkostně depresivní příznaky u postmenopauzálních žen.

Autor - korespondent v: Instituto Para la Salud de la Mujer, Vélez 616 y García Avilés, PO Box 09-02000-70-A, Guayaquil, Ekvádor. Tel.: +593 4 252 6825; fax: +593 4 252 6825. E-mailová adresa: institutochedraui@gmail.com (P. Chedraui).

0378-5122/\$ – viz titulní list © 2009 Elsevier Ireland Ltd. Všechna práva vyhrazena.
datum vydání: 10.1016/j.maturitas.2009.10.014

2. Metody

2.1. Subjekty

Od května 2003 do listopadu 2004 probíhala prospektivní, randomizovaná, dvojitě zaslepená, placebem kontrolovaná studie, na níž se podílely Study Center Med XIX a oddělení pro gynekologickou endokrinologii a reprodukční medicínu, Všeobecná nemocnice ve Vídni, Rakousko, s primárním zaměřením na hodnocení účinnosti volně prodejného extraktu z červeného jetele (MF11RCE) na vybrané pohlavní hormony a endometrium u postmenopauzálních žen. Výsledky tohoto ramena studie již byly dříve uvedeny [31]. Druhotným cílem této první studie bylo změřit u účastnic úzkostně depresivní příznaky. Výsledky jsou předloženy v tomto dokumentu. Jak již bylo výše uvedeno, [31] do studie bylo zahrnuto sto třináct žen z běžné denní praxe ambulantní ordinace pro menopauzu při Všeobecné nemocnici a institutu Menox Climacteric Institute v rakouské Vídni. Kritéria pro zařazení do studie: postmenopauzální stav (amenorrhea >12 měsíců), 40 let a více, negativní výsledek těhotenského testu, ochota dodržovat termíny kontrol a užívat předepsané přípravky, projevy středně závažných až závažných menopauzálních symptomů (Kuppermanův index ≥ 15). Vyloučeny byly ženy užívající HT nebo se známou přecitlivělostí na izoflavony. Ode všech pacientek byl získán písemný informovaný souhlas.

Účastnice byly náhodně přiděleny do jedné ze dvou skupin, v jedné byly podávány dvě kapsle MF11RCE (80 mg izoflavonů z červeného jetele, skupina A) v druhé placebo téhož vzhledu (skupina B) po dobu 90 dnů. Po sedmidenním promývacím intervalu se přípravky subjektům vyměnily a byly podávány po dalších 90 dnů. Symptomy úzkosti a deprese se měřily při vstupním vyšetření, po 90 a po 187 dnech pomocí škály úzkosti a deprese (Hospital Anxiety and Depression Scale - HADS) a Zungovy sebehodnotící škály deprese (Zung's Self Rating Depression Scale - SDS). Další vyšetřování zahrnovala anamnézy, anamnézy užívání léčivých přípravků, měření tělesné hmotnosti a krevního tlaku, což bylo prováděno v týchž intervalech. Tato vyšetření probíhala před oběma fázemi léčby i po nich. Měření krevního tlaku se provádělo po patnáctiminutovém klidu vsedě. Index tělesné hmotnosti (Body mass index, BMI) byl vypočten podle vzorce [hmotnost (kg) / druhá mocnina výšky (m)] [33].

Protokol studie byl schválen Etickou komisí Univerzity lékařství ve Vídni a Všeobecnou nemocnicí ve Vídni (Ethikkommission der Medizinischen Universität Wien und des Allgemeinen Krankenhauses der Stadt Wien—AKH).

2.2. Přípravky

Každá kapsle MF11RCE (izoflavon z extraktu červeného jetele) standardně obsahovala 40 mg izoflavonů ve formě aglykonů - biochanin A, formononetin, genistein a daidzein. Kapsle s MF11RCE a placebem téhož vzhledu dodala společnost Melbrosin International (Produktions und Vertriebs GmbH & Co KG, Vídeň, Rakousko) v neprůhledných kontejnerech značených jako AorBand, zaslepených pro řešitele i účastnice studie až do ukončení studie, kdy byl kód zpřístupněn.

Tabulka 1 - Demografické údaje a údaje z anamnézy.

	Skup. A (n = 50)	Skup. B (n = 59)	Celkem (n = 109)
Průměrný věk (počet let)	54,5±6,2 ^a	53,7±7,8	53,5±7,1
Průměrný BMI	24,5±3,9	24,9±3,9	24,7±3,9
Hysterektomie (%)	18,0	13,6	15,6
Dřívější HRT (%)	58,0	59,3	58,7

^a Průměrná ± standardní odchylka.

2.3. Měření depresivních a úzkostných symptomů

2.3.1. kála úzkosti a deprese (Hospital Anxiety and Depression Scale, HADS)

HADS je dotazník běžně používaný ke zjištění míry úzkosti a deprese. Obsahuje 14 položek ve formě tvrzení, které subjekt studie hodnotí na základě svých zkušeností za poslední týden, a tyto položky jsou rozděleny do dvou dílčích škál: úzkost a deprese (každá po 7 položkách). Každá položka je hodnocena na čtyřbodové stupnici (0-3). Tudiž součet každé ohodnocené položky podává celkové skóre HADS a dílčích škál [36].

2.3.2. The Zung's Self Rating Depression Scale (SDS)

SDS byla určena ke zjištění míry deprese u pacientů s diagnostikovanými depresivními poruchami. Jedná se o krátký průzkum bez účasti tazatele ke zjištění míry depresivního stavu pacienta. Škála se 16 položkami měří čtyři běžné vlastnosti deprese: pervazivní poruchy, fyziologické ekvivalenty, jiné poruchy a psychomotorické aktivity. Dotazník obsahuje deset kladně formulovaných a deset záporně formulovaných otázek. Každá otázka se hodnotí na stupnici 1 - 4 (zřídka, spíše občas, spíše často, většinu času). Součet všech ohodnocených otázek tvoří celkové skóre SDS [37].

2.4. Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena na základě léčebného záměru (intention-to-treat) pomocí SPSS (verze 11.0 pro Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Údaje jsou předloženy jako průměry, standardní odchylky a procenta. Vzhledem k různým absolutním hodnotám v okamžiku vstupního vyšetření bylo provedeno porovnání s ohledem na zjištěné změny. Rozdíly mezi skupinami pro kontinuální a kategoriální data byly odpovídajícím způsobem porovnány s nepárovým studentským testem Student's T a chi-kvadrát testem. Změny v rámci každé z léčebných fází byly hodnoceny pomocí párového testu Student's T. Hodnota $p < 0,05$ byla považována za statisticky významnou.

3. Výsledky

Do této studie se přihlásilo celkem 113 žen. Padesát tři bylo náhodně zařazeno do skupiny A a 60 do skupiny B. Čtyři ženy zahájily léčbu HT a byly ze studie vyloučeny. Tudiž pro hodnocení bylo akceptováno 109 žen, 50 přiděleno do skupiny A a 59 do skupiny B. Průměrný věk účastnic byl 53,5±7,1 let (Skupina A 54,5±6,2 let vs. Skupina B 53,7±7,8 let). Mezi studijními skupinami nebyly ohledně bazálních charakteristik pozorovány žádné významné změny (Tabulka 1). Ani po podávání aktivní látky, ani placebo se u skupin neprojevovaly žádné vedlejší účinky.

Po podávání látky MF11RCE došlo ke značnému snížení celkového skóre HADS (rovněž výsledky dílčí stupnice úzkosti a deprese) a celkového skóre SDS v porovnání s výsledkem vstupního vyšetření. Tento účinek odpovídal snížení celkového skóre HADS o 76,9% (76% u úzkosti a 78,3% u deprese) a snížení celkového skóre SDS o 80,6%. (Tabulka 2). Po podávání placebo také významně poklesly celkové výsledky HADS (rovněž výsledky dílčí stupnice úzkosti a deprese) a SDS v porovnání s hodnotami vstupního vyšetření, ale pouze v průměru o 21,7 %.

Tabulka 2 - Skóre HADS a SDS po každé fázi léčby.

Výsledek vstupního vyšetření	Po pod. placebo	Po pod. MF11RCE
Škála úzkosti a deprese		
Úzkost	9,98±4,68 ^a	8,05±4,76 [†] 2,40±2,53 [†]
Deprese	6,91±4,02	5,23±3,65 [†] 1,50±2,06 [†]
Celkové HADS	16,89±8,45	13,28±8,00 [†] 3,91±4,26 [†]
Celkové SDS	12,24±7,39	9,57±7,01* 2,37±3,97 [†]

^a Průměrná ± standardní odchylka.

* $p < 0,001$ v porovnání s výsledkem vstupního vyšetření.

[†] $p < 0,001$ v porovnání s placebem.

4. Diskuse

Epidemiologické údaje naznačují, že ženám hrozí ve srovnání s muži vyšší riziko úzkostných stavů [3,4], se zvýšenou prevalencí mezi perimenopauzálními a postmenopauzálními ženami [13,14,16]. Tuto situaci lze alespoň částečně vysvětlit vyšším nedostatkem estrogenů [38] a intenzitou menopauzálních příznaků. Výskyt návalů horkosti u perimenopauzálních a postmenopauzálních žen je pro psychologické symptomy (úzkost a deprese) skutečně rizikovým faktorem [9,39]. U žen středního věku se příznaky deprese spojují se závažností somatických menopauzálních symptomů [40]. Bolesti a ztuhlost kloubů se rovněž pojí s negativní náladou [41]. V každém případě narušují zvýšené menopauzální symptomy (včetně úzkosti a deprese) kvalitu života žen [42,43].

Estrogeny projevují své příznivé vlivy v mozku pomocí selektivní β vazby estrogenního receptoru [44] a interakce s dopaminergickými, serotonergickými a cholinergickými systémy, a v oblastech mozku důležitých pro vyšší kognitivní funkce a náladu [38]. Tento základ dlouhodobě validoval HT pro zmírnění menopauzálních symptomů, včetně depresivních a úzkostných. Přesto zjištění studie WHI značně snížila používání HT v celosvětovém měřítku [19], společně se zvýšeným zájmem žen i lékařů o využití alternativních přípravků [21]. K těmto alternativám patří fytoestrogeny, zastoupeny zejména izoflavony, které vykazují své příznivé účinky v podstatě v různých orgánech (včetně mozku) díky selektivní β vazbě na estrogenní receptory [26]. Zájem mezi ženami a výzkumnými pracovníky se v současnosti zvyšuje v souvislosti s izoflavony získanými z extraktu červeného jetele (Trifolium pratense), které jsou typem fytoestrogenu. Tuto skutečnost nyní podporuje experimentální [27–30] i klinický důkazní materiál [31–34]. Přesto stále chybí aktuální údaje potvrzující účinek izoflavonů na poruchy nálad u klimakterických žen. V literatuře lze nalézt zmínky o příznivém účinku izoflavonů ze sóji a červeného jetele na symptomy úzkosti a deprese, zařazené do dotazníků menopauzálních symptomů, ale nikoli zjištěné určeným vybavením pro měření úzkosti a deprese. Například lze uvést příznivý účinek na menopauzální symptomy zahrnující poruchy spánku, stavy úzkosti a deprese pozorované u 190 postmenopauzálních španělských žen, jimž byly podávány sójové izoflavony v množství 17,5 mg [45]. Tudiž podle našich informací mohou být naše údaje prvními (alespoň ohledně izoflavonů z červeného jetele), které zjišťují jejich příznivý klinický účinek na postmenopauzální symptomy úzkosti a deprese měřenými metodami HADS a SDS. V současné studii byly výsledky HADS a SDS významně nižší (zlepšení stavu) ve srovnání s výsledky vstupního vyšetření a s placebem. Oproti tomu je důležité zmínit skutečnost, že zde došlo rovněž k významnému snížení (o 80 %) návalů horkosti v aktivně léčeném rameni studie v porovnání s nulovým výsledkem ve skupině, již bylo podáváno placebo (údaje nejsou uvedeny). Protože již uvedené depresivní symptomy u žen středního věku souvisejí se závažností somatických menopauzálních příznaků [40]; mohou být izoflavony z červeného jetele prospěšné příznivým účinkem na náladovost díky zmírnění návalů horkosti. Avšak přímý nebo spojený účinek aktivní složky na náladovost nelze zcela vyloučit. V tomto směru jsou zajištěny další výzkumy.

Experimentální data podporující naše klinické důkazy jsou rovněž skoupá. Přesto byly nedávno zjištěny ochranné účinky izoflavonů z červeného jetele při úrazu způsobeného bleskem na dopaminergní neurony [46] v důsledku inhibice aktivace mikroglie a tvorby prozánětlivých faktorů. Podobně ochránily izoflavony z červeného jetele lidské kortikální neurony před glutamátovou toxicitou [47] a oxidačním stresem [48], což by mohlo být následkem jejich antioxidantního a estrogenního působení.

Experimentální údaje ohledně sójových izoflavonů se zdají být omezeny pouze na oblast úzkostných stavů. U zvířat krmených stravou Phyto-600 se významně snížily hladiny BAD (proapoptotický protein Bcl-2) v přední kůře mozku a v bazálním hypothalamu středního mozku (MBH); ale významně vzrostly v amygdale. U těchto potkanů se významně zvýšily hladiny beta III tubulinu v amygdale, v kůře předního mozku, v hippocampu a MBH oproti hodnotám u krys, jimž nebyla podávána rostlinná strava, což dokazuje neuroprotektivní potenciál sójových izoflavonů v těchto oblastech a naznačuje, že konzumace kofeinu/teinu může být prospěšná pro učení a paměť, v případech chování spojeného s úzkostnými stavy a zotavení po úrazu [49].

Equol, hlavní aktivní produkt metabolismu daidzeinu, má jedinečnou a důležitou schopnost specificky vázat 5 alfa-dihydrotestosteron a následně inhibovat účinky tohoto silného androgenu. U hlodavců byl zjištěn konkrétní vliv sójových fytoestrogenů ve stravě na spotřebu, učení a paměť a na chování spojené s úzkostnými stavy [50]. Dále u dospělých samčích potkanů vyvolala strava bohatá na rostlinnou složku anxiolytické účinky, jak vyplynulo z testu úzkosti EPM, oproti jedincům živěným nerostlinnou stravou [51]. Tato zjištění podporují biologické působení fytoestrogenů na mozek a chování [51]. V jiné studii prokázaly fytoestrogeny anxiolytické účinky jak u samčích, tak i u samičích potkanů kmene Long-Evans. Fytoestrogeny navíc snížily tělesnou hmotnost, avšak zvýšily spotřebu potravy a/nebo vody [52].

Závěrem lze konstatovat, že ačkoli je klinických údajů ohledně fytoestrogenů a poruch nálad dosud velice málo, z předložených výzkumů vyplývá, že izoflavony získané z červeného jetele (MF11RCE) prokázaly svůj účinek na zmírnění příznaků úzkosti a deprese u postmenopauzálních žen. V tomto směru je nutno provést více klinických a experimentálních výzkumů.

Střet zájmů

Autoři rukopisu "Snížení postmenopauzálních úzkostně depresivních příznaků po léčbě izoflavony pocházejícími z extraktu červeného jetele" prohlašují, že vylučují jakýkoli střet zájmů.

Poděkování

Tato studie byla podporována společností Melbrosin International, Produktions und Vertriebs GmbH & Co KG, Vídeň, Rakousko a představena volně přístupnou formou na 12. světovém kongresu o menopauze konaném ve španělském Madridu 19.-23. května 2008.

Financování

Tyto studii finančně podporovala společnost Melbrosin International, Produktions und Vertriebs GmbH & Co KG, Vídeň, Rakousko.

Překlad provedla společnost Skřivánek s.r.o. v dubnu roku 2010.

Poznámka korektora českého překladu:

Všude, kde se výše hovoří o MF11RCE, je tím de facto myšlen komerční přípravek menoflavon, který obsahuje právě tuto účinnou látku.

menoflavon 40 obsahuje 40 mg MF11RCE v jedné tobolce a

menoflavon Forte obsahuje 80 mg MF11RCE v jedné tobolce.

Plné znění studie v originále je dostupné na stránkách: www.menoflavon.cz/maturitas-0310.pdf

Reference:

- [1] Wells KB, Stewart A, Hays RD, et al. The functioning and well-being of depressed patients. Results from the Medical Outcomes Study. *JAMA* 1989;262:914–9.
- [2] Kouzis AC, Eaton WW. Emotional disability days: prevalence and predictors. *Am J Public Health* 1994;84:1304–7.
- [3] Kessler RC, McGonagle KA, Swartz M, Blazer DG, Nelson CB. Sex and depression in the National Comorbidity Survey. I: Lifetime prevalence, chronicity and recurrence. *J Affect Disord* 1993;29:85–96.
- [4] Barry KL, Fleming MF, Manwell LB, Copeland LA, Appel S. Prevalence of and factors associated with current and lifetime depression in older adult primary care patients. *Fam Med* 1998;30:366–71.
- [5] Amick 3rd BC, Kawachi I, Coakley EH, Lerner D, Levine S, Colditz GA. Relationship of job strain and iso-strain to health status in a cohort of women in the United States. *Scand J Work Environ Health* 1998;24:54–61.
- [6] Schmidt PJ, Murphy JH, Haq N, Rubinow DR, Danaceau MA. Stressful life events, personal losses, and perimenopause-related depression. *Arch Women Ment Health* 2004;7:19–26.
- [7] Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, et al. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 2003;301:386–9.
- [8] Woods NF, Mariella A, Mitchell ES. Depressed mood symptoms during the menopausal transition: observations from the Seattle Midlife Women's Health Study. *Climacteric* 2006;9:195–203.
- [9] Juang KD, Wang SJ, Lu SR, Lee SJ, Fuh JL. Hot flashes are associated with psychological symptoms of anxiety and depression in peri- and post- but not premenopausal women. *Maturitas* 2005;52:119–26.
- [10] Woods NF, Mariella A, Mitchell ES. Patterns of depressed mood across the menopausal transition: approaches to studying patterns in longitudinal data. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002;81:623–32.
- [11] Woods NF, Smith-DiJulio K, Percival DB, Tao EY, Mariella A, Mitchell ES. Depressed mood during the menopausal transition and early postmenopause: observations from the Seattle Midlife Women's Health Study. *Menopause* 2008;15:223–32.
- [12] Freeman EW, Sammel MD, Lin H, Gracia CR, Kapoor S, Ferdousi T. The role of anxiety and hormonal changes in menopausal hot flashes. *Menopause* 2005;12:258–66.
- [13] Sierra B, Hidalgo LA, Chedraui PA. Measuring climacteric symptoms in an Ecuadorian population with the Greene Climacteric Scale. *Maturitas* 2005;51:236–45.
- [14] Chedraui P, Aguirre W, Hidalgo L, Fayad L. Assessing menopausal symptoms among healthy middle aged women with the Menopause Rating Scale. *Maturitas* 2007;57:271–8.
- [15] Monterrosa A, Blumel JE, Chedraui P. Increased menopausal symptoms among Afro-Colombian women as assessed with the Menopause Rating Scale. *Maturitas* 2008;59:182–90.
- [16] Chedraui P, Hidalgo L, Chavez D, Morocho N, Alvarado M, Huc A. Menopausal symptoms and associated risk factors among postmenopausal women screened for the metabolic syndrome. *Arch Gynecol Obstet* 2007;275:161–8.
- [17] Bhavnani BR, Strickler RC. Menopausal hormone therapy. *J Obstet Gynaecol Can* 2005;27:137–62.
- [18] Castelo-Branco C, Rostro F. Management of menopause. *Minerva Ginecol* 2006;58:137–52.
- [19] Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002;288:321–33.
- [20] Blumel JE, Castelo-Branco C, Chedraui PA, et al. Patients' and clinicians' attitudes after the Women's Health Initiative study. *Menopause* 2004;11:57–61.
- [21] Ettinger B, Grady D, Tosteson AN, Pressman A, Macer JL. Effect of the Women's Health Initiative on women's decisions to discontinue postmenopausal hormone therapy. *Obstet Gynecol* 2003;102:1225–32.
- [22] Lazar Jr F, Costa-Paiva L, Morais SS, Pedro AO, Pinto-Neto AM. The attitude of gynecologists in Sao Paulo, Brazil 3 years after the Women's Health Initiative study. *Maturitas* 2007;56:129–41.
- [23] Nassar AH, Abd Essamad HM, Awwad JT, Khoury NG, Usta IM. Gynecologists' attitudes towards hormone therapy in the post "Women's Health Initiative" study era. *Maturitas* 2005;52:18–25.
- [24] Miksicek RJ. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Mol Pharmacol* 1993;44:37–43.
- [25] Miksicek RJ. Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994;49:153–60.
- [26] Dornstauder E, Jisa E, Unterrieder I, Krenn L, Kubelka W, Jungbauer A. Estrogenic activity of two standardized red clover extracts (Menoflavon) intended for large scale use in hormone replacement therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;78:67–75.
- [27] Simoncini T, Fornari L, Mannella P, et al. Activation of nitric oxide synthesis in human endothelial cells by red clover extracts. *Menopause* 2005;12: 69–77.
- [28] Simoncini T, Garibaldi S, Fu XD, et al. Effects of phytoestrogens derived from red clover on atherogenic adhesion molecules in human endothelial cells. *Menopause* 2008;15:542–50.
- [29] Mueller M, Jungbauer A. Red clover extract: a putative source for simultaneous treatment of menopausal disorders and the metabolic syndrome. *Menopause* 2008;15:1120–31.
- [30] Adaikan PG, Srilatha B, Wheat AJ. Efficacy of red clover isoflavones in the menopausal rabbit model. *Fertil Steril* 2008; In press.
- [31] Imhof M, Gocan A, Reithmayr F, et al. Effects of a red clover extract (MF11RCE) on endometrium and sex hormones in postmenopausal women. *Maturitas* 2006;55:76–81.
- [32] Chedraui P, Hidalgo L, San Miguel G, Morocho N, Ross S. Red clover extract (MF11RCE) supplementation and postmenopausal vaginal and sexual health. *Int J Gynaecol Obstet* 2006;95:296–7.
- [33] Hidalgo LA, Chedraui PA, Morocho N, Ross S, San Miguel G. The effect of red clover isoflavones on menopausal symptoms, lipids and vaginal cytology in menopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Gynecol Endocrinol* 2005;21:257–64.
- [34] Chedraui P, San Miguel G, Hidalgo L, Morocho N, Ross S. Effect of Trifolium pratense-derived isoflavones on the lipid profile of postmenopausal women with increased body mass index. *Gynecol Endocrinol* 2008;24:620–4.
- [35] Coon JT, Pittler MH, Ernst E. Trifolium pratense isoflavones in the treatment of menopausal hot flushes: a systematic review and meta-analysis. *Phytomedicine* 2007;14:153–9.
- [36] Zigmond AS, Snaith PR. The Hospital Anxiety and Depression Scale. *Acta Psychiatr Scand* 1983;67:361–70.
- [37] Zung WWK. A self-rating depression scale. *ArchGenPsychiatry* 1965;12:63–70.
- [38] Craig MC, Murphy DG. Estrogen: effects on normal brain function and neuropsychiatric disorders. *Climacteric* 2007;10:97–104.
- [39] Joffe H, Hall JE, Soares CN, et al. Vasomotor symptoms are associated with depression in perimenopausal women seeking primary care. *Menopause* 2002;9:392–8.
- [40] Chedraui P, Morales B, Hidalgo L. Depression and related risk factors among climacteric women. *Climacteric* 2008;11:125.
- [41] Szoek CE, Cicuttini FM, Guthrie JR, Dennerstein L. The relationship of reports of aches and joint pains to the menopausal transition: a longitudinal study. *Climacteric* 2008;11:55–62.
- [42] Chedraui P, San Miguel G, Avila C. Quality of life impairment during the female menopausal transition: is related to personal and partner factors. *Gynecol Endocrinol; Gynecol Endocrinol* 2009;25:130–5.
- [43] Chedraui P, Blümel JE, Baron G, et al. Impaired quality of life among middle aged women: a multicentre Latin American study. *Maturitas* 2008;61:323–9.
- [44] Bodo C, Rissman EF. New roles for estrogen receptor beta in behavior and neuroendocrinology. *Front Neuroendocrinol* 2006;27:217–32.
- [45] Albert A, Altabre C, Baró F, et al. Efficacy and safety of a phytoestrogen preparation derived from Glycine max (L.) Merr in climacteric symptomatology: a multicentric, open, prospective and non-randomized trial. *Phytomedicine* 2002;9:85–92.
- [46] Chen HQ, Wang XJ, Jin ZY, Xu XM, Zhao JW, Xie ZJ. Protective effect of isoflavones from Trifolium pratense on dopaminergic neurons. *Neurosci Res* 2008;62:123–30.
- [47] Occhiuto F, Zangla G, Samperi S, et al. The phytoestrogenic isoflavones from Trifolium pratense L. (Red clover) protects human cortical neurons from glutamate toxicity. *Phytomedicine* 2008;15:676–82.
- [48] Occhiuto F, Palumbo DR, Samperi S, Zangla G, Pino A, De Pasquale RD, et al. The isoflavones mixture from Trifolium pratense L. protects HCN 1-A neurons from oxidative stress. *Phytother Res* 2008;23:192–6.
- [49] Bu L, Lephart ED. Soy isoflavones modulate the expression of BAD and neuron-specific beta III tubulin in male rat brain. *Neurosci Lett* 2005;385:153–7.
- [50] Lephart ED, Setchell KD, Handa RJ, Lund TD. Behavioral effects of endocrine-disrupting substances: phytoestrogens. *ILAR J* 2004;45:443–54.
- [51] Lephart ED, West TW, Weber KS, et al. Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens. *Neurotoxicol Teratol* 2002;24:5–16.
- [52] Lund TD, Lephart ED. Dietary soy phytoestrogens produce anxiolytic effects in the elevated plus-maze. *Brain Res* 2001;913:180–4