

Stanowisko Zespołu Ekspertów Polskiego Towarzystwa Menopauzy i Andropauzy dotyczące zastosowania preparatów PROMENSIL® i PROMENSIL FORTE® u kobiet w okresie około- i pomenopauzalnym

Zespół Ekspertów Polskiego Towarzystwa Menopauzy i Andropauzy w składzie:

prof. dr hab. Romuald Dębski – Warszawa

prof. dr hab. Tomasz Paszkowski – Lublin

prof. dr hab. Tomasz Pertyński – Łódź

prof. dr hab. Wojciech Zgliczyński – Warszawa

na posiedzeniu w dniu 21.06.2013 r. dokonał szczegółowej analizy piśmiennictwa dotyczącego zastosowania środków spożywczych PROMENSIL® i PROMENSIL FORTE® u kobiet w wieku około- i pomenopauzalnym.

Przeгляд Menopauzalny 2013; 3: 189–193

Po 2002 r. w rezultacie upowszechnienia wyników dużego prospektywnego, badania z randomizacją *Women's Health Initiative* (WHI) częstość stosowania menopauzalnej terapii hormonalnej (MTH) drastycznie się zmniejszyła. Wstępne rezultaty WHI podważyły wyniki wcześniej wykonanych badań obserwacyjnych wskazujących na ochronne działanie estrogenów na układ sercowo-naczyniowy, wykazując jednocześnie podwyższone ryzyko epizodów zatorowo-zakrzepowych oraz rozwoju raka piersi u kobiet stosujących estrogeny w połączeniu z progestagenami [1]. Obawa przed stosowaniem MTH została dodatkowo spotęgowana opublikowaniem wyników badania *Million Women Study* (MWS), które wykazało zwiększone ryzyko rozwoju raka gruczołu piersiowego wśród kobiet stosujących tę terapię [2]. Mimo że wiele spośród wyników badań WHI i MWS nie zostało potwierdzonych w późniejszych analizach o bardziej wiarygodnej metodycy, oba te badania odbiły się szerokim echem w mediach, co spowodowało znaczny spadek zaufania do MTH zarówno ze strony pacjentek, jak i lekarzy. Po opublikowaniu wyników badania WHI w 2002 r. w Stanach Zjednoczonych roczna liczba recept na preparaty dla kobiet w wieku menopauzalnym zawierające estrogeny spadła z 91 milionów w 2001 r. do 57 milionów w 2003 r. [3]. Również w Polsce zanotowano w ostatniej dekadzie znaczny spadek liczby pacjentek otrzymujących systemową MTH. Dzieje się tak mimo tego, że 11 lat po publikacji wyników badania WHI dla ogromnej rzeszy kobiet MTH nadal pozostaje najskuteczniejszym i relatywnie bezpiecznym sposobem likwidacji/łagodzenia objawów zależnego od wieku hipogonadyzmu [4].

Wraz z załamaniem rynku MTH obserwuje się znaczny wzrost zainteresowania rolą fitoestrogenów jako alternatywy dla substytucyjnego leczenia estrogenami kobiet

po menopauzie [5]. Fitoestrogeny stanowią liczną grupę polifenolowych, niesteroidowych substancji pochodzenia roślinnego, strukturalnie przypominających 17 β -estradiol (E₂). Dzięki temu strukturalnemu podobieństwu, substancje te mają zdolność wchodzenia w interakcję z receptorami estrogenowymi (ER α oraz ER β) i wywierania działania agonistycznego bądź antagonistycznego w stosunku do tych receptorów poprzez receptorozależne szlaki sygnalizacyjne [6, 7]. Większość dostępnych dzisiaj produktów pochodzenia roślinnego zarejestrowanych do łagodzenia objawów menopauzalnych zawiera ekstrakty otrzymane z soi, koniczyny czerwonej lub pluskwicy groniastej [8]. Skuteczność tych preparatów zależy od zdolności przemiany zawartych w nich izoflawonoidów do ich aktywnego metabolitu – equolu [7-hydroksy-3-(4'-hydroksyfenyl)-chromanu], którego działanie estrogenne jest znacznie silniejsze od jego prekursorów [9]. Profil farmakokinetyczny izoflawonoidów z koniczyny czerwonej (*red clover izoflavones* – RCI) jest korzystniejszy w porównaniu z izoflawonoidami z ziaren soi, które stężenie maksymalne (T_{max}) osiągają po 6 godz., podczas gdy RCI już po 3 godz. 30 min. Ponadto izoflawonoidy sojowe wykazują okres półtrwania 7,5 godz., co oznacza, że muszą być przyjmowane co najmniej 2 razy dziennie. Dla porównania RCI w produkcie Promensil® mają okres półtrwania wynoszący 17 godz. 20 min, co pozwala na stosowanie tego produktu w jednorazowej dawce dobowej [10, 11].

W preparatach sojowych izoflawonoidy występują w formie nieaktywnych glikozydów (połączonych z resztą cukrową). I tak na przykład, w deklarowanej masie 40 mg izoflawonoidów sojowych zawartych jest 60% aktywnych aglikonów i 40% cukrów. Izoflawonoidy sojowe wymagają enzymatycznej hydrolizy w jelicie z udziałem flory jelitowej [7]. Problemem o potencjalnie istotnym znaczeniu klinicznym jest niska biodostęp-

ność izoflawonoidów uzyskiwanych z ziaren soi. Wykazano, że średnia różnica pomiędzy deklarowaną a rzeczywistą zawartością izoflawonoidów w preparatach sojowych może wynosić nawet 50% [12].

Literatura przedmiotu z ostatniej dekady zawiera wzrastającą liczbę publikacji dotyczących przydatności izoflawonoidów pochodzących z koniczyny czerwonej w łagodzeniu objawów menopauzalnych [13].

Koniczyna czerwona (*Trifolium pratense* L.) jest rośliną z rodziny bobowatych. Występuje w całej Europie, w środkowej Azji oraz północnej Afryce. Uprawiana jest także w Australii i obydwu Amerykach. W Polsce jest rośliną występującą powszechnie. W wyselekcjonowanych odmianach koniczyny czerwonej zawartość izoflawonoidów jest znacząco wyższa niż w soi. W postaci aglikonów znaczenie mają przede wszystkim cztery izoflawonoidy obecne w koniczynie czerwonej, wśród których biochanina A jest prekursorem najsilniejszej genisteiny, a formononetyna – daidzeiny. Występujące w preparatach z czerwonej koniczyny biochanina A i formononetyna nie występują w produktach sojowych [8]. Unikalne działanie obu tych izoflawonoidów obejmuje m.in. rozszerzanie tętnic wieńcowych oraz aktywność antyproliferacyjną w obrębie gruczołu piersiowego i prostaty, a także modulowanie aktywności aromatazy i 5- α -reduktazy za pomocą biochaniny A [14–16]. Formononetyna silniej niż daidzeina działa na zwiększenie wytwarzania osteoblastów. Po spożyciu biochanina A ulega demetylacji do genisteiny, a formononetyna demetylowana jest do daidzeiny, które to związki są następnie metabolizowane do equolu.

Izoflawonoidy z czerwonej koniczyny działają jak selektywne aktywatory receptorów estrogenowych: pobudzają aktywność receptorów estrogenowych β bez stymulacji receptora α .

PROMENSIL® i PROMENSIL FORTE® są to środki spożywcze zawierające standaryzowany ekstrakt z czerwonej koniczyny. Promensil® dostępny jest w dwóch formach:

- **Promensil® Forte** (80 mg bioaktywnych izoflawonoidów),
- **Promensil®** (40 mg bioaktywnych izoflawonoidów).

Ekstrakt z czerwonej koniczyny zawarty w produkcie Promensil® (MF11RCE) jest standaryzowany na wysoką, wynoszącą 40%, zawartość izoflawonoidów (inne dostępne na rynku preparaty zawierają ekstrakty 8-procentowe).

Na 40 mg bioaktywnych izoflawonoidów zawartych w preparacie Promensil® składają się następujące związki:

- biochanina A (26 mg),
- formononetyna (16 mg),
- genisteina (1 mg),
- daidzeina (0,5 mg).

Zawarte w produkcie Promensil® izoflawonoidy w 99,9% występują w formie aktywnych aglikonów (bez reszty cukrowej). Izoflawonoidy zawarte w tym preparacie charakteryzują się wysoką biodostępnością m.in. w związku z faktem, że nie podlegają wstępnej enzymatycznej hydrolizie w jelicie i dostają się do krwiobiegu po zaledwie 15 min od przyjęcia [17].

Literatura przedmiotu zawiera szereg publikacji dostarczających dowodów o wysokim stopniu wiarygodności (IA – badania z randomizacją kontrolowane za pomocą placebo, przeprowadzone metodą podwójnie ślepej próby, czyli *randomised controlled trial* – RCT) dotyczących skuteczności preparatu Promensil® w łagodzeniu objawów menopauzalnych, szczególnie o charakterze wazomotorycznym. Wyniki tych badań zestawiono w tabeli I.

Literatura przedmiotu zawiera niejednoznaczne wyniki badań co do skuteczności preparatu Promen-

Tab. I. Wyniki badań z randomizacją, przeprowadzone metodą podwójnie ślepej próby, kontrolowanych za pomocą placebo nad skutecznością preparatu Promensil® w zakresie redukcji nasilenia objawów menopauzalnych

Badanie	Punkty końcowe badania	Wyniki
Lipovac M. i wsp. 2011 [18]	redukcja nasilenia objawów wazomotorycznych oraz wartości indeksu Kuppermana	stosowanie preparatu Promensil® (80 mg RCI/dobę) przez 90 dni powoduje znamiennej redukcję wartości indeksu Kuppermana o 75,4% oraz istotny spadek częstości występowania uderzeń gorąca i nocnych potów odpowiednio o 73,5% i 72,2%
Van de Weijer P.H.M. i wsp. 2002 [19]	redukcja nasilenia uderzeń gorąca	znamienne spadek nasilenia uderzeń gorąca o 60% po 12 miesiącach przyjmowania preparatu Promensil® (80 mg RCI/dobę)
Hidalgo L.U. i wsp. 2005 [20]	redukcja nasilenia objawów menopauzalnych (indeks Kuppermana)	znamienne obniżenie wartości indeksu Kuppermana o 78% po 90 dniach stosowania preparatu Promensil® (40 mg RCI/dobę)
Jeri A. 2002 [21]	częstość występowania i nasilenie uderzeń gorąca	<ul style="list-style-type: none"> • po 16 tygodniach przyjmowania preparatu Promensil® (40 mg RCI/dobę): • częstość uderzeń gorąca – znamienne spadek o 48,5% • nasilenie uderzeń gorąca – znamienne redukcja o 47%
Del Giorno C. 2010 [22]	nasilenie objawów menopauzalnych (indeks Kuppermana)	po 12 miesiącach przyjmowania preparatu Promensil® (40 mg RCI/dobę) nie stwierdzono znamiennego obniżenia wartości indeksu Kuppermana
Tice J.A. 2003 [23]	częstość występowania uderzeń gorąca	po 12 tygodniach przyjmowania preparatu Promensil® (82 mg RCI/dobę) nie stwierdzono znamiennej redukcji liczby epizodów uderzeń gorąca na dobę

RCI – izoflawonoidy z koniczyny czerwonej (*red clover isoflavones*)

sil® w łagodzeniu menopauzalnych objawów wazomotorycznych. Cztery spośród 6 opisanych w tabeli I RCT wykazały znamiennej redukcję intensywności uderzeń gorąca i nocnych potów po okresie co najmniej 6 tygodni leczenia zarówno dawką 40 mg, jak i 80 mg RCI/dobę. Z kolei w dwóch pozostałych badaniach różnice w nasileniu objawów wazomotorycznych po 3–12 miesiącach przyjmowania RCI były wyraźne, ale okazały się nieistotne statystycznie w odniesieniu do obserwowanych w grupie placebo.

Literatura przedmiotu zawiera dwie metaanalizy wyników prac poświęconych skuteczności izoflawonoidów z koniczyny czerwonej w łagodzeniu objawów menopauzalnych, które zawierają przeciwstawne wnioski. Coon i wsp. [23] stwierdzili znamienne spadek liczby epizodów uderzeń gorąca po zastosowaniu RCI, podczas gdy w analizie zbiorczej Lethaby i wsp. [25] różnica między RCI a placebo nie była znamienne statystycznie. Niespójność wyników badań nad skutecznością RCI zdaje się wynikać z powodów metodologicznych. Wiele z przeprowadzonych na ten temat badań charakteryzowało się zbyt małą liczną populacją badaną. Ponadto w badaniach tych obserwuje się szczególnie zaznaczony efekt placebo (nawet 59% skuteczności), co wynika być może ze specyfiki psychologicznej populacji kobiet zainteresowanych zastosowaniem fitoestrogenów, które charakteryzują się bardziej nasilonymi obawami przed stosowaniem hormonów. Ponadto w niewielu badaniach temu tematowi poświęconych oceniano wpływ dawki RCI na skuteczność terapii. Przegląd literatury wskazuje na trend uzależnienia skuteczności od zawartości RCI w preparacie. Preparaty zawierające 80 mg RCI/dobę szybciej prowadzą do poprawy w zakresie objawów wazomotorycznych aniżeli te zawierające o połowę mniejszą dawkę RCI [23].

Należy podkreślić, że w świetle literatury przedmiotu podawanie izoflawonoidów z koniczyny czerwonej łagodzi objawy menopauzalne po dłuższym okresie kuracji (3–6 tygodni) [19] w porównaniu z systemową terapią hormonalną prowadzoną przy użyciu estrogenów.

Istnieją dowody na skuteczność preparatu Promensil® w redukcji nasilenia objawów pozasomatycznych menopauzy [18]. Po 6 miesiącach stosowania tego produktu stwierdzono znamiennej poprawę w zakresie nastroju depresyjnego i występowania nerwowości lub niepokoju u kobiet pomenopauzalnych.

Opublikowano również dowody na skuteczność izoflawonoidów z koniczyny czerwonej w zakresie poprawy jakości życia seksualnego. Po 8 tygodniach stosowania preparatu Promensil® zaobserwowano istotną poprawę w zakresie indeksu komórkowej dojrzałości pochwy ze znaczącym wzrostem obecności w rozmazie cytohormonalnym komórek warstwy powierzchniowej [20, 26]. Hidalgo i wsp. [20] stwierdzili ponadto znamiennej poprawę po 90 dniach stosowania preparatu Promensil® (80 mg RCI/dobę) w zakresie dolegliwości bólowych podczas

stosunku płciowego, czemu towarzyszyła istotna redukcja nasilenia objawu suchości w pochwie. Prawdopodobnie w rezultacie tych korzystnych zmian pacjentki uczestniczące w tym badaniu obserwowały znamiennej poprawę w zakresie libido. W jednym z badań stwierdzono brak wpływu RCI na jakość życia seksualnego [22].

Literatura przedmiotu zawiera dowody na skuteczność osteoprotekcyjną izoflawonoidów z koniczyny [27, 28]. Atkinson i wsp. [29] zaobserwowali po 12 miesiącach stosowania produktu Promensil® (40 mg RCI/dobę) zmniejszenie utraty składników mineralnych oraz większą gęstość kości w obrębie kręgosłupa lędźwiowego, a także znamiennej wzrost markerów kościotworzenia w porównaniu z grupą otrzymującą placebo. Dowodów na skuteczność osteoprotekcyjną RCI dostarczyło również badanie Clifton-Bligh i wsp. [30], którzy stwierdzili znamiennej (o 4,1%) wzrost gęstości kości bliższego odcinka przedramienia po 6 miesiącach stosowania izoflawonoidów z koniczyny czerwonej. W tym kontekście warto przytoczyć wyniki badań eksperymentalnych wykonanych na modelach zwierzęcych, które wykazały osteoprotekcyjny wpływ RCI [31, 32].

Od wielu lat toczy się debata na temat potencjału kardioprotekcyjnego fitoestrogenów. Najbardziej zachęcające w tym względzie publikacje dotyczą stosowania izoflawonoidów z koniczyny czerwonej [33–35]. Hidalgo i wsp. [20] zaobserwowali znamiennej spadek zawartości trójglicerydów (średnio o 9,3%) po 90 dniach stosowania preparatu Promensil® (80 mg RCI/dobę). W kontekście wpływu suplementacji izoflawonoidami z koniczyny czerwonej na układ sercowo-naczyniowy warto wspomnieć o neutralnym efekcie długotrwałego przyjmowania RCI na wskaźnik masy ciała, a także wartość tkanki tłuszczowej [29, 36].

Przedmiotem wielu kontrowersji jest profil bezpieczeństwa długotrwałej suplementacji fitoestrogenami, szczególnie pochodzenia sojowego, oraz izoflawonoidami z pluskwicy groniastej (*Cimicifuga racemosa*). Dostępne wyniki badań dotyczące profilu bezpieczeństwa stosowania izoflawonoidów z koniczyny czerwonej dostarczają zachęcających wniosków. W tabeli II przedstawiono wyniki prac dotyczące wpływu długotrwałego stosowania preparatu Promensil® na gruczoł piersiowy.

Oba badania cytowane w tabeli II wykazały brak wpływu długotrwałego stosowania tego preparatu na gęstość mammograficzną piersi. Szczególne znaczenie kliniczne ma badanie Powlesa i wsp. [37], które wykonano w populacji kobiet o zwiększonym ryzyku raka piersi (obciążenie wywiadu rodzinnego wystąpieniem raka piersi u krewnego pierwszego stopnia). Warto w tym kontekście przytoczyć wyniki badania Ingrama i wsp. [38], które wykazały redukcję częstości występowania cyklicznej mastalgii o 44% już po krótkotrwałym okresie stosowania RCI. Badania *in vitro* wykazały wpływ produktu Promensil® na hamowanie procesu nowotworzenia w linii komórek nowotworowych sutka

Tab. II. Badania z randomizacją, przeprowadzone metodą podwójnie ślepej próby, kontrolowane za pomocą placebo nad wpływem preparatu Promensil® na gęstość mammograficzną piersi

Badanie	Wyniki
Powles T. i wsp. 2008 [37]	długotrwała kuracja (3 lata) preparatem Promensil® (40 mg RCI/dobę) nie powoduje wzrostu gęstości mammograficznej w populacji zwiększonego ryzyka raka piersi
Atkinson C. i wsp. 2004 [36]	roczna kuracja preparatem Promensil® (40 mg RCI/dobę) nie powoduje wzrostu gęstości mammograficznej u pacjentek z populacyjnym poziomem ryzyka wystąpienia raka piersi

RCI – izoflawonoidy z koniczyny czerwonej (*red clover isoflavones*)

w obecności estrogenów, poprzez zmiany w rearanżacji cytoszkieletu i aktywności kinazy MAP [39].

W literaturze przedmiotu znaleźć można trzy prace przedstawiające wyniki badań nad wpływem preparatu Promensil® na endometrium. Wyniki tych badań zestawiono w tabeli III.

Przedstawione w tabeli III badania w sposób pośredni wskazują na brak aktywności proliferacyjnej w odniesieniu do endometrium izoflawonoidów zawartych w preparacie Promensil®. Spostrzeżenie to potwierdza wynik metaanalizy opublikowanej w bazie Cochrane w 2007 r., w myśl której stosowanie RCI przez okres 2 lat nie skutkuje stymulacją estrogenną endometrium [25]. Wyniki te sugerują brak konieczności monitorowania ultrasonograficznego stanu endometrium u pomenopauzalnych pacjentek suplementowanych przy użyciu RCI w zakresie dawek 40–80 mg/dobę.

Należy podkreślić, że jednoznaczne określenie bezpieczeństwa onkologicznego stosowania RCI nie jest obecnie możliwe i wymaga przeprowadzenia długotrwałych badań obserwacyjnych z punktami końcowymi w postaci oceny zapadalności na nowotwory estrogenozależne w populacji kobiet stosujących fitoestrogeny w porównaniu z placebo. Wyniki badań przedstawionych w tabelach II i III należy traktować jako dowody pośrednie na bezpieczeństwo onkologiczne RCI.

Przyjmowanie izoflawonoidów z koniczyny czerwonej charakteryzuje się dobrym profilem tolerancji i niewielkim ryzykiem wystąpienia niegroźnych objawów niepożądanych. Najczęstszymi tego typu objawami notowanymi rzadko lub bardzo rzadko podczas przyjmowania preparatu Promensil® są: zgaga, bóle brzucha, nudności lub wzdęcia. Dolegliwości te występują z częstotnością nieznamienne większą w porównaniu z podaniem placebo [36].

Przegląd dostępnej literatury przedmiotu poświęconej skuteczności, bezpieczeństwu i tolerancji stosowania izoflawonoidów z koniczyny czerwonej zawartych w preparatach Promensil® i Promensil Forte® wskazują na konieczność kontynuowania badań szczególnie w zakresie efektywności stosowania RCI w łagodzeniu objawów menopauzalnych. Badania takie jednoznacznie określą miejsce preparatów zawierających izoflawonoidy z koniczyny czerwonej w medycynie menopauzy. W chwili obecnej dostępne są badania o wysokim poziomie wiarygodności wyników wskazujące na skuteczność tych produktów, jakkolwiek są też badania wskazujące na brak skuteczności, szczególnie dawki 40 mg RCI/dobę.

Preparaty Promensil® wyróżniają się spośród bardzo wielu dostępnych na naszym rynku produktów fitoestrogenowych korzystnym poziomem standaryzacji substancji czynnych, dokładnym zdefiniowaniem ich charakteru i dawek oraz wysoką ich biodostępnością. Mają też dobrze udokumentowany korzystny profil bezpieczeństwa i tolerancji długotrwałego ich stosowania. Na podkreślenie zasługuje fakt relatywnie dużej ilości badań na wysokim poziomie wiarygodności dowodów poświęconych zastosowaniu tego produktu u kobiet w okresie menopauzy.

W świetle obecnego stanu wiedzy na temat relacji potencjalnych korzyści do ryzyka stosowania produktu Promensil® wydaje się, iż warto rozważyć jego zastosowanie (szczególnie z dawką 80 mg RCI/dobę) u kobiet, których jakość życia uległa istotnemu pogorszeniu z powodu objawów związanych z menopauzą, a które nie mogą lub nie chcą stosować hormonalnej terapii menopauzalnej opartej na podawaniu systemowym estrogenów i/lub progestagenów.

Tabela III. Badania z randomizacją, przeprowadzone metodą podwójnie ślepej próby, kontrolowane za pomocą placebo nad wpływem preparatu Promensil® na błonę śluzową jamy macicy w ocenie ultrasonograficznej

Badanie	Wyniki
Imhof M. i wsp. 2006 [40]	po 3 miesiącach przyjmowania preparatu Promensil® (80 mg RCI/dobę) zniżej się (o 14,7%) wysokość endometrium
Baber R. i wsp. 1999 [41]	po 12 tygodniach przyjmowania preparatu Promensil® (40 mg RCI/dobę) nie zaobserwowano zmiany w zakresie wysokości endometrium
Woods R. i wsp. 2003 [26]	po 8 tygodniach stosowania preparatu Promensil® (80 mg RCI/dobę) nie obserwuje się zmian w zakresie wysokości endometrium oraz indeksu pulsacji w tętnicy macyjnej

RCI – izoflawonoidy z koniczyny czerwonej (*red clover isoflavones*)

Piśmiennictwo

- 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.
- Beral V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 2003; 362: 419-27.
- Hersch AL, Stefanick ML, Stafford RS. National use of postmenopausal hormone therapy: annual trends and response to recent evidence. *JAMA* 2004; 291: 47-53.
- De Villiers TJ, Gass MLS, Haines CJ, et al. Global consensus statement on menopausal hormonal therapy. *Climacteric* 2013; 16: 203-204.
- Nachtigall LE, Baber RJ, Barentsen R, et al. Complementary and hormonal therapy for vasomotor symptom relief: a conservative clinical approach. *J Obstet Gynaecol Can* 2006; 28: 279-89.
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 1998; 139: 4252-63.
- Miksicsek RJ. Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994; 49: 153-60.
- Czerpak R, Pietryczuk A, Jabłońska-Trypuć A i wsp. Aktywność biologiczna izoflawonoidów i ich znaczenie terapeutyczne i kosmetyczne. *Postępy Fitoterapii* 2009; 2: 113-21.
- Setchell KD, Brown NM, Lydeking-Olsen E. The clinical importance of the metabolite equol – a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr* 2002; 132: 3577-84.
- Howes J, Waring M, Huang L, Howes LG. Long-term pharmacokinetics of an extract of isoflavones from red clover (*Trifolium pratense*). *J Alter Compl Med* 2002; 8: 135-42.
- Watanabe S, Yamaguchi M, Sobue T, et al. Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *J Nutr* 1998; 128: 1710-15.
- Clarke DB, Bailey V, Lloyd AS. Determination of phytoestrogens in dietary supplements by LC-MS/MS. *Food Addit Contamin* 2008; 25: 534-47.
- Panay N. Taking an integrated approach: managing women with phytoestrogens. *Climacteric* 2011; 14 Suppl 2: 8-12.
- Lee KH, Choi EM. Biochanin A stimulates osteoblastic differentiation and inhibits hydrogen peroxide-induced production of inflammatory mediators in MC3T3-E1 cells. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 1948-53.
- Mannella P Tosi V, Russo E, et al. Effects of red clover extracts on breast cancer cell migration and invasion. *Gynecol Endocrinol* 2012; 28: 29-33.
- Schrepfer S, Deuse T, Münzel T, et al. The selective estrogen receptor-beta agonist biochanin A shows vasculoprotective effects without uterotropic activity. *Menopause* 2006; 13: 489-99.
- Promensil – a clinical summary. *Clinician's Guide*, Novogen 2009.
- Lipovac M, Chedraui P, Gruenhut C, et al. Improvement of post menopausal depressive and anxiety symptoms after treatment with isoflavones derived from red clover extracts. *Maturitas* 2010; 65: 258-61.
- Van de Weijer PH, Barentsen R. Isoflavones from red clover (Promensil) significantly reduce menopausal hot flush symptoms compared to placebo. *Maturitas* 2002; 42: 187-93.
- Hidalgo LU, Chedraui PA, Morocho N, et al. The effect of red clover isoflavones on menopausal symptoms, lipids and vaginal cytology in menopausal women: A randomised double blind, placebo controlled study. *Gynecol Endocrinol* 2005; 21: 257-64.
- Jeri A. The use of an isoflavone supplement to relieve hot flushes. *Female Patient* 2002; 27: 35-37.
- Del Giorno C, Da Fonseca AM, Bagnoli VR, et al. Effects of trifolium pratense on climacteric and sexual symptoms in postmenopausal women. *Rev Assoc Med Bras* 2010; 56: 558-62.
- Tice JA, Ettinger B, Ensrud K, et al. Phytoestrogen supplements for the treatment of hot flashes: the Isoflavone Clover Extract (ICE) Study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003; 290: 207-14.
- 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.
- Lethaby AE, Brown J, Marjoribanks J, et al. Phytoestrogens for vasomotor menopausal symptoms. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; 17(4): CD001395.
- Woods R, Colville N, Blazquez J, et al. Effects of red clover isoflavones (Promensil) versus placebo on uterine endometrium, vaginal maturation index and the uterine artery in healthy postmenopausal women. *J Br Menopause Soc* 2003; Suppl S2: 23.
- Gautam AK, Bhargavan B, Tyagi AM, et al. Differential effects of formononetin and cladrin on osteoblast function, peak bone mass achievement and bioavailability in rats. *J Nutr Biochem* 2011; 22: 318-27.
- Occhiuto F, Pasquale RD, Guglielmo G, et al. Effects of phytoestrogenic isoflavones from red clover (*Trifolium pratense* L) on experimental osteoporosis. *Phytother Res* 2007; 21: 130-4.
- Atkinson C, Compston JE, Day NE, et al. The effects of phytoestrogen isoflavones on bone density in women: a double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 326-33.
- Clifton-Bligh PB, Baber RJ, Fulcher GR, et al. The effect of isoflavones extracted from red clover (*Rimostil*) on lipid and bone metabolism. *Menopause* 2001; 8: 259-65.
- Kaczmarczyk-Sedlak I, Wojnar W, Zych M, et al. Effect of formononetin on mechanical properties and chemical composition of bones in rats with ovariectomy-induced osteoporosis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013; Article ID 457052.
- Shu-Jem Su, Yao-Tsung Yeh, Huey-Wen Shyu. The preventive effect of biochanin A on bone loss in ovariectomized rats: involvement of growth and activity of osteoblasts and osteoclasts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013; Article ID 594857.
- Chedraui P, San Miguel G, Hidalgo L, et al. Effect of trifolium pratense-derived isoflavones on the lipid profile of postmenopausal women with increased body mass index. *Gynecol Endocrinol* 2008; 24: 620-24.
- Teede HJ, McGrath BP, DeSilva L, et al. Isoflavones reduce arterial stiffness: a placebo-controlled study in men and postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 1: 1066-71.
- Terzic MM, Dotlic J, Maricic S, et al. Influence of red clover-derived isoflavones on serum lipid profile in postmenopausal women. *J Obstet Gynaecol Res* 2009; 35: 1091-5.
- Atkinson C, et al. Red clover-derived isoflavones and mammographic breast density; a double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Breast Cancer Res* 2004; 6(3): 170-9.
- Powles T, Howell A, Evans DG, et al. Red clover isoflavones are safe and well tolerated in women with a family history of breast cancer. *Menopause Int* 2008; 14: 6-12.
- Ingram D, Hickling C, West L, et al. A double-blind randomized controlled trial of isoflavones in the treatment of cyclical mastalgia. *Breast* 2002; 11: 170-4.
- Manella P, Tosi V, Russo E, et al. Effects of red clover extracts on breast cancer cell migration and invasion. *Gynecol Endocrinol* 2012; 28: 29-33.
- Imhof M, Gocan A, Reithmayr F, et al. Effects of a red clover extract (MF11RCE) on endometrium and sex hormones in post-menopausal women. *Maturitas* 2006; 55: 76-81.
- Baber RJ, Templeman C, Morton T, et al. Randomized placebo-controlled trial of an isoflavone supplement and menopausal symptoms in women. *Climacteric* 1999; 2: 85-92.