

Ženské zdravie a mikrobióm

Cielená kombinácia prospešnej baktérie *Lacticaseibacillus rhamnosus* CA15, rastlinných extraktov zo šafranu a olivových listov, vitamínu B3 a B7.



Cielená kombinácia prospešnej baktérie *Lacticaseibacillus rhamnosus* CA15, rastlinných extraktov zo šafranu a olivových listov, vitamínu B3 a B7

Kombinácia probiotickej baktérie *Lacticaseibacillus rhamnosus* CA15 (CA15), rastlinných extraktov zo šafranu a olivových listov, vitamínu B3 a B7 bola vybraná na základe ich vedecky preukázaných pozitívnych účinkov na obnovenie a udržanie rovnováhy vaginálnej mikrobioty ako aj manažmente symptómov spojených s PMS či menopauzou.



KLINICKÁ ŠTÚDIA

- 30 dňová
- randomizovaná
- dvojito zaslepená
- placebom kontrolovaná
- na súbore 60 žien s príznakmi a symptómami vaginálnej dysbiózy

Perorálna konzumácia probiotického kmeňa *L. rhamnosus* CA15 v štúdiu znamenala významné zlepšenie klinických príznakov a symptómov nielen 10 dní po začiatku liečby (T1), ale aj 30 dní po ukončení liečby (T2).

Úvod

Vaginálna mikrobiota (VM) je dynamický ekosystém pozostávajúci z baktérií, vírusov, archeí, húb a prvokov (1, 2). Za fyziologických podmienok hrá VM kľúčovú úlohu v zdraví žien ako obranca pred patogénnymi mikroorganizmami. Všeobecne sa uvádza, že u zdravých žien v reprodukčnom veku vo vyváženej VM dominujú laktobacily (3).

Laktobacily produkujú metabolitov (napr. kyseliny mliečnej), antimikrobiálnych látok, ako sú bakteriocíny a peroxid vodíka, a interakciou s vrodenným imunitným systémom hostiteľky môžu chrániť vaginálnu sliznicu pred potenciálne škodlivými mikroorganizmami (4). V prípade VM nedominantného laktobacilu sa uvádza vysoké rizi-

ko nepriaznivých zdravotných výsledkov. Zníženie alebo strata laktobacilov je spojená najmä s vaginálnymi infekciami, ako je bakteriálnavaginóza (BV), vulvovaginálna kandidóza (VVK), zmiešaná vaginitída, sexuálne prenosná infekcia (SPI) a spontánny predčasný pôrod (1–3).

Štandardná liečba BV zahŕňa použitie metronidazolu (topického alebo perorálneho) alebo klindamycínu (topického) (4), zatiaľ čo polyény (napr. nystatín) a azoly sa zvyčajne podávajú v prípade VVK (5).

Bohužiaľ, antibiotiká a antimykotiká nie sú vždy účinné, pretože mikroorganizmy zodpovedné za BV a VVK môžu odolávať vytváraním biofilmov alebo získaním rezistencie (6, 7). Okrem toho antibiotiká, ktoré selektívne nepôsobia proti patogénom, môžu negatívne ovplyvniť endogénne laktobacily a následne potenciálne podporovať recidívu BV a VVK (8). Na základe týchto dôkazov sú potrebné alternatívne stratégie na vyváženie VM a udržanie zdravého vaginálneho ekosystému. Údaje z klinických štúdií a metaanalýz naznačujú, že probiotiká môžu zohrávať pozitívnu úlohu pri liečbe vaginálnej dysbiózy (9–11).

Súčasná randomizovaná dvojito zaslepená placebo kontrolovaná štúdia sa uskutočnila na vyhodnotenie účinnosti potenciálneho probiotického kmeňa *L. rhamnosus* CA15, perorálne podávaného, na liečbu vaginálnej dysbiózy. Podľa toho sa hodnotili klinické parametre a subjektívne vaginálne symptómy žien.

Metodika

Do štúdie bolo zaradených 60 zdravých žien v reprodukčnom veku (18–45 rokov) s vaginálnymi príznakmi a príznakmi vaginálnych infekcií, potvrdenými klinickými a mikrobiologickými analýzami.

Pacientky zaradené do aktívnej skupiny užívali 1 perorálnu kapsulu počas 10 po sebe nasledujúcich dní. Každá aktívna kapsula obsahovala 10×10^9 CFU/g probiotického kmeňa *L. rhamnosus* CA15. Placebo pozostávalo z identickej kapsuly obsahujúcej kukuričný škrob ako pomocnú látku. Vyšetrenia každej ženy boli naplánované v troch termínoch: základná línia (T0), 10 dní po začiatku liečby (T1) a 30 dní po ukončení liečby (T2).

Okrem toho sa kvalita života hodnotila prostredníctvom dotazníka WHO na hodnotenie kvality života na začiatku liečby (T0) a 30 dní po ukončení liečby (T2).

Výsledky

Diagnostické parametre

Výsledky klinických príznakov a symptómov zaznamenaných v časoch odberu vzoriek T0, T1 a T2 sú znázornené na **Obr. 1** (panely A a B).

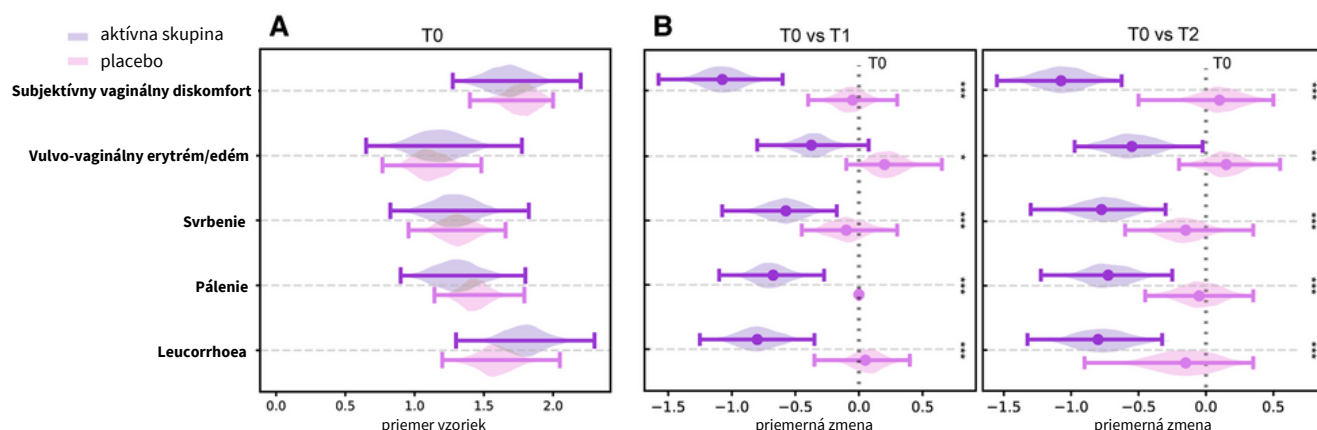
V porovnaní s východiskovou hodnotou (T0) bolo hlásené štatisticky významné zníženie skóre súvisiaceho so symptómami, ktoré ženy hlásili samy v aktívnej skupine 10 dní po začiatku liečby (T0 vs. T1). V podstate nezmenené výsledky sa získali 30 dní po ukončení liečby (T0 vs. T2).

Na druhej strane, skóre zaznamenané v skupine s placebo v časoch odberu vzoriek T1 aj T2 bolo oveľa bližšie k skóre pozorovaným v T0 a nebolo štatisticky významné (**Obr. 1B**).

Okrem toho, v aktívnej skupine sa zistilo významné zníženie skóre Nugent v časoch odberu vzoriek T1 aj T2. Zaujímavejšie je, že v čase odberu vzoriek T2 všetky účastníčky zaradené do aktívnej skupiny vykazovali Nugent skóre medzi 0 a 3. Skóre tejto skupiny vždy viedlo k negatívnej korelácii v priebehu času. Skóre skupiny s placebo nekorelovalo, pretože u nich došlo len k miernemu a nie významnému kolísaniu v T1.

Zloženie bakteriálnej bioty podľa počtu mikroorganizmov

Celkovo na začiatku (T0) u všetkých účastníčok v aktívnej aj placebo skupine dominovali baktérie s potenciálne nevyváženými patogénnymi mikroorganizmami so zníženou hustotou mikrobunkových buniek. V aktívnej skupine perorálne podávanie kmeňa CA15 počas 10 dní (T1) štatisticky významne znížilo počet skúmaných patogénov. Naopak, bolo zistené významné zvýšenie počtu laktobacilov o približne 4 log jednotky. Tridsať dní po ukončení liečby (T2) boli zloženia vaginálnej mikrobioty celkom stabilné a podobné tým, ktoré sa pozorovali v čase odberu vzoriek T1. V skutočnosti sa pri porovnaní údajov získaných v časoch odberu vzo-



Obr. 1: Vnímanie klinických príznakov. Distribúcia bootstrapped stredných hodnôt sa vzťahovala na skóre získané hodnotením intenzity klinických príznakov a symptómov v T0 v oboch skupinách (panel A). Rozdiely v distribúcii stredných hodnôt T1 a T2 v porovnaní s T0 v dvoch rôznych skupinách (Panel B). * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$ (upravené podľa Rapisarda a kol., 2023).

riek T1 a T2 nezistili žiadne významné rozdiely v zložení bakteriálnej bioty, čo naznačuje, že vyvážený stav dosiahnutý v čase T1 nebol narušený. Odlišné správanie bolo zistené v placebo skupine, v ktorej neboli zistené žiadne štatisticky významné rozdiely v zložení bakteriálnej bioty. Počas celej štúdie bol zistený vysoký počet potenciálne patogénnych baktérií a nízka bunková hustota laktobacilov.

Záver

Perorálna konzumácia kmeňa *L. rhamnosus* CA15 znamenala významné zlepšenie klinických príznakov a symptómov nielen 10 dní po začiatku liečby (T1), ale aj 30 dní po ukončení liečby (T2). Kmeň CA15 bol bezpečným a účinným prístupom na obnovenie a udržanie vyváženej vaginálnej mikrobioty.

IN VITRO ŠTÚDIE

1) Antagonistická aktivita proti patogénom

Antagonistická aktivita proti patogénom, ktorých prítomnosť je často spojená s rôznymi dysbiózami urogenitálneho traktu bola hodnotená agarovým bodovým testom. Kmeň *L. rhamnosus* CA15 vykazoval celkovo široké spektrum antagonistickej aktivity, pričom najvyššia antimikrobiálna aktivita bola preukázaná proti *Candida albicans* ATCC10231, *Candida krusei* ATCC 14243, *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 a *Streptococcus agalactiae* DSM 2134. Na základe ošetrení CFS bola antagonistická aktivita vo všetkých prípadoch pripísaná produkcii organických kyselín.

Úvod

Bakteriálna vaginóza postihuje **23-29 % žien v reprodukčnom veku**. Odhaduje sa, že viac ako 75 % žien zažije aspoň jednu epizódu vulvovaginálnej kandidózy počas svojho života a že **opakované epizódy** sú veľmi časté (12).

Za účelom študovania účinku CA15 na vaginálnu dysbiózu a vaginálne nepohodlie sa ukázalo, že CA15 širokospektrálne **inhibuje adhéziu a proliferáciu patogénov**, vrátane húb (t.j. *Candida spp.*) a baktérií. Okrem toho CA15 môže **inhibovať tvorbu biofilmu** *Candida spp.* prostredníctvom vytiesňovania a súťaženia o živiny.

Aby sa zaručilo, že sa CA15 dostane do vaginálneho traktu, tento kmeň bol testovaný *in vitro* a preukázalo sa, že **prežije prechod GI traktom** a priľne k bunkovým líniam črevného muskula, líniam vaginálnych (VK2/E67) a črevných (Caco-2) buniek (13). Medzi ďalšie prínosy CA15 pre zdravie žien patria jeho **protizápalové a antioxidačné aktivity**. CA15 **znižuje prozápalové cytokíny IL-6 a zvyšuje cytokín adaptívnej imunity IL-2**.

2) Antiadhézná aktivita proti biofilmom rôznych druhov Candida

Antiadhézná aktivita kmeňom *L. rhamnosus* CA15 bola preukázaná v testoch predbežného potažovania a spoločnej inkubácie. Percento antiadhézie sa pohybovalo od 87 % do 50,1 % a od 48,4 % do 20,1 % v testoch predbežného potažovania a koinkubácie. Podrobne, v teste predbežného potažovania bola preukázaná antiadhézná aktivita proti *C. glabrata* (87 %) a *C. albicans* (84,6 %), po ktorej nasledovali *C. parapsilosis* (75,7 %), *C. tropicalis* (71,6 %) a *C. krusei* (50,1 %). V koinkubačnej skúške bola najvyššia antiadhézná aktivita preukázaná proti *C. tropicalis* so 48,4 % znížením tvorby biofilmu.

3) Prežitie v podmienkach gastrointestinálneho traktu in vitro

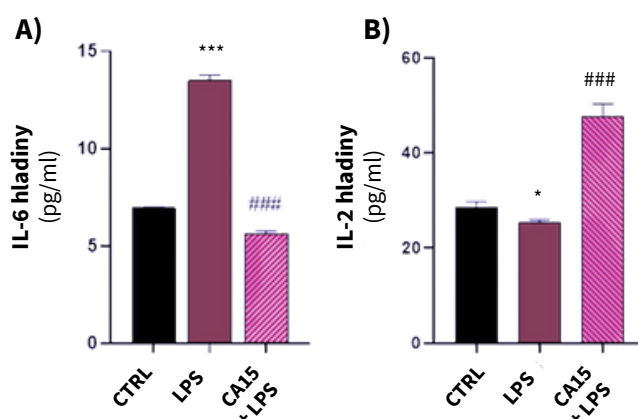
In vitro bola hodnotená tolerancia na lyzozým, kyslé podmienky a žlčové soli, ako aj schopnosť prežiť počas simulovaného gastrointestinálneho (GI) tranzitu. Celkovo kmeň *L. rhamnosus* CA15 preukázal schopnosť prežiť v testovaných stresových podmienkach s mierou prežitia (MP) vyššou ako 80 %. Podrobne, kmeň *L. rhamnosus* CA15 bol schopný prežiť v kyslých podmienkach (pH 2,0 a 3,0) po 2 aj 4 hodinách inkubácie. Pokiaľ ide o toleranciu voči lyzozýmu, kmeň CA15 bol klasifikovaný ako rezistentný na lyzozým (14), pretože vykazoval MP 95 % a 93 % po 30 a 120 minútach inkubácie. Tolerancia 0,5 % aj 1 % solí hovädzej žlče, s MP vyššou ako 80 %, bola zaznamenaná po 2 hodinách, resp. 4 h inkubácie. MP vyššia ako 90 % bola pozorovaná po ošetrovaní simulovanou žalúdočnou šťavou a simulovanou črevnou tekutinou. Vychádzajúc z počiatočného počtu životaschopných buniek 9,13 log CFU/ml, kmeň *L. rhamnosus* CA15 vykazoval 9,10 log CFU/ml životaschopných buniek po ošetrovaní simulovanou žalúdočnou šťavou a 8,74 log CFU/ml po ošetrovaní simulovanou črevnou tekutinou.

4) In vitro antioxidačné a protizápalové aktivity a schopnosť adhézie na Caco-2 a ľudské vaginálne epiteliálne bunky

v bunkových líniiach Caco-2 ošetrovaných LPS po ošetrovaní filtrátom kultúry kmeňa CA15 sa zistilo významné zníženie hladín IL-6, čo naznačuje schopnosť kme-

ňa znižovať oxidačný stres aj zápal (**Obr. 2A**). Naopak, ošetrovanie bunkových línii Caco-2 ošetrovaných LPS filtrátom kultúry kmeňa CA15 bolo schopné vyvolať zvýšenie hladín IL-2 (**Obr. 2B**).

Kmeň CA15 ďalej vykazoval i protizápalovú aktivitu v diferencovaných ľudských makrofágoch liečených LPS. Podrobne, v porovnaní s neošetrovanými bunkami, ošetrovanie kmeňom CA15 kultivačný filtrát určil downreguláciu génov COX-2 aj IL-8, zatiaľ čo gén IL-10 bol upregulovaný. Okrem toho testovaný kmeň vykazoval väzbovú schopnosť k bunkovým líniiam Caco-2 aj ľudským vaginálnym epiteliálnym bunkovým líniiam (VK2/E6E7) s mierami 36,15 % $\pm$ 0,32 a 34,71 % $\pm$ 0,09, v danom poradí.



Obr. 2: Meranie hladín IL-6 a IL-2 v bunkových supernatantoch pomocou ELISA (* $p < 0,05$, *** $p < 0,0005$ vs. CTRL; a ### $p < 0,0005$ vs. LPS). (upravené podľa Pino a kol., 2022)

OLIVOVÉ POLYFENOLY A MENOPAUZA

Je známe, že vaginálne pH sa v priebehu života ženy značne mení. Hnacou silou variácie pH sú **estrogén, glykogén a laktobacily**. V aktívnom veku ženy, sa hladina estrogénu začne zvyšovať s funkciou vaječníkov – pošvový epitel zhutne a naplní sa glykogénom, ktorý endogénnou degradáciou poskytne pH blízke 5. Pokiaľ sú narušené hladiny estrogénov, epitel stráca glykogén, čím môže dochádzať k narušeniu rovnováhy pH a vzniku vaginálnej dysbiózy (15,16).

Menopauza znamená ukončenie reprodukčnej fázy ženy, ktorá je poháňaná znížením produkcie ováriál-

nych hormónov, ako je estrogén. Často ju sprevádza celý rad nielen fyzických ale aj psychických symptómov, ktoré ovplyvňujú celkové zdravie a kvalitu života, ako sú návaly horúčavy, poruchy spánku, únava, suchá pokožka a znížené libido.

S pribúdajúcim vekom sa rovnováha medzi tvorbou kostí a kostným obratom negatívne posúva. Tento problém sa ešte viac zrýchľuje u žien práve v dôsledku menopauzy. Najnižší výskyt osteoporózy v Európe sa pozoruje v oblasti Stredozemného mora, pravdepodobne vďaka obvykle vysokej spotrebe olivových polyfenolov (OP). Aktívnou a hlavnou zložkou OP je oleuropeín s hydroxytyrozolom a tyrozolom. Oleuropeín má aromatický kruh, ktorý je podobný estrogénu, a preto sa môže viazať na väzbové miesta na β -receptoch estrogénu.

Jeho účinok pri menopauze bol študovaný v 12-mesačnej intervennej intervenčnej štúdii s dvoma paralelnými skupinami u 64 žien po menopauze. Skupina s placebom dostávala 1 g Ca denne a liečebná skupina 250 mg extraktu z olivových listov a 1 g vápnika denne. Primárnym cieľom bolo preskúmať jeho účinok na kostný obrat u žien po menopauze so zníženou kostnou hmotou. Sekundárnym cieľom bolo skúmať účinok na minerálnu hustotu kostí a profily lipidov v sére v rovnakej kohorte.

Výsledky

1) Kostný obrat

Pozoroval sa významný účinok v primárnom koncovom ukazovateli, t.j. hladinách osteokalcínu. 32% zvýšenie hladiny osteokalcínu bolo pozorované v liečenej skupine po 12 mesiacoch suplementácie extraktu z olivových listov v porovnaní s placebom (**Obr. 3**). V rovnakom čase sa osteokalcín znížil o 6 % v porovnaní s placebom.

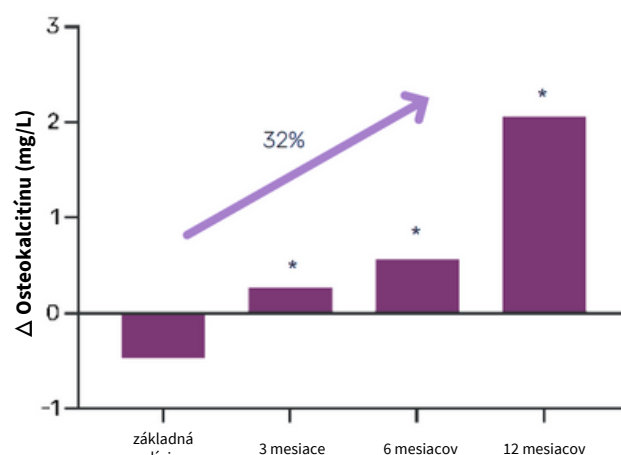
Rovnako sa pomer kostnej rovnováhy (OC/CTX) významne znížil v skupine s placebom, zatiaľ čo v aktívnej skupine sa nepozorovala žiadna významná zmena. OC/CTX je relevantným ukazovateľom rovnováhy kostného obratu. Jeho pokles naznačuje vyššiu aktivitu kostnej resorpcie.

Zlepšený pomer kostnej rovnováhy sa prejavuje aj meraním DEXA. Konkrétne, po 12 mesiacoch sa BMD

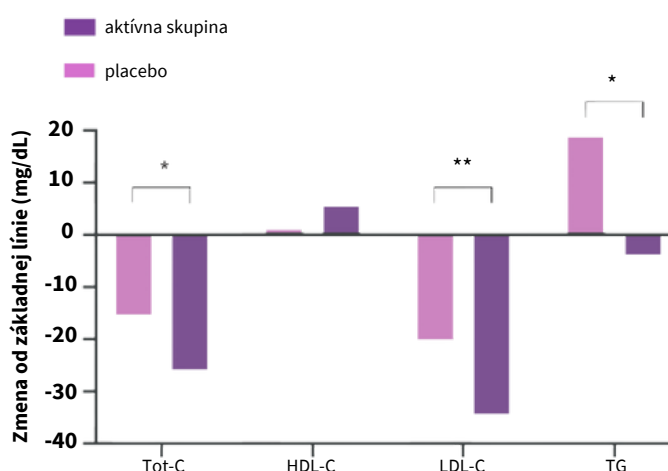
v krčnej a lumbálnej chrbtici znížila v skupine s placebom, pričom zostáva stabilný v aktívnej skupine.

2) Krvný lipidový profil

Hladiny lipidov v sére sa zlepšili v aktívnej skupine v porovnaní s východiskovou hodnotou po 12 mesiacoch (**Obr. 4**). Významný účinok bol pozorovaný pre celkový cholesterol, LDL cholesterol a triglyceridy. Celkový cholesterol sa znížil o 11% v aktívnej skupine a bol významne nižší v porovnaní so skupinou s placebom. LDL-cholesterol sa znížil o 21% v aktívnej skupine a bol významne nižší v porovnaní so skupinou s placebom. Okrem toho sa v aktívnej skupine hladiny triglyceridov znížili o 4%, zatiaľ čo v skupine s placebom sa zvýšili o 15%.



Obr. 3: 32% rozdiel v hladinách osteokalcínu v krvi medzi intervenčnou a placebovou skupinou počas 12-mesačného obdobia; *významný rozdiel medzi časovými bodmi $p < 0,05$ (upravené podľa Filip a kol., 2015).



Obr. 4: Relatívna zmena hladín lipidov v krvi po 12 mesiacoch; *významný rozdiel medzi skupinami $p = 0,01$; ** $p = 0,02$ (upravené podľa Filip a kol., 2015).

Výsledky

Klinické štúdie ukázali, že extrakt z olivových listov môže zvýšiť hladiny osteokalcínu, zmierniť bolesti kĺbov a zlepšiť profil krvných lipidov a ponúka prirodzenú a neestrogénnu alternatívu na zvládnutie postmenopauzálnych symptómov, čím zlepšuje kvalitu života žien po menopauze.

EXTRAKT ZO ŠAFRANU

A PMS

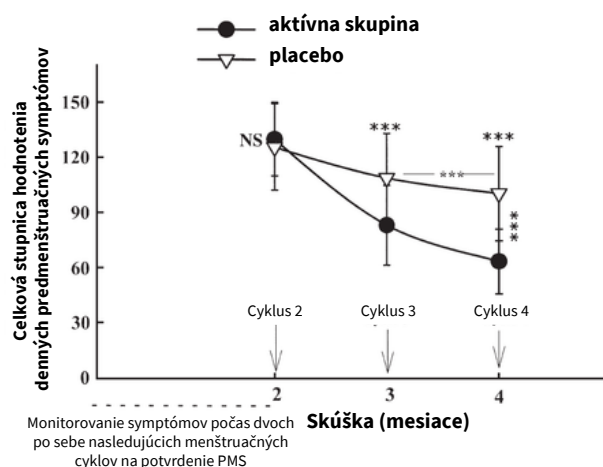
Predmenštruačný syndróm (PMS) patrí k najčastejším zdravotným problémom u žien a postihuje 20–40% žien v reprodukčnom veku. Je to skupina chronických a cyklických porúch súvisiacich s menštruáciou charakterizovaných emocionálnymi, behaviorálnymi a fyzickými symptómami v druhej polovici (luteálnej fáze) menštruačného cyklu (18). Existuje množstvo dôkazov poukazujúcich na zmeny v serotonergnej vodivosti v centrálnom nervovom systéme pri PMS. Predpokladá sa teda, že PMS je čiastočne spojený s narušenou serotonergnou vodivosťou. Túto možnosť potvrdzuje pozitívny terapeutický účinok sérotonínerných inhibítorov u žien trpiacich PMS, ktorých užívanie však prináša aj mnohé nežiadúce účinky (19).

Predpokladá sa, že serotonergný mechanizmus sa podieľa na antidepresívnom účinku šafranu (*Crocus sativus* L.), preto bola v roku 2007 vykonaná dvojito zaslepená a placebo kontrolovaná štúdia, ktorej cieľom bolo zistiť, či šafran môže zmierniť symptómy PMS. Do štúdie bolo zaradených 50 žien vo veku 20 – 45 rokov s pravidelnými menštruačnými cyklami a skúsenosťami s príznakmi PMS počas najmenej 6 mesiacov. Boli rozdelené do dvoch skupín: aktívna skupina s kapsulami s obsahom šafranu 30 mg/deň a placebo v kapsulách, ktoré užívali počas dvoch menštruačných cyklov (cyklus 3 a 4). Cykly 1 a 2 boli pozorovacie, na potvrdenie PMS.

Výsledky

V štúdiu sa zistilo, že je šafran účinný pri zmierňovaní príznakov PMS. Významný rozdiel bol pozorovaný v účinnosti šafranu v cykloch 3 a 4 v celkových pred-

menštruačných denných symptómoch (**Obr. 5**) a Hamiltonovej stupnici hodnotenia depresie.



Obr. 5: Priemerné $\pm$ SD skóre dvoch skupín žien v celkových predmenštruačných denných symptómoch. NS, nevýznamné; *** = $P < 0,001$. Horizontálne symboly (***) sa použili na vyjadrenie štatistickej významnosti oproti ich príslušnej základnej hodnote a vertikálne symboly (*, **, ***) sa použili na porovnanie medzi skupinami (upravené podľa Agha-Hosseini a kol., 2018).

Referencie

- (1) Romero R., et al. *Preterm labor: one syndrome, many causes*. Science 2014, 345(6198), 760-765.
- (2) Elovitz M., et al. *Cervicovaginal microbiota and local immune response modulate the risk of spontaneous preterm delivery*. Nature communications 2019, 10(1), 1305.
- (3) Walther-Antônio, M. R. et al. *Pregnancy's stronghold on the vaginal microbiome*. PLoS one 2014, 9(6), e98514.
- (4) Workowski, K. A. *Sexually transmitted infections treatment guidelines*. MMWR. Recommendations and Reports 2021, 70.
- (5) Gonçalves B., et al. *Vulvovaginal candidiasis: epidemiology, microbiology and risk factors*. Crit Rev Microbiol 2016, 42(6):905–27.
- (6) Swidsinski A., et al. *Polymicrobial Gardnerella biofilm resists repeated intravaginal antiseptic treatment in a subset of women with bacterial vaginosis: a preliminary report*. Arch Gynecol Obstet 2015, 291(3):605–9.
- (7) Bhattacharya S., et al. *Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance*. Antibiotics 2020, 9(6):312.
- (8) Chen R., et al. *Probiotics are a good choice for the treatment of bacterial vaginosis: a meta-analysis of randomized controlled trial*. Reprod Health 2022 19(1):137.
- (9) Liu HF, Yi N. *A systematic review and meta-analysis on the efficacy of probiotics for bacterial vaginosis*. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2022, 26(1):90–8.
- (10) Wang Z, He Y, Zheng Y. *Probiotics for the treatment of bacterial vaginosis: a meta-analysis*. Int J Environ Res Public Health 2019, 16(20):3859.
- (11) Jeng HS, Yan TR, Chen JY. *Treating vaginitis with probiotics in nonpregnant females: a systematic review and meta-analysis*. Exp Ther Med. 2020, 20(4):3749–65.
- (12) Blostein F., et al. *Recurrent vulvovaginal candidiasis*. Annals of Epidemiology 2017, 27(9), 575-582.
- (13) Pino A., et al. *Lactocaseibacillus rhamnosus CA15 (DSM 33960) as a candidate probiotic strain for human health*. Nutrients 2022, 14(22), 4902.
- (14) Rapisadra A, et al. *Lactocaseibacillus rhamnosus CA15 (DSM 33960) strain as a new driver in restoring the normal vaginal microbiota: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial*. Frontiers in Surgery 2023, 9: 1075612.
- (15) Holmes K., et al. *Normal genital flora*. Sexually Transmitted Diseases 2008, Eds.: 289–307.
- (16) Thoma M.E., et al. *Longitudinal changes in vaginal microbiota composition assessed by Gram stain among never sexually active pre- and postmenarcheal adolescents*. J. Pediatr. Adolesc. Gynecol 2011. 24: 42–47.
- (17) Filip R., et al. *Twelve-month consumption of a polyphenol extract from olive (Olea europaea) in a double blind, randomized trial increases serum total osteocalcin levels and improves serum lipid profiles in postmenopausal women with osteopenia*. The journal of nutrition, health & aging 2015, 19, 77-86.
- (18) Andrzej M, Diana J. *Premenstrual syndrome: from etiology to treatment*. Maturitas 2006. 55S:S47–S54.
- (19) Wyatt KM, et al. *Selective serotonin reuptake inhibitors for premenstrual syndrome*. Cochrane Database Syst Rev 2002; D001396.
- (20) Agha-Hosseini M., et al. *Crocus sativus L. (safran) in the treatment of premenstrual syndrome: a double-blind, randomised and placebo-controlled trial*. An International Journal of Obstetrics & Gynaecology 2008, 115(4), 515-519.