

Diplomarbeit

**Probiotische Intervention beim Polyzystischen Ovar-
Syndrom (PCOS)
– die „ProPCO-Pilotstudie“**

eingereicht von

Anna Helena Rosa Mayr

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Innere Medizin,

Klinische Abteilung für Endokrinologie und Diabetologie

unter der Anleitung von

Univ.-Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ med.univ. Barbara Obermayer-Pietsch

Dr.med.univ. Valentin Borzan

Graz, 24.01.2021

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 24.01.2021

Anna Helena Rosa Mayr eh.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 PCOS und Frauen.....	2
1.1.1 Symptome und Relevanz	2
1.2 Die drei großen Player in der Pathophysiologie des PCOS.....	6
1.2.1 Hyperandrogenismus	7
1.2.2 Dysbalance der Hypothalamus-Hypophysen-Achse und ovarielle Dysfunktion	13
1.2.3 Insulinresistenz	18
1.2.4 Weitere Pathophysiologien	28
1.3 Wie man die Kontrolle zurückgewinnt - Therapieoptionen	33
1.3.1 Lifestyle.....	33
1.3.2 Adipositas-Chirurgie / bariatrische Chirurgie	34
1.3.3 Metformin – der Insulin-Sensitizer	34
1.3.4 Ovulationsinduktoren	35
1.3.5 „Die Pille“	37
1.3.6 Vitamin D	39
1.4 Das Mikrobiom	40
1.4.1 Aufgaben des Mikrobioms.....	41
1.4.2 Entwicklungen post partum.....	41
1.4.3 Das Mikrobiom analysieren (182).....	41
1.4.4 Alpha Diversität (183)	42
1.4.5 Beta Diversität (185).....	44
1.4.6 PCOS und das Mikrobiom	45
1.4.7 Probiotika	46
1.5 ProPCO - Pilot.....	50
2 Material und Methoden	51
2.1 Studiendesign	51
2.1.1 Verwendete Probiotika.....	51
2.1.2 Studienendpunkte	52
2.1.3 Studienverlauf	54
2.1.4 Auswertung und statistische Analyse	55
3 Ergebnisse.....	56
3.1 Patientinnenkollektiv	56
3.1.1 Hormonelle und metabolische Beschreibung der Patientinnen.....	56

3.2	Ergebnisse der Intervention	57
3.3	Veränderungen im Mikrobiom nach der Intervention.....	67
4	<i>Diskussion</i>	69
5	<i>Conclusio</i>	72
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	73

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AGE	Advanced-Glycation Endproduct
AMH	Anti-Müller Hormon
BMI	Body-Mass-Index
CFT	Calculation of free Testosteron
CRH	Corticotropin-releasing Hormon
CRP	C-reaktives Protein
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEA-S	Dehydroepiandrosteronsulfat
DHT	5 α -Dihydrotestosteron
DMT2	Diabetes mellitus Typ 2
EE	Ethinylestradiol
FAI	Freier Androgen Index
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
fT	freies Testosteron
GDI	Glucose disposition Index
GnRH	Gonadotropin-releasing Hormon
HA	Hyperandrogenismus
HDL	High density Lipoprotein
HOMA	Homeostasis model assessment
HOMA-IR	Homeostasis model assessment for Insulin Resistance
IDL	Intermediate density Lipoprotein
IGF	Insulinähnliche Wachstumsfaktoren
IL-6	Interleukin-6
IR	Insulinresistenz
IRS-1	Insulinrezeptor-Substrat
LDL	Low density Lipoprotein
LDM	Leukocyte derived microparticles
LEfSe	Linear discriminant analysis (LDA) effect size
LH	Luteinisierendes Hormon
mFG	modifizierter Ferriman-Gallwey Wert
MWK	Massenwirkungskonstante

NF κ B	Nuclear factor ' κ -light-chain-enhancer'
oGTT	oraler Glukosetoleranztest
Oligo	Oligo-Ovulation
OTU	Operational Taxonomic Unit
PCoA	Principal component Analysis
PCOM	Polyzystische ovarielle Morphologie
PCOS	Polyzystisches Ovar Syndrom
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rRNA	ribosomale RNA
SAT	Subkutanes Fettgewebe
SHBG	Sexual-Hormon-bindendes Globulin
T	Testosteron
TAG	Triacylglycerid
TNF- α	Tumor-Nekrosefaktor- α
TT	Totales (Gesamt-) Testosteron
TVT	tiefe Venenthrombose
VAT	Viszerales Fettgewebe
VLDL	Very low density Lipoprotein

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.: Frida Kahlo, Selbstportrait (1940), Öl auf Leinwand, 62 x 46 cm (9)	2
Abbildung 2.: Normal and polycystic ovary shown by transvaginal ultrasonography during the follicular phase of a menstrual cycle (3).....	3
Abbildung 3.: Die heterogenen Phänotypen des PCOS (6).....	5
Abbildung 4.: Die Pathophysiologie des PCOS (28).....	6
Abbildung 5.: Die Effekte von Adipositas auf das PCOS (48)	11
Abbildung 6.: Menstruationszyklus (60)	13
Abbildung 7.: Überblick über die Steroidhormonsynthese (61)	14
Abbildung 8.: Ovarialfollikel-Arrest bei PCOS (67).....	16
Abbildung 9.: Die β -Zell Dysfunktion beim PCOS (76).....	20
Abbildung 10.: Schematische Darstellung der IR-begünstigenden Faktoren beim PCOS (75)	21
Abbildung 11.: Fettgewebs- und Steroidhormonmetabolismus beim PCOS (48).....	25
Abbildung 12.: Metabolische Anomalien beim PCOS, die ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko anzeigen (48).	28
Abbildung 13.: Die pathophysiologische Heterogenität beim PCOS (6)	31
Abbildung 14.: Auflistung der momentan verfügbaren, niedrig dosierten orale Kontrazeptiva ($\leq 35 \mu\text{g EE}$) nach Progesteron-Typ und EE-Dosierung (168).....	38
Abbildung 15.: Hierarchie der taxonomischen Stufen (ohne Zwischenstufen) (177).....	40
Abbildung 16.: The number of observed OTUs (185).....	43
Abbildung 17.: Ferriman-Gallwey-Wert (mFG) (35)	53
Abbildung 18.: Studiendesign und zeitlicher Ablauf	54
Abbildung 19.: Patientinnen In- und Exklusion während der Rekrutierungsphase	56
Abbildung 20.: Ergebnis: totales und freies Testosteron	61
Abbildung 21.: Ergebnis: Androstendion und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEA-S)	62
Abbildung 22.: Ergebnis: modifizierter Ferriman-Gallwey Wert (mFG) und SHBG	63
Abbildung 23.: Ergebnis: Anti-Müller Hormon (AMH) und LH/FSH Ratio	64
Abbildung 24.: Ergebnis: BMI und Beck's Depression Inventory (BDI)	65
Abbildung 25.: Ergebnis: HOMA-IR und Glukose area under the curve (AUC).....	66
Abbildung 26.: Der Shannon-Index der OMNi-BiOTiC®-Gruppen vor und nach der Intervention	67
Abbildung 27.: Die Principal Component Analysis (PCoA) der OMNi-BiOTiC®-Gruppen vor und nach der Intervention	67
Abbildung 28.: LEfSe Analyse zwischen den drei OMNi-BiOTiC®-Gruppen	68

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1.: Vorteile und Nachteile der derzeitigen PCOS-Therapiemöglichkeiten.</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 2.: Grundlegende hormonelle und metabolische Parameter vor der Intervention.</i>	<i>57</i>
<i>Tabelle 3.: Gegenüberstellung der hormonellen und metabolischen Parameter zu Beginn der Studie und nach der Intervention.</i>	<i>58</i>
<i>Tabelle 4.: Auflistung der Probiotika-Zusammensetzung in Vergleichsstudien und in der Pilot-Studie.</i>	<i>70</i>

Zusammenfassung

Hintergrund: Die Prävalenz des PCOS beträgt zwischen 6 und 20%, was dieses Syndrom zur häufigsten endokrinen Dysfunktion im gebärfähigen Alter und in der Postmenopause macht. Die klinische Präsentation wird von den Hyperandrogenismus-bedingten dermatokutanen Erscheinungen, einem Diabetes mellitus-ähnlichen metabolischem Zustandsbild und reproduktiven Störungen geprägt, die allesamt auch die psychische Gesundheit der Patientinnen erheblich beeinflussen. Therapeutisch ist man derzeit auf Lifestylemodifikationen, Metformin und Ovulationsinduktoren, sowie auf die „Pille“ beschränkt, was ein alternatives Therapiekonzept notwendig macht.

Das gastrointestinale Mikrobiom verspricht hier Hoffnung, da es erheblichen Einfluss auf metabolische Faktoren, reproduktive Parameter und auch hyperandrogene Manifestationen ausüben kann. Tatsächlich existiert eine Assoziation zwischen der vorliegenden Darmflora und dem Auftreten und Fortbestehen von PCOS-Symptomen, wobei die PCOS-Patientinnen eine niedrigere Diversität und phylogenetische Zusammensetzung des Mikrobioms zeigen.

Methoden: Für die monozentrisch, offen und randomisiert durchgeführte Pilotstudie wurden 30 PCOS-Patientinnen rekrutiert und in drei Gruppen eingeteilt. In den folgenden 12 Wochen erhielten je 10 Teilnehmerinnen OMNi-BiOTiC® metabolic, OMNi-BiOTiC® 6 oder OMNi-BiOTiC® STRESS Repair. Letztlich wurden zur Erfolgsdokumentation vor und nach der Intervention Blut-, Stuhl- und Urin-Proben abgenommen, sowie Fragebögen zu Depression, Lebensqualität und PCOS-Symptomen beantwortet.

Ergebnisse: Klinisch, metabolisch und hormonell veränderten sich die PCOS-Parameter am meisten in der OMNi-BiOTiC® metabolic-Gruppe, wobei das OMNi-BiOTiC® 6 eine gute zweite Wahl darstellt. Das OMNi-BiOTiC® STRESS Repair konnte hingegen lediglich Beck's Depression Inventory deutlich verbessern. Bezogen auf das Mikrobiom, wurden keine signifikanten Veränderungen festgestellt, obwohl ein Alpha-Diversität-fördernder Trend sowohl in der OMNi-BiOTiC® metabolic- als auch der OMNi-BiOTiC® 6-Gruppe auszumachen war.

Conclusio: Nicht alle Probiotika haben die gleichen Effekte auf PCOS-Patientinnen. Für ein besseres Verständnis sind weitere Untersuchungen nötig.

Abstract

Background: PCOS has a prevalence of 6 to 20%, which makes this endocrine disorder the most common within fertile and postmenopausal women. Clinically it presents itself with hyperandrogenic dermatocutaneous symptoms, as well as metabolic features similar to Diabetes mellitus and also reproductive disturbances. Additionally, the psychological wellbeing is highly impacted by these signs.

Therapeutic options are currently limited to lifestyle modifications, metformin, ovulation inductors or oral contraception which clearly requires an alternative concept.

The gastrointestinal microbiome is able to promise hope, as it can exert a significant influence on metabolic, reproductive and hyperandrogenic factors. In fact, there is an association between the present intestinal flora and the occurrence and persistence of PCOS symptoms, whereby PCOS patients show a lower diversity and phylogenetic composition of the microbiome.

Methods: For this monocentric, open and randomized pilot study 30 PCOS patients were recruited and randomly assigned to one of three groups. 10 participants each received OMNi-BiOTiC® metabolic, OMNi-BiOTiC® 6 or OMNi-BiOTiC® STRESS Repair for the following 12 weeks. Finally, to document the success of the intervention, blood, stool and urine samples were collected before and after the intervention as well as questionnaires concerning depression, quality of life and PCOS symptoms.

Results: Clinically, metabolically and hormonally, the PCOS parameters changed most in the OMNi-BiOTiC® metabolic group, with OMNi-BiOTiC® 6 being a good second choice. The OMNi-BiOTiC® STRESS Repair, on the other hand, could only improve Beck's Depression Inventory. With regard to the microbiome, no significant changes were found, although an alpha-diversity promoting trend was observed in both the OMNi-BiOTiC® metabolic- and the OMNi-BiOTiC® 6-group.

Conclusion: Not all probiotics have similar effects on PCOS. To establish a deeper understanding, further investigations are needed.

1 Einleitung

„Ich habe keine Angst. Ich wurde geboren, um das zu tun.“

– Jeanne d’Arc.

Zwischen England und Frankreich tobte ab 1337 ein erbitterter Erbschaftskrieg, bei dem England Besitzanspruch an Frankreich stellte.

70 Jahre nach Kriegsbeginn, als Frankreich bereits weite Teile im Norden eingebüßt hatte und es so aussah als könnte nur noch ein Wunder die Geschichte umschreiben, tauchte Jeanne d’Arc auf. Sie übernahm mit 17 Jahren, 1429 das Heer von Karl VII. und eroberte als federführende Frau Orleans zurück. Diese blattwendende Schlacht war der Grundstein für den definitiven Sieg Frankreichs im Hundertjährigen Krieg 1453. (1)

Damit wird Jeanne d’Arc, mutig und kampfbereit vor der Soldatenschar herreitend zum Sinnbild aller Frauen aus dem Formenkreis des Polyzystischen Ovar Syndroms (PCOS) und beschreibt damit die Stärken, die das Syndrom mit sich bringen kann.

1.1 PCOS und Frauen

Das PCOS unterliegt zum gegenwärtigen Zeitpunkt (2020) der Definition der ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) und der ASRM (American Society of Reproductive Medicine). Laut deren Aufschlüsselung müssen die sogenannten „Rotterdam Kriterien“ von 2003 in mindestens zwei von drei Punkten für eine gültige Diagnose erfüllt sein:

1. Hyperandrogenismus, klinischer oder biochemischer Präsentation
2. Oligo- / Anovulation
3. Polyzystische Ovarien (2)

Differentialdiagnosen, die sich klinisch ähnlich präsentieren, müssen hierbei im Vorhinein ausgeschlossen werden. Dazu zählen zum Beispiel das Cushing Syndrom, die Hyperthyreose und das androgenitale Syndrom (3).

1.1.1 Symptome und Relevanz

Je nachdem, wie weit die Diagnosekriterien gespannt werden, beträgt die Prävalenz des PCOS zwischen 6 – und 20% (4,5). Das macht das Syndrom zur häufigsten endokrinen Dysfunktion im gebärfähigen Alter (6) und in der Postmenopause (7).

Die Symptome

HYPERANDROGENISMUS

Der Hyperandrogenismus (HA) wird anhand von biochemischen Testverfahren, klinischer Präsentation oder Beidem bewertet (3). Das am häufigsten vorkommende Merkmal ist in diesem Kontext der Hirsutismus, der mit 65% - 75% (8) bei allen PCOS-Frauen vertreten ist (typische Form zu sehen in Abb. 1 bei Frida Kahlo) (8). Weitere sind die weibliche Form der Alopezie und Akne (3).

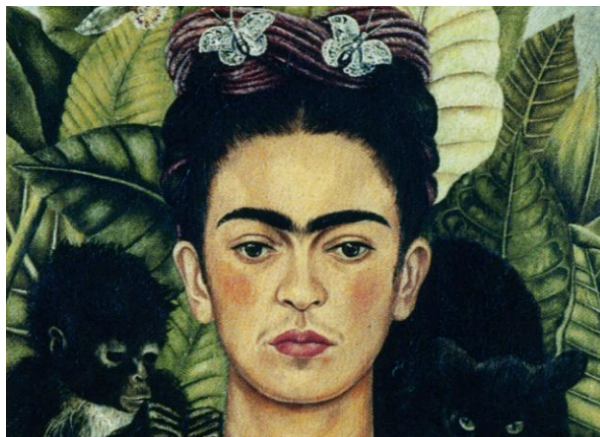


Abbildung 1.: Frida Kahlo, Selbstportrait (1940), Öl auf Leinwand, 62 x 46 cm (9).

CHRONISCHE ANOVULATION

Die Klinische Präsentation der chronischen Anovulation ist entweder die Oligo- oder die Amenorrhö. Als Oligomenorrhö versteht man weniger als 8 Perioden im Jahr oder Zyklen, die die Länge von 35 Tagen überschreiten. Bei der Amenorrhoe hingegen handelt es sich um das völlige Ausbleiben der Menstruation für mindestens drei Monate ohne Vorliegen einer Schwangerschaft. (3)

POLYZYSTISCHE OVARIEN

Die Rotterdam Kriterien (10) definieren polyzystische Ovarien, als Ovarien, die 12 oder mehr Follikel aufweisen und die jeweils einen Durchmesser von 2-9 mm haben.

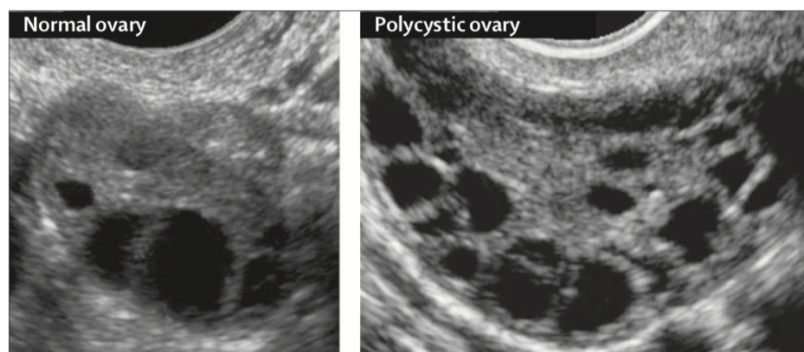


Abbildung 2.: Normal and polycystic ovary shown by transvaginal ultrasonography during the follicular phase of a menstrual cycle (3).

INFERTILITÄT UND ABORTNEIGUNG

Die Prävalenzen für Infertilität und dauerhafte Kinderlosigkeit unter den Patientinnen liegen bei 72% (11) und 24% (12). Aber auch wenn eine Schwangerschaft eintritt, ist der weitere Verlauf oft ungewiss. Wehr et al. (12) haben Studienergebnisse bezüglich der Prävalenz von Spontanaborten zusammengetragen und sind auf Werte von mindestens 25% bis sogar 73% gekommen.

ADIPOSITAS

Mit einer Prävalenz von 30% bis zu 75%, ist die Adipositas recht weit unter den PCOS-Patientinnen verbreitet (12). Zusätzlich ist vor allem die abdominelle Adipositas (>88cm Bauchumfang) mit dem HA (13), der Insulinresistenz (IR) und Dyslipidämien assoziiert (14).

DIABETES MELLITUS

Der Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2) tritt beim PCOS nicht nur als Spätfolge auf (15), sondern ist bei 30-40% der Patientinnen schon früh vorhanden. Dies ist insbesondere bei bereits positiver DMT2-Familienanamnese zu beachten. (12)

DYSLIPIDÄMIEN

Bei PCOS-Frauen sind häufig Dyslipidämien in der Art einer Hypertriglyzeridämie, zusammen mit hohem Low density Lipoprotein (LDL) und niedrigem High density Lipoprotein (HDL) zu finden. In der Entstehung spielen vor allem die Insulinresistenz und der HA eine Rolle. (16)

KARDIOVASKULÄRE ERKRANKUNGEN

Bei PCOS-Patientinnen sind oft frühzeitig atherosklerotische Veränderung in den Gefäßen auszumachen, die sich auf eine endotheliale Dysfunktion gründen (12). So konnten diese Veränderungen auch bei Frauen ohne die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren nachgewiesen werden (17) und führen nicht selten bereits prämenopausal zur Hypertonie.

Auch für die Koronare Herzkrankheit liegt aufgrund von den Angiopathien und Dyslipidämien eine Prädisposition vor. (12)

ENDOMETRIUMKARZINOM

Auch das erhöhte Risiko an einem Endometriumkarzinom zu erkranken reiht sich in die Symptomliste ein. Man vermutet, dass die ungebremste Östrogen-Stimulation des Endometriums bedingend wirkt. (18)

PSYCHISCHE STÖRUNGEN

Die Prävalenz der Depression bei PCOS-Frauen liegt zwischen 14%- und 67% (18) und die der Angsterkrankung bei ungefähr 20% (19). Diese Ergebnisse untermauern den Nutzen eines standardisierten Depressions-Screenings unter allen PCOS-Patientinnen (20).

Phänotypen des Syndroms

Polak et al. (21) greifen die Definition der Rotterdam Kriterien (2) auf und beschreiben anhand der Parameter HA, Oligo-Ovulation (Oligo) und polyzystisch ovarielle Morphologie (PCOM) vier Phänotypen:

Phänotyp A – der „Klassische Phänotyp“: HA + Oligo + PCOM

Phänotyp B: HA + Oligo

Phänotyp C: HA + PCOM

Phänotyp D: Oligo + PCOM

Sie untersuchen zudem die mengenmäßige Verteilung der Typen und kommen im Konsens mit den Rotterdam Kriterien (2) zu dem Ergebnis, dass der Phänotyp A die höchste Prävalenz (38%) aufweist. Die Phänotypen B und C kommen laut ihrer Arbeit beide mit 23% vor, während der Phänotyp D mit 16% das Schlusslicht bildet. Der Phänotyp D ist auch in der klinischen Präsentation hinten an und bildet im Vergleich zu den Phänotypen A-C selten metabolische Anomalien aus. Dies wird auch von Escobar-Morreale et al. (6) in Zusammenhang gebracht.

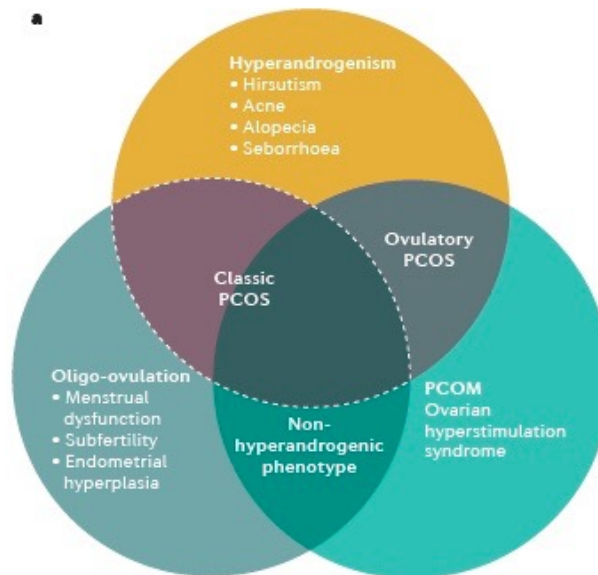


Abbildung 3.: Die heterogenen Phänotypen des PCOS (6).

Sie sprechen dem „klassischen PCOS“ die schwerwiegendste klinische Präsentation zu. Das „klassische PCOS“ wird dabei als Kombination aus Hyperandrogenismus und Oligo-Ovulation [entsprechend dem oben genannten Phänotyp B] beschrieben (6) und die klinische Präsentation umfasst metabolische Störungen und IR (22). Die zusätzliche Morphologie der polyzystischen Ovarien [entsprechend dem Phänotyp A], sei für die gewichtige Klinik aber nicht entscheidend (6).

Auch dem „ovulierendem PCOS“ [gleichbedeutend mit dem Phänotyp C], kommt eine, zwar leicht abgeschwächte, aber dennoch ausgeprägte klinische Symptombedeutung zu. Beim „Nicht-Hyperandrogenen“- oder „Norm-androgenen“-Typ [dem Phänotyp D gleichkommend] sind die negativen Stoffwechseleffekte indes nur sehr gering nachweisbar. (6,22)

Mit dem Fund am Phänotyp D bestärken sie Guastella et al. (23), die zu bedenken geben den Phänotyp D aus dem PCOS Krankheitsbild auszuschließen, da er zwei Kernpunkte des Syndroms, nämlich Androgen-Überschuss und IR, nicht erfüllt.

1.2 Die drei großen Player in der Pathophysiologie des PCOS

Wie bei allen komplexen und heterogenen Krankheiten, ist es schwierig den einen Grund für die Entstehung festzumachen. Auch hier bestimmt am wahrscheinlichsten eine Kombination aus genetischer Anlage (6,24–26) und Umweltfaktoren (3,27) den Weg zum PCOS.

Allerdings haben sich in den letzten Jahren drei große Quellen [siehe grüne Kästen in Abb. 4] besonders hervor getan (3), die ein ineinandergreifendes pathophysiologisches System bilden und im Folgenden genauer erörtert werden sollen.

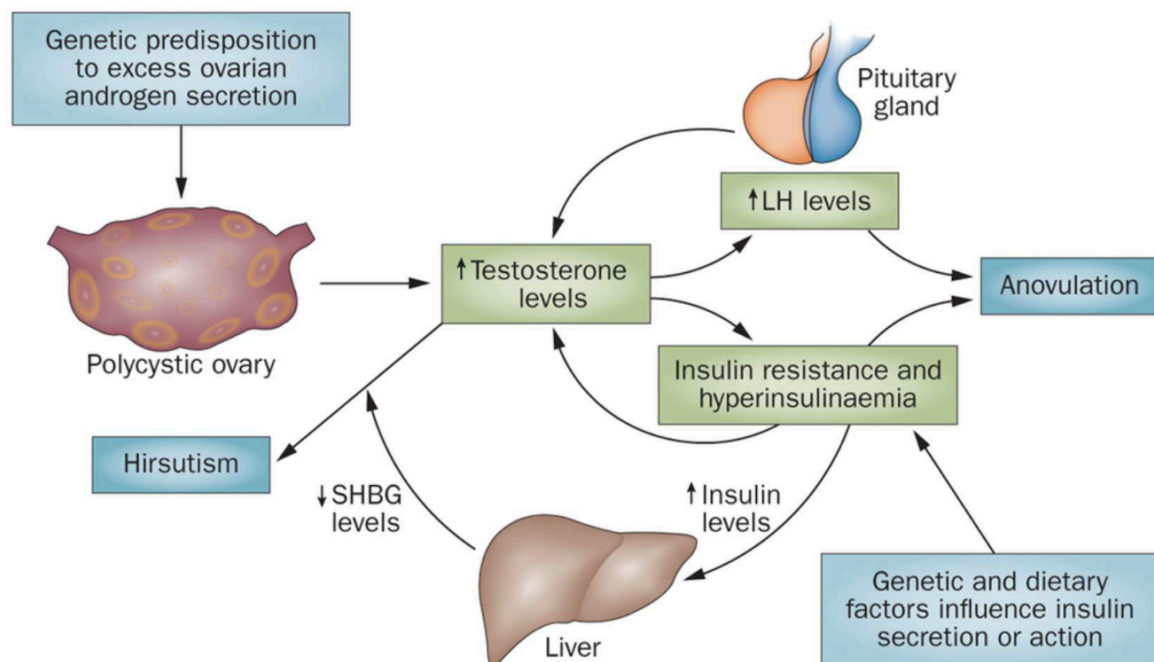


Abbildung 4.: Die Pathophysiologie des PCOS (28).

1.2.1 Hyperandrogenismus

Da bei 60-80% der PCOS-Frauen hohe Testosteron (T)-Spiegel und bei 25% hohe Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEA-S) Spiegel auffallen, schließen einige Arbeiten darauf, dass die Androgen-Anomalie die primäre Pathologie hinter dem Syndrom darstellt. (3,29,30).

Androgene:

Die „klassisch männlichen“ Sexualhormone kommen auch bei Frauen in verschiedenen Ausführungen vor. Zu den am stärksten wirksamen Androgenen zählen das 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) und das T, die als einzige an den Androgenrezeptor binden können. Das folgende Androstendion ist eine schwächere Vorstufe von T, ist aber auch selbst hormonell aktiv und wird wie auch das T sowohl im Ovar als auch in der Nebennierenrinde gebildet. Das DHT hingegen entsteht primär peripher durch enzymatische Umwandlung aus T, wobei auch um die 50% des T nicht direkt gebildet werden, sondern durch Umwandlung aus Androstendion entstehen. Weiters seien neben dem DHEA-S auch das Dehydroepiandrosteron (DHEA) angeführt. DHEA wird dabei sowohl in der Nebennierenrinde als auch im Ovar synthetisiert und kann peripher aus DHEA-S hergestellt werden. Sein inaktives Prohormon, das DHEA-S, wird fast ausschließlich in der Nebennierenrinde produziert. (31,32)

Physiologisch verhalten sich die Plasmakonzentrationen der Androgene invers mit ihrer Wirkkraft. Demnach weist das am schwächsten wirksame DHEA-S die höchste Plasmakonzentration auf, während in absteigender Reihenfolge das DHEA, das Androstendion, das T und das DHT jeweils weniger stark im Plasma vorhanden sind. (31,32)

Die genannten Bildungsorte – Ovar und Nebennierenrinde, werden neben parakrinen und autokrinen Mechanismen durch spezifische Signalstoffe zur Androgenproduktion angeregt. Im Ovar übernimmt dies das Luteinisierende Hormon (LH) und in der Nebennierenrinde das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH). (31)

Das ACTH wird dabei von der Hypophyse, nach Stimulation durch das Corticotropin-releasing Hormon (CRH) aus dem Hypothalamus, freigesetzt (32).

Testosteron: T kommt sowohl frei als auch gebunden vor. In gebundener Form findet man es verankert an Proteinen wie dem Albumin oder dem Sexual-Hormon-

bindenden Globulin (SHBG), die dem Hormon die Eigenschaft der Hydrophilie verleihen. Mengenmäßig spricht man von fast 60%, die gebunden an SHBG und um die 38%, die gebunden an Albumin vorliegen (33). Allerdings muss das T in dieser Verbindung mitsamt seines Transportproteins aktiv in die Zelle geschleust werden und zusätzlich von diesem wieder dekonjugiert werden, bevor es seine Aufgaben erfüllen kann. (34)

Leichter hat es da das freie T (fT), das in der überschaubaren Menge von 1% im weiblichen Organismus vorkommt (33). Diese unkonjugierte Form kann frei über die Plasmamembran diffundieren um im Zellinneren von Enzymen metabolisiert zu werden oder den Androgenrezeptor zu aktivieren (34).

An dieser Stelle sei zusätzlich das Konzept des bioverfügbaren Testosterons erwähnt, welches auch das schwach an Albumin gebundene T miteinschließt (35). Man geht davon aus, dass sowohl das freie als auch das schwach gebundene T – also in der Gesamtheit das bioverfügbare T, für die klinische Relevanz sorgen (34,35).

Die physiologischen Aufgaben des Testosterons, abseits der Rolle als männliches Geschlechtshormon

Die Hauptaufgabe der Androgene im weiblichen Körper besteht ohne Frage in ihrer Umwandlung zu Östrogenen [siehe Kap. *Östrogenbiosynthese*]. Allerdings hat das T doch auch noch weitere Aufgaben inne.

Zu diesen zählen beispielsweise eine anabole Wirkung sowohl auf Muskeln, Knochen und Knorpel, sowie, über Erythropoetin-Stimulation, die Vermehrung der Erythrozyten. Außerdem werden die Libido und der generelle Antrieb positiv beeinflusst. (36)

Hyperandrogenismus – klassisch klinische Korrelate

Wenn die Menge an Androgenen allerdings die physiologische Marke übersteigt, dann lassen sich klassische klinische Anzeichen festmachen. Zu diesen zählen:

Hirsutismus: Der Hirsutismus beschreibt ein männliches Behaarungsmuster bei Frauen an der Oberlippe, dem Kinn, der Brust, dem oberen und unteren Rücken, dem unteren Abdomen, den Oberarmen und an den Schenkeln. Bewertet wird dies typischerweise mit dem Ferriman-Gallwey Score (37). Im Überblick sind 65% - 75% der PCOS-Patientinnen davon betroffen. (8)

Akne: Papeln und Pusteln, die Erkrankungen der Talgdrüsen und Haarfollikel entsprechen, sind gemeinhin als Akne bekannt. Diese sind bei 15 – 25% der PCOS Patientinnen vorhanden. (8)

Alopezie: Die Alopezie bezeichnet den Kopfhaarverlust. Konkret findet man bei Frauen ein Ausdünnen der Haare an der Kopfkrone, bei erhaltener anteriorer Haarlinie. Die Prävalenz dieses Merkmals variiert von 5% - 50%, was weitere Forschungen nötig macht. (8)

Androgenmessung

Wichtig, wenn man über die üblichen Androgen-Messverfahren und ihren Aussagewert nachdenkt, ist folgende Tatsache:

Das SHBG bindet in der Zirkulation sowohl T als auch Östrogen, wenngleich auch Androgene mit einer 5-Mal höheren Affinität gebunden werden. Wenn sich nun die SHBG-Spiegel erhöhen, führt dies zu einer Verringerung an bioverfügbarem T, ohne die total vorhandene T Menge zu verändern. (33)

Basierend darauf gewinnt die Aussage der Androgen Excess und PCOS Society (AE-PCOS) (8), dass die Messung der Androgenlast aus freiem Testosteron (fT) deutlich besser geeignet ist als aus totalem Testosteron (TT), an Gewicht.

Tatsächlich wird der HA am häufigsten über die Messung des totalen Testosterons, gefolgt von der Messung des SHBG, festgestellt. Weiters kann die fT Menge auch mit dem Freien Androgen Index (FAI) oder CFT, was für *Calculation of free Testosterone* steht, berechnet werden. (3,33)

Der FAI errechnet sich aus $FAI = \frac{T}{SHBG} * 100$. Das Ergebnis ist dabei ein dimensionsloser Quotient, der aber stark von der präzisen Messung des T und SHBG abhängig ist. (35)

Anders der CFT, der wohl das nützlichste Tool darstellt, um fT im Plasma zu bestimmen. Dieser bedient sich dem Massenwirkungsgesetz (35), das jeder reversiblen Reaktion eine spezifische Massenwirkungskonstante (MWK) zuschreibt. Diese ist erreicht, wenn sowohl Hin- als auch Rückreaktion gleich schnell verlaufen (38) und gibt in diesem Zustand an, auf welcher Seite das Gleichgewicht liegt (39). Mithilfe dieser MWK werden nun die Konzentrationen von fT und gebundenem (an SHBG oder Albumin) errechnet. Auch diese Berechnung ist abhängig von der präzisen Messung des Testosterons, SHBG und Albumins, sowie jeweils deren gemessenen MWK. (35)

Die direkte fT-Messung mittels Radioimmunoassay schnitt teilweise schlecht ab, weshalb hiervon abgeraten wurde (3,40,41), neuere Messungen mittels EIA-Methode dürften besser liegen.

Zur zusätzlich speziellen Messung des adrenergen HA haben sich Androstendion und DHEA-S als bevorzugte Messparameter herausgestellt, da über 90% dieser Hormone über die Nebennierenrinde gebildet werden und die vergleichsweise große Menge, mit der sie im Organismus vorkommen, die Messung erleichtert. (8)

Wo entsteht der Hyperandrogenismus?

Polyzystische Ovarien besitzen eine verdickte Thekazellschicht, durch die ihr Sekretionspotenzial exzessiv gesteigert wird. Darum ist bei PCOS-Frauen vorrangig die basale (primäre) Androgen-Sekretion des Ovars erhöht. (3,42)

Sekundär wird die Androstendion- und Testosteron-Produktion durch das verstärkte LH- (43) und Insulin-Vorkommen im Ovar gefördert (34,44).

Zusätzlich setzt sich dadurch ein Teufelskreis in Gang, bei dem der entstehende HA positiv auf die Insulin- und Insulinähnliche Wachstumsfaktor (IGF)-Rezeptor-Expression am Ovar zurück wirkt (45,46).

Auch die Androgen-Sekretion aus der Nebennierenrinde spielt eine Rolle, da die in der Zona reticularis und Zona fasciculata gebildeten DHEA und 11 β -Hydroxy-Androstendion bei 50% der PCOS-Frauen erhöht sind. Das 11 β -Hydroxy-Androstendion entsteht dabei durch Hydroxylierung von Androstendion. (34,47)

Ursächlich für die erhöhte adrenerge Androgenproduktion scheint die Überstimulation der Nebennierenrinde mit ACTH zu sein [siehe Kap. *Insulinresistenz*]. ACTH fördert die Aktivität des Enzyms 17 α -Hydroxylase, das die Bildung von Vorstufen des DHEA-S und 11 β -Hydroxy-Androstendions katalysiert. (34).

Auch das Fettgewebe trägt maßgeblich zum HA bei.

Einerseits kann das Fettgewebe selbst potente Androgene herstellen, indem es über das Enzym 17 β -HS Oxidoreductase das weniger potente Δ 4-Androstendion in T umwandelt (48).

Andererseits weist ein von Lim et al. (49) durchgeführter systemischer Review auf die Beziehung zwischen Viszeralfettgewebe/zentraler Adipositas und IR und den darauf folgenden hohen T-Spiegeln und erhöhten FAI-Werte hin. Sie räumen hier

Normalgewichtige deshalb, um den Adipositas-Bias im Kontext des verminderten IR auszuschließen.

Die Arbeit kam zu dem Schluss, dass normalgewichtigen PCOS-Frauen ebenfalls eine reduzierte Insulinsensitivität in den Muskelzellen aufweisen. Begründet könnte dies in der verminderten Menge an zirkulierenden Adiponektinen beim PCOS [siehe Kap. *Adipositas*] liegen.

IM PANKREAS:

Während der hyperandrogene Effekt auf die systemische Insulinsensitivität mittlerweile relativ gut erforscht ist, weiß man noch relativ wenig über den direkten Einfluss auf das Pankreas. Bekannt ist allerdings, dass die β -Zellen Androgenrezeptoren besitzen, was einen androgenen Einfluss auf die Pankreasdysfunktion nahelegt (56,57). Weiwei et al. (57) detektierten eine durch Testosteronüberschuss ausgelöste Insulin-Hypersekretion, die prädispositionierend für eine β -Zellen-Dysfunktion wirkt.

IN DER LEBER:

Auch in der Leber hinterlässt der HA seine Spuren. Hier erhöht sie das Risiko an einer nichtalkoholischen Fettleber zu erkranken (58) und führt über die Hyperinsulinämie zur Hemmung der SHBG-Freisetzung (59) [siehe zusätzlich Abb. 7].

1.2.2 Dysbalance der Hypothalamus-Hypophysen-Achse und ovarielle Dysfunktion

Grundlagen

Der physiologische Menstruationszyklus

Physiologisch [siehe Abb. 3] reifen in der ersten Zyklushälfte unter dem Einfluss von dem Follikel-stimulierenden Hormon (FSH) mehrere Follikel zu Tertiärfollikeln heran. Die Tertiärfollikel enthalten eine sekundäre Oozyte, die von einer Follikelzellschicht, bestehend aus Granulosazellen und Thekazellen, umgeben wird. Im Verlauf der Proliferationsphase wird aus den Tertiärfollikeln ein dominanter Graaf-Follikel ausgewählt, der bei der LH-induzierten Ovulation seine Oozyte in die Tuba uterina entlässt. Alle anderen Ovarialfollikel bilden sich zu atretischen Follikeln zurück und gehen damit unter. Nach dem Eisprung werden die Follikelzellen zum Corpus luteum (Gelbkörper), welches Progesteron produziert und für den Aufbau des Endometriums verantwortlich ist. Findet keine Einnistung der Eizelle in das Endometrium statt, geht auch der Gelbkörper zugrunde und der damit verbundene Progesteronabfall führt schließlich zur Menstruation. (60)

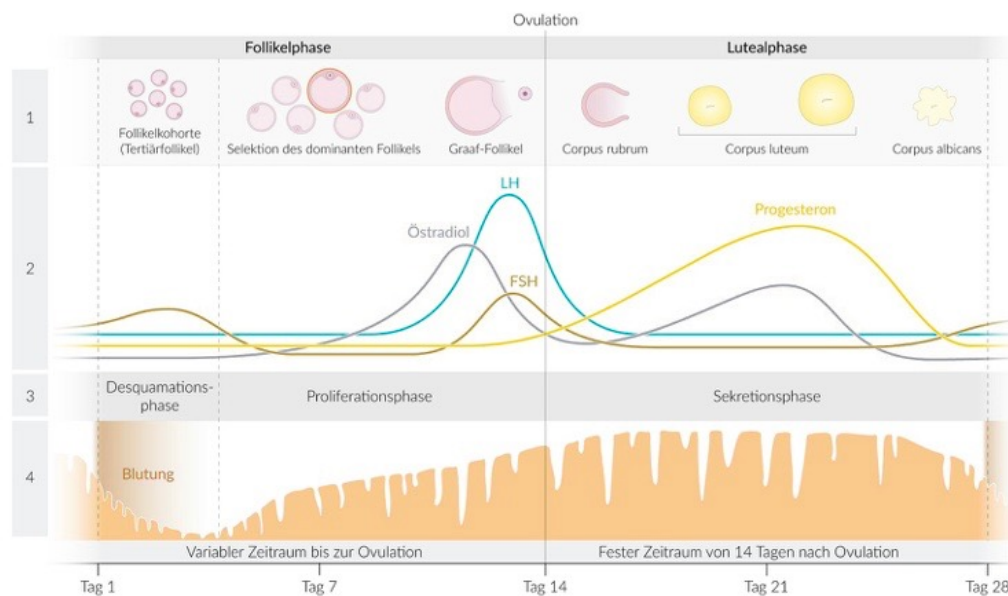


Abbildung 6.: Menstruationszyklus (60).

Die übergeordnete Kontrolle liegt dabei im Hypothalamus, der pulsatil das Gnadotropin-releasing-Hormon (GnRH) sezerniert und so die Hypophyse zur LH- und FSH-Ausschüttung animiert. Die GnRH-Konzentration verändert sich im Laufe des Zyklus: in der Proliferationsphase ist die Frequenz sehr hoch, wohingegen in

der Lutealphase mehr Augenmerk auf der Amplitude liegt und die Frequenz sehr niedrig wird. Dabei ist hauptsächlich der hohe Progesteronspiegel in der zweiten Zyklushälfte für die GnRH-Inhibition verantwortlich. (32)

Hormone des Ovars (und der Nebennierenrinde) - die Östrogenbiosynthese

Für die zyklusbedingte Hormonproduktion im Ovar sind die Theka- und Granulosazellen zuständig, die den Ovarialfollikel umgeben. Unter LH-Einfluss synthetisieren die Thekazellen Androgene und unter FSH-Einfluss die Granulosazellen Östrogene. (32)

Dabei wird das Cholesterin als Ausgangsprodukt über Progesteron in Androstendion, ein schwach wirksames Androgen, umgewandelt. Ebendiese Androgensynthese passiert in den Thekazellen unter LH-Einfluss. Im nächsten Schritt erfolgt die parakrine Sezernierung des Androstendions in die Granulosazellen, wo durch die FSH-Wirkung Östron gebildet wird. Als Schlüsselenzym fungiert bei dieser Reaktion die Aromatase. (61)

Ein geringer Teil des Androstendions geht den Weg zum Östrogen aber auch über das T, das im Folgenden ebenfalls durch die Aromatase zum Östradiol [siehe Abb. 4, Spalte *Sexualhormonsynthese*] wird (61).

Auf diesem Weg entstehen 50% der Androgene im weiblichen Organismus. Die anderen 50% werden in der Nebennierenrinde gebildet und bestreiten die gleichen biochemischen Vorgänge, bevor auch sie zum größten Teil in Östrogene umgewandelt sind (32).

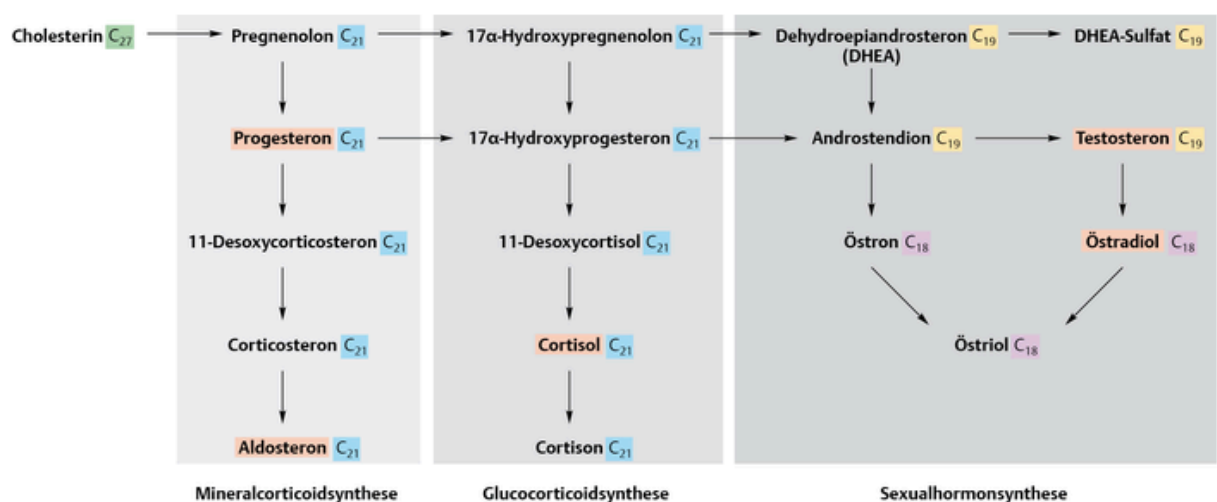


Abbildung 7.: Überblick über die Steroidhormonsynthese (61).

Die Umwandlung der Androgene in Östrogene (unabhängig vom Menstruationszyklus) kann in jedem Gewebe mit Aromatase-Aktivität erfolgen.

Demnach sind die schon genannte Nebennierenrinde, sowie das Fettgewebe und auch die Plazenta bei einer Schwangerschaft, Östrogen-Syntheseorte. (32)

Vom Regelkreis zum Teufelskreis – die Hypothalamus-Hypophysen-Dysbalance

Die erhöhte LH/FSH Ratio ist ein klassisches Merkmal des PCOS. Die Ursache liegt in zwei physiologischen Wegen begründet (12):

- 1) Durch die häufigen anovulatorischen Zyklen bleibt der Plasmaspiegel des Progesterons niedrig, wodurch die negative Rückkoppelung auf GnRH und im Weiteren auf LH nicht stattfindet (62)
- 2) Die Frequenz der GnRH Sekretion verändert sich und bevorzugt mit ihrer erhöhten Pulsation die LH-Ausschüttung gegenüber der FSH-Ausschüttung (63).

Beide Effekte führen damit einerseits zum sogenannte Follikelarrest, der im Mangel an FSH begründet liegt. Das kommt daher, weil FSH für die Follikulogenese zuständig ist, bei der vorherrschenden Mangelsituation der PCOS-Frauen kurz bevor ein dominanter Follikel ausgebildet wird, stoppt (3). Weiters ist FSH für die Aromatase-Synthese in den Granulosazellen verantwortlich, welche wenn FSH nicht/ungenügend vorhanden ist, Androgene nicht in Östrogene umwandeln können (64).

Andererseits verursacht der gleichzeitige LH-Überschuss eine gesteigerte Androgen-Produktion, die klassische PCOS Symptome hervorruft und hemmend auf die Progesteron-Rezeptor-Expression im Hypothalamus wirkt. Dadurch wird die Progesteron-Sensitivität des Hypothalamus herabgesetzt und der hemmende Reiz auf die GnRH-Ausschüttung bleibt damit aus (65). Dieser Effekt konnte durch pharmakologische Versuche mit dem Androgen-Antagonisten Flutamid gezeigt werden. Nach nur einem Monat war die Progesteron-Sensitivität auf den GnRH-Pulsgenerator wieder hergestellt (66).

Der Follikelarrest und seine Folgen beim PCOS

Wie im vorherigen Absatz schon erwähnt, kommt es zu einem Follikelarrest, bei dem die Follikel in der letzten Entwicklungsstufe auf dem Weg zu einem dominanten Follikel stecken bleiben.

zu Antral-/Tertiärfollikel und in zweiter Linie durch die ungenügende FSH-Wirkung, um einen dominanten Follikel auszubilden. (69)

1.2.3 Insulinresistenz

DIE PHYSIOLOGISCHE INSULINSEKRETION

Die physiologische Insulinsekretion läuft beim Gesunden in einem zweistufigen Prozess ab. Grob startet die erste Phase 3-5 Minuten nach Nahrungsaufnahme und dauert 10 Minuten. In dieser Phase wird gespeichertes Insulin freigesetzt. In der darauffolgenden zweiten Phase übernimmt neu gebildetes Insulin die Arbeit. Die zweite Welle ist weniger steil und gleicht eher einem stabileren Plateau. Sie dauert so lange wie die Hyperglykämie besteht. (71,72)

Bei der Glukose-Homöostase übernimmt die erste Phase der Insulin-Ausschüttung die entscheidende Rolle. Sie sorgt für die Inhibierung der hepatischen Glukose-Produktion und senkt damit umfassend den Blutzuckerspiegel. Außerdem bereitet sie Insulin-sensitives Gewebe auf die Aufnahme von Glukose vor, wodurch diese im Folgenden leichter von statten geht. (72)

Ist diese „Erste-Phase“-Insulin Ausschüttung beeinträchtigt, ist das als frühestes Zeichen einer gestörten Glukose Regulation zu sehen und damit der Vorbote von einer DM2 Erkrankung (73).

Insulinresistenz und Hyperinsulinämie sind typische Eigenschaften bei normal- und übergewichtigen PCOS-Patientinnen (74). Aber woher kommen sie?

Die Pathophysiologie der Insulinresistenz

Um Zucker in die Zellen zu schleusen, benötigt man einerseits Glucose-empfindliche Insulin-produzierende β -Zellen in der Bauchspeicheldrüse und andererseits ein Insulin-sensitives Gewebe, das den Zucker aufnimmt.

INSULINSIGNALWEG

Die Insulin-Wirkung in peripheren Zellen wird durch seinen Tyrosinkinase-Rezeptor vermittelt. Dabei bindet das Insulin an die α -Untereinheit des Rezeptors und vermittelt so an der β -Untereinheit die Autophosphorylierung von Tyrosin. Dadurch erhöht sich die Tyrosinkinase-Rezeptor-Aktivität und die folgenden intrazellulären Prozesse zur Glucose-Aufnahme können stattfinden. Bei der IR, wie sie bei dem PCOS vorkommt, geht man nun von einem Defekt in der β -Untereinheit aus, bei dem statt dem Tyrosin, das Serin phosphoryliert wird, wodurch sich die Rezeptor-Aktivität hemmt. (75,76)

Dieser Defekt der Serin-Phosphorylierung führt möglicherweise neben der IR zusätzlich zum HA, indem es die 17α -Hydroxylase Aktivität erhöht (75). Dieses Enzym hat, wie im Kapitel *Hyperandrogenismus* schon erwähnt, eine gesteigerte Androgenbiosynthese zur Folge, indem es die Umwandlung von DHEA-S- und Androstendion-Vorstufen fördert.

β -ZELL-DYSFUNKTION

Zusätzlich zur reduzierten Insulinsensitivität wurde beim PCOS schon früh eine pankreatische β -Zell-Dysfunktion festgestellt (77,78).

Pathophysiologisch folgt der peripheren IR eine kompensatorische Sekretionssteigerung der β -Zellen des Pankreas, um eine normale Glucose-Homöostase aufrechtzuerhalten. Wenn allerdings die β -Zellen durch diesen Kompensationsmechanismus ausgelaugt sind, erlischt dieser und es entsteht ein DMT2. (79)

Wenn man bedenkt, dass die meisten PCOS-Frauen eine normale oder leicht erhöhte β -Zellen-Sekretion aufweisen, aber eigentlich bereits einen hohen Grad an IR beheimaten, der mit der vorliegenden Sekretionsleistung nicht ausgeglichen werden kann, macht es Sinn, dass sich Bergman et al. (79) als Erste in diesem Zusammenhang für den Glucose disposition Index (GDI) ausgesprochen haben.

Dieser postuliert die Dringlichkeit und Anwendung, die β -Zellfunktion im Kontext der vorliegenden peripheren Insulinsensitivität zu interpretieren. Der GDI wird dabei als Produkt aus Insulin-Sensitivität und Insulin-Sekretion berechnet und entspricht unter physiologischen Umständen im menschlichen Organismus einer, wenn visualisiert, konstanten Hyperbelfunktion wie sie in Abbildung 9 dargestellt ist (80).

Die y-Achse ist mit „AIR“ beschriftet, was für für Acute Insuline Response steht und das „Erste-Phase“-Insulin [siehe weiter unten] meint. Weiters zeigt das Diagramm von Diamanti-Kandarakis und Dunaif (76) als Kreise übergewichtige und als Dreiecke normalgewichtige PCOS-Patientinnen. Es wird deutlich, dass bei sinkender Insulin-Sensitivität (gewichtsunabhängig) zu wenig Insulin von den β -Zellen sezerniert wird, um den physiologischen Zustand – die durchgezogene Linie - beizubehalten. Das entspricht einem erniedrigten GDI und einem erhöhten Risiko, an DMT2 zu erkranken.

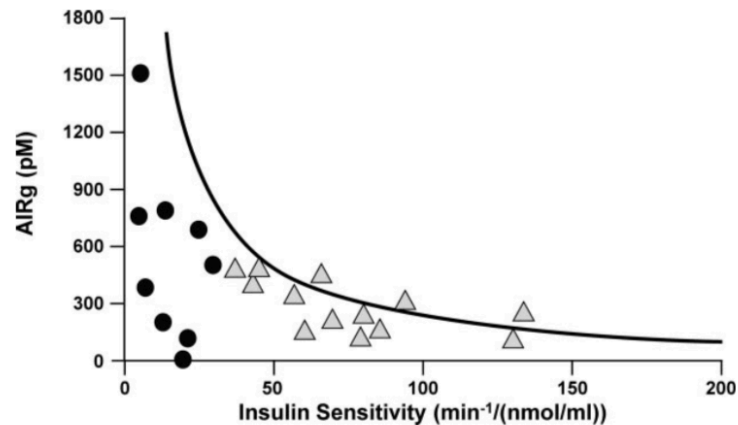


Abbildung 9.: Die β -Zell Dysfunktion beim PCOS (76).

Eine Studie aus Pennsylvania fasste die grundsätzlichen Veränderungen des Insulin-Metabolismus beim PCOS demnach wie folgt zusammen:

- 1) Die erste Phase der Insulin-Ausschüttung ist vermindert.
- 2) Der GDI ist vermindert.
- 3) Die hepatische Glukose-Produktion ist erhöht. (81)

Das Homeostasis model assessment (HOMA) (82)

Das HOMA ist wie auch der GDI ein mathematisches Modell, das die normale Dynamik von Insulin und Glukose beschreiben soll (83). Es quantifiziert unter Zuhilfenahme von zwei unterschiedlichen Konstanten die IR oder β -Zellfunktion.

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Glukose} * \text{Insulin}}{22,5}$$

Die Konstante 22,5 errechnet sich dabei aus dem Produkt der Normalwerte von Nüchternglukose (4,5 mmol/L) und Nüchterninsulin (5 μ U/mL). Wenn die Glukose in mg/dL angegeben ist, wird die Konstante unter dem Bruchstrich zu 405.

$$\text{HOMA-}\beta \text{ cell} = \frac{20 * \text{Insulin}}{\text{Glukose}}$$

Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem GDI und HOMA-IR (83).

Die Ursachen der Insulinresistenz

Molekularbiologisch findet sich in den Adipozyten eine verminderte Tyrosin-Autophosphorylierung, während die Phosphorylierung von Serin in den Fibroblasten erhöht ist und die Insulinrezeptor Aktivität der Muskelzellen ebenfalls vermindert ist (48). Auch die Hyperinsulinämie durch die pankreatische β -Zell-Dysfunktion wurde bereits erwähnt (77,78).

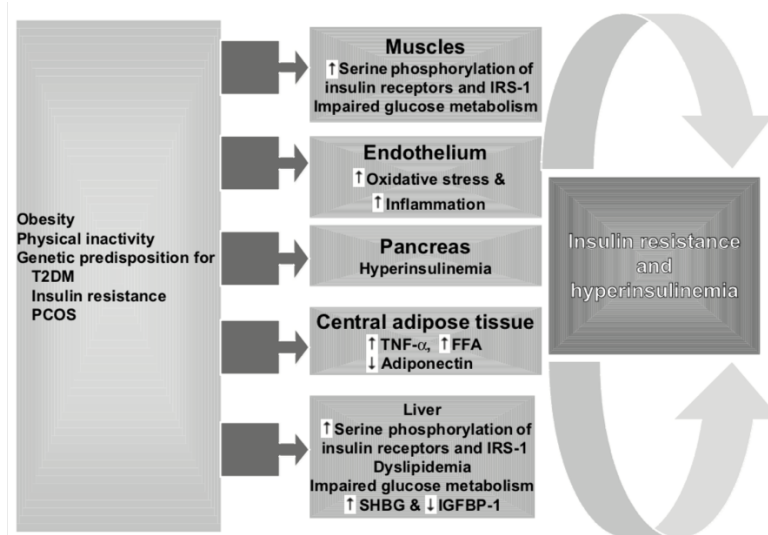


Abbildung 10.: Schematische Darstellung der IR-begünstigenden Faktoren beim PCOS (75).

Ebenfalls eine zentrale Rolle in der Induktion der Insulinresistenz nimmt die PCOS-typische rumpfbetonte Fetteinlagerung ein (55). Die Adiponektin-Sekretion im SAT ist unzureichend, was die IR fördert (15) und die Adipositas-assoziierte Produktion von freien Fettsäuren ist erhöht, wodurch die Glukoseaufnahme in die Zellen verhindert wird (84,85).

Zusätzlich ist die Expression des proinflammatorischen Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) im VAT und Muskelgewebe von adipösen Individuen größer, was die Serin-Phosphorylierung des Insulinrezeptor-Substrates (IRS-1) verursacht und über diese Signalhemmung ebenfalls zur IR beiträgt (15,75).

Allerdings gaben Carmina et al. (86) zu bedenken, dass IR sowohl bei PCOS-Patientinnen mit und ohne überschüssiges (Viszeral-) Fett detektierbar ist. Daher sei die Insulinresistenz beim PCOS zwar grundsätzlich unabhängig von der abdominellen Fettleibigkeit, aber deutlich verstärkt, wenn ein Überschuss an VAT bestehe.

Begründet wird die Unabhängigkeit in drei Wegen:

- 1) Die TNF- α -Aktivität ist Adipositas-unabhängig bei PCOS erhöht (75).
- 2) Die β -Zell Dysfunktion tritt gewichtsunabhängig auf (76).
- 3) Die fehlerhafte intrazelluläre Insulin-Signal Weiterleitung ist in allen Body-Mass-Index (BMI)-Größen zu finden (87).

Generell fördern auch oxidativer Stress und eine Low-grade Entzündung die Produktion von TNF- α (88) und führen so zu davor genannten Effekten.

Auch Cortisol verursacht IR indem es sowohl intrahepatische als auch extrahepatische Mechanismen modifiziert. Intrahepatisch ist die Insulin-induzierte Hemmung der Glukose-Produktion gestört und extrahepatisch ist die Glukose-Utilisation vermindert. (89) Die Folge ist eine Hyperinsulinämie, die sich fördernd auf die Androgenproduktion auswirkt. (48)

Die Folgen

In der Folge fördert Insulin die Androgen-Ausschüttung durch mehrere Prozesse:

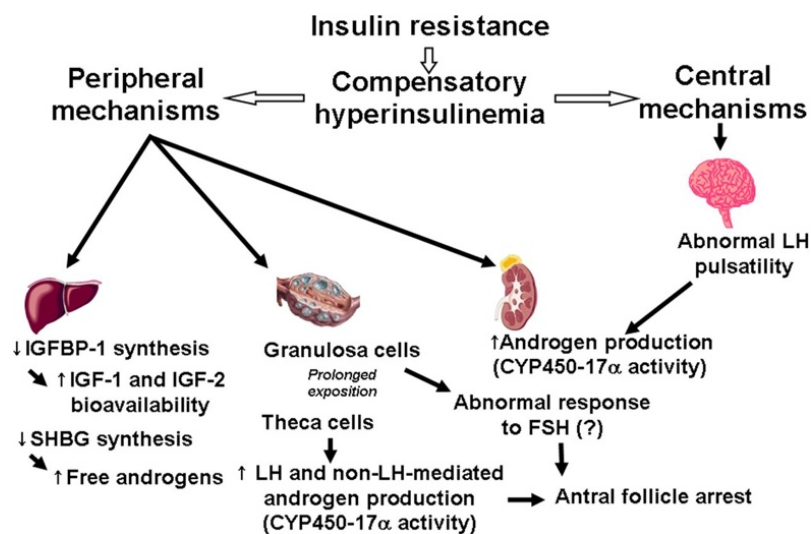


Abbildung .: Die Mechanismen hinter der Verbindung von PCOS und IR (90).

Insulin fördert zentral die CRH-Sekretion des Hypothalamus und erhöht peripher die Sensitivität der Nebennierenrinde für ACTH. Dadurch erhöht sich die Androgensynthese und -Sekretion aus der Nebennierenrinde. (30,91)

Außerdem hat es einen stimulierenden Effekt auf die Gonadotropin-Ausschüttung (LH und FSH) aus dem Hypophysenvorderlappen (92) und führt damit sowohl selbst als auch über das vermehrte LH im Ovar zur Bildung von Steroidhormonen (93).

Hier ist interessant, dass die Thekazellen des Ovars stets insulinresistent bleiben und auf Hyperinsulinämie mit einer noch größeren Androgenproduktion reagieren. Dies ist gegensätzlich zu der bekannten insulinresistenten Wirkung, die sich bei langandauerndem Überangebot im Muskel- und Fettgewebe einstellt (94).

Zusätzlich wirkt Insulin in der Leber und verringert dort die Bildung von dem SHBG, was ebenfalls zu einer erhöhten Konzentration an freiem, aktivem T führt (59).

Insulinresistenz kann aber noch mehr: Durch die begleitende Hyperglykämie kann es die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) Konzentration erhöhen. ROS und der

verbundene Anstieg des oxidativen Stresses, aktivieren den Nuclear factor κ -light-chain-enhancer` (NF κ B) in B-Zellen, wodurch die Entzündungsfaktorsynthese unterstützt wird. So entstehen große Mengen vom TNF- α , was die Insulinresistenz wiederum verstärkt. (88)

Nun liegt die Annahme nahe, die Insulinresistenz und die resultierende Hyperinsulinämie wären die hauptsächlichen Pathomechanismen hinter dem Syndrom. Jedoch zeigten Moghetti et al. (22), dass wechselwirkend auch die Insulinresistenz vom vorherrschenden Phänotyp bestimmt wird. Sie fanden dabei heraus, dass die Phänotypen A (*HA + Oligo + PCOM*) und B (*HA + Oligo*) zu 80% und der Phänotyp C (*HA + PCOM*) zu 65% insulinresistent ist. Beim Phänotyp D (*Oligo + PCOM*), welcher als einziger ein normoandrogenes Profil aufweist, sind nur noch 38% von der Insulinresistenz betroffen. Begründet wurde dieser Umstand durch die dominierende Assoziation zwischen HA und Insulinresistenz, wenn auch schwierig zu evaluieren ist, was Ursache und was Folge darstellt (95).

Somit bedeutet das, je weiter der HA ausgebildet ist, desto ausgeprägter ist auch die Insulinresistenz und vice versa (22).

IR ist also zwar häufig und wichtig in der Pathophysiologie des PCOS, stellt aber kein universelles Merkmal des Syndroms dar, da es auch Patientinnen gibt, die ganz ohne Insulin-Resistenz bleiben (96).

Metabolisches Syndrom und PCOS

Bei 46%, also knapp bei der Hälfte aller PCOS-Patientinnen sind die Kriterien des metabolischen Syndroms erfüllt (97). Zu dieser weitreichenden Stoffwechselstörung zählen die schon erörterte Insulinresistenz, sowie die noch folgenden Adipositas, Dyslipidämien und die Hypertonie (97), welche das Erkrankungsrisiko für kardiovaskuläre Krankheiten, DMT2 oder ein Endometriumkarzinom in die Höhe treiben (98).

Wenn auch nicht immer das Vollbild des metabolischen Syndroms vertreten ist, so lassen sich doch zumindest einzelne Merkmale (und Kombinationen dieser) im Zusammenhang mit PCOS finden. Darum sollen im Folgenden die restlichen Kennzeichen des metabolischen Syndroms, den Rahmen zur Erörterung weiterer PCOS-Symptomatik und Pathologie halten.

Adipositas

Bis zu 60% der PCOS-Frauen sind übergewichtig (BMI 25-29,9) oder fettleibig (ab BMI 30), abhängig von ihrer ethnischen Zugehörigkeit, geographischen Lokalisation und dem sozialen Status (99). Da HA ein Haupteffekt beim PCOS ist (2) und Androgene eine rumpfflastige Fettgewebsanreicherung bevorzugen (13), ist es nicht verwunderlich, dass bei PCOS-Frauen (mit erhöhtem und normalem BMI) der abdominelle Fettverteilungstyp häufig ist. (99)

Echiburu et al. (100) fanden eine positive Assoziation zwischen der Menge an Rumpffettgewebe und der Größe der subkutanen Adipozyten. Demnach sind bei der rumpfbetonten Fettverteilung im SAT vermehrt hypertrophe Adipozyten zu finden, die ihrerseits mit dem Testosteronspiegel und der Menge an VAT assoziiert sind. Androgene (T) stimulieren dabei die subkutanen Adipozyten zum Wachstum (51) und inhibieren ihre Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten (101). Diese vergrößerten subkutanen Adipozyten sezernieren dann weniger Adiponektin und sind weniger Insulin-sensitiv, als kleine, frisch differenzierte Adipozyten (52).

Die schon angesprochene Vermehrung von VAT (53) kommt ihrerseits zustande, da die hohen Androgen- und Insulinkonzentrationen beim PCOS die bereits limitierte Fetteinlagerungs- und Wachstumskapazität des SAT weiter herabsetzt (54). Dadurch muss das überschüssige Fett hauptsächlich vom VAT, aber auch von der Leber, dem Pankreas und den Skelettmuskelzellen aufgenommen werden (53).

Selbstverstärkend werden vom abdominalen Fettgewebe selbst auch potente Androgene produziert, da dort das (weniger potente) Androstendion in T umgewandelt werden kann (48).

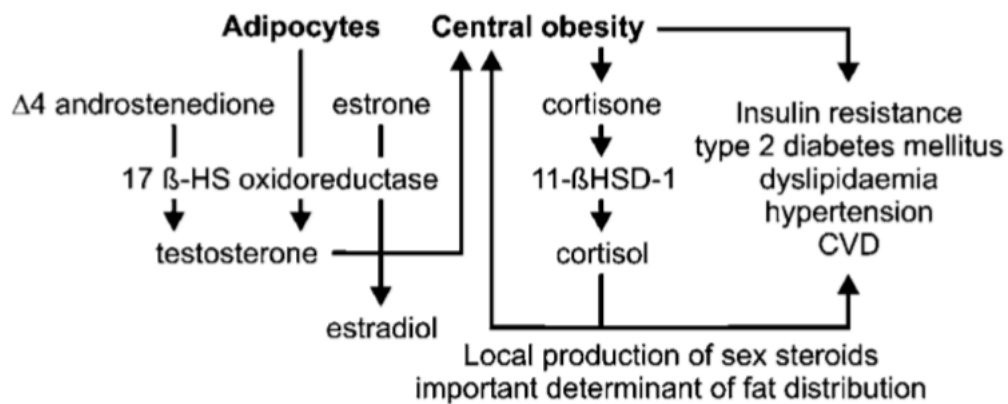


Abbildung 11.: Der Fettgewebs- und Steroidhormonmetabolismus beim PCOS (48).

Die Grafik beschreibt zusätzlich das Vermögen der Adipozyten, die Cortisol-Serumspiegel zu erhöhen. Erhöhtes Cortisol führt im Weiteren zur Insulinresistenz, was wiederum auf die Vermehrung zentraler Adipozyten wirkt. (48)

Carmina et al. (86) untersuchten 2007 die Körperfettverteilung beim PCOS und fanden bei 70% der adipösen Patientinnen und bei 30% der normalgewichtigen PCOS-Frauen eine abdominell-viszerale Fettverteilung.

Allerdings wiesen auch 50% der adipösen nicht-PCOS-Patientinnen diesen viszeralen Verteilungstyp auf, wodurch die viszerale Adipositas in erster Linie mit Adipositas selbst assoziiert sein könnte.

Sie stellten auch fest, dass die erhöhten Insulinspiegel und die verminderte Insulinsensitivität bei allen PCOS-Patientinnen zu finden ist, was in Kohärenz mit den drei Wegen aus dem Kapitel *Insulinresistenz – Pathophysiologie* tritt.

Auch Diamanti-Kandarakis et al. (48) unterstützten diese Ansicht und postulierten, dass sich viszerale Adipozyten von PCOS-Frauen anders verhalten würden. Sie kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass ihr metabolisch-abnormes Verhalten in einem defekten intrazellulären Insulinsignal begründet liegt.

Zusätzlich wiesen sie darauf hin, dass die Lipolyse-Aktivität in diesen Adipozyten verstärkt ist. Das ist zum einen auf den TNF- α zurück zu führen, der in den Fettzellen von adipösen Individuen verstärkt ausgebildet wird (75). Dieses Adipokin verstärkt die Mitogen-activated protein Kinase der Adipozyten und stimuliert darüber die Lipolyse (84,102). Zum anderen spielt die Fettzellgröße eine entscheidende

Rolle, da sie mit ihrem vergrößerten Volumen dem cAMP mehr Platz bieten kann. Das intrazelluläre Hungersignal cAMP trägt das Potenzial, Energiereserven frei zu machen in sich und führt darüber zum vermehrten Aufkommen von freien Fettsäuren. (102)

Fettgewebshormone

Das Fettgewebe hat unterschiedlichste Aufgaben. Eine davon ist die Produktion sogenannter Adipokine. Als Adipokine werden Signalstoffe bezeichnet, die vom Fettgewebe - besonders vom VAT - produziert werden.

- ◆ Leptin, das im Hypothalamus ein Sättigungsgefühl auslöst (103).
- ◆ Adiponektin, das die Insulin Sensitivität erhöht und beim metabolischen Syndrom und DMT2 erniedrigt ist (104).
- ◆ Interleukin-6 (IL-6), ein proinflammatorisches Zytokin (105).
- ◆ TNF- α , ein Zytokin mit Appetitsenkender Wirkung im Hypothalamus, das in selbigem die CRH Ausschüttung erhöht und in der Leber sowie in peripheren Geweben die Insulinresistenz verstärkt (106).

Außerdem besitzt das Fettgewebe bei beiden Geschlechtern einen eigenen Östrogenmetabolismus, da das Enzym Aromatase in den Adipozyten vorhanden ist und unabhängig vom Hypothalamus Östrogen produziert (103).

Wie weitläufig bekannt, ist die viszerale Adipositas stark mit IR, kardiovaskulären Krankheiten und Dyslipidämien assoziiert (107).

Aber entgegen lang gehegter Meinungen, ist auch das SAT metabolisch aktiv (86). Tatsächlich konnten Echiburu et al. (100) einen erhöhten Leptin/Adiponektin Quotient, der einen guten Entzündungsmarker darstellt (108) und eine vermehrte Makrophagen Infiltration im SAT festmachen. Dies steht in Korrelation mit der erhöhten Anzahl an hypertrophen Adipozyten im SAT, da diese anfälliger für Entzündung, Apoptose, Fibrose und dem Freisetzen freier Fettsäuren sind (102,109,110).

Dyslipidämie

Die Dyslipidämie tritt mit einer Prevalenz von 70% bei PCOS-Patientinnen auf (111). Konkret findet man erniedrigte HDL-Werte bei erhöhten Triglyzerid (TAG)-, LDL- und VLDL-Werten, die das hohe atherogene Potenzial begründen (16).

Peter Arner (102) postulierte in seiner Arbeit, dass sich die Menge der bei der Lipolyse freiwerdenden Fettsäuren proportional zur Menge an Adipozyten verhalte. Zusätzlich gibt es körperregionale Unterschiede bezugnehmend auf die Lipolyse, wonach mehr Fettsäuren aus dem VAT als aus dem subkutanen Pool entlassen werden.

Nach schon erwähnten Arbeiten von Carmina et al. (86) ist die abdominale Adipositas bei PCOS-Frauen weit verbreitet. Dies in Kombination mit vermehrt auftretender Lipolyse [siehe Kap. *Adipositas*] (48), führt zu einer großen Menge an freien Fettsäuren, die einen entscheidenden Beitrag in der Entstehung von Dyslipidämien leisten. (102)

Lipide

Cholesterin, TAG und Phospholipide sind die wichtigsten Lipide, die mit der Nahrung aufgenommen werden. Da Lipide schlecht wasserlöslich sind, werden sie in Form von Lipoproteinen im Blut transportiert. Besagte Lipoproteine weisen in folgender absteigenden Reihenfolge einen anderen TAG Gehalt auf:

- ◆ Chylomikronen transportieren die mit der Nahrung aufgenommenen TAGs in den Blutkreislauf. Sie enthalten die meisten TAG.
- ◆ VLDL werden in der Leber gebildet und transportieren endogen gebildetes TAG in extrahepatische Gewebe.
- ◆ LDL werden in der Leber aus Intermediate density Lipoproteins (IDL) gebildet und sind für den Cholesterintransport in extrahepatische Gewebe verantwortlich.
- ◆ HDL, das „gute Cholesterin“, sammelt Cholesterin aus extrahepatischen Geweben ein und transportiert es zur Leber, wo es ausgeschieden werden kann. (112)

Da das VAT über die Portalvene mit der Leber kommuniziert, hat das vermehrte Freisetzen von freien Fettsäuren dort direkt einen VLDL-erhöhenden Effekt, der zur Hypertriacylglycerinämie führt (16,102).

Hypertonie

Die Hypertonie ist nicht nur Teil des metabolischen Syndroms, sondern auch häufig bei PCOS-Frauen anzutreffen. So weisen PCOS-Frauen über den Tag gemessen, einen erhöhten systolischen Blutdruck sowie einen schnellen Puls auf (113). Auch

in der Nacht ist eine Blutdruck-Pathologie zu erkennen: Die physiologisch vorgesehene Blutdruck-Absenkung von 10% fehlt (114).

Zu Grunde liegt wahrscheinlich einmal mehr die Insulinresistenz, die in den glatten Muskelzellen der Gefäßwand zur Hypertrophie führt. Dadurch verändert sich die Compliance der Gefäßwand, wodurch die vasoreaktive Vasodilatation nicht mehr reibungslos funktioniert, das Renin-Angiotensin-Aldosteron System aktiviert wird und zusammen mit vermehrter Natrium (und Wasser)-Retention (115) den Blutdruck auf Werte über 140 systolisch und 90 diastolisch erhöht (116).

1.2.4 Weitere Pathophysiologien

Entzündung und PCOS

Immer mehr Forschungsergebnisse beleuchten den Zusammenhang zwischen chronischer Entzündung und adipositasbedingter metabolischer Dysfunktion (107). Diamanti-Kandarakis et al. (48) erarbeiteten in diesem Zusammenhang eine Tabelle (s.u.) mit metabolischen Risikomarkern, die auf eine chronische low-grade Entzündung bei PCOS-Frauen hinweisen und einen wichtigen Teil zur Progression von Atherosklerose beitragen.

<i>Metabolic marker</i>	<i>Directional change</i>
Triglycerides	Increased ^{28,29}
C-reactive protein	Increased ^{30,32}
Advanced glycation end products (AGE)	Increased ³³
Leukoctye count	Increased ³⁴
Endothelial dysfunction	Increased ^{35,36}
Metabolic syndrome	Increased ³⁷
PAI-1	Increased ³⁸
Endothelin-1	Increased ³⁹
ICAM/VCAM	Increased ³²
Fibrinolytic activity	Decreased ⁴⁰
HDL cholesterol	Decreased ^{28,29}

Abbildung 12.: Metabolische Anomalien beim PCOS, die ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko anzeigen (48).

Auch die Expression von proinflammatorischen Adipokinen verhält sich direkt proportional zu Adipositas und dem BMI (117). Ebenso steigen IL-6 und das C-reaktive Protein (CRP) parallel mit dem Grad der Adipositas und geben hierbei einen guten prädiktiven Wert für die Erkrankungswahrscheinlichkeit bei DMT2 an (118). Zusätzlich lässt sich im SAT ein erhöhter Leptin/Adiponektin-Quotient, der als aussagekräftiger Entzündungsmarker gehandelt wird (108), sowie eine vermehrte Makrophagen-Infiltration festmachen (100).

An dieser Stelle sei erwähnt, dass das SAT mehr für die Sekretion von antiinflammatorischen Faktoren wie Adiponektin zuständig ist und damit zum Entzündungsgeschehen durch deren unzureichende Sekretion beiträgt, während das VAT direkt proinflammatorische Faktoren wie den TNF- α und IL-6 ausschüttet [Carvalho et al. (15) nach Santos und Torrent 2010].

TNF- α inhibiert das Signal des IRS-1 und fördert damit die Insulinresistenz [Carvalho et al. (15) nach Santos und Torrent 2010]. Zudem stimuliert TNF- α die Lipolyse in Adipozyten, wodurch sich die im Serum zirkulierenden freien Fettsäuren vermehren (84). Damit und mit der induzierten Makrophagen-Einwanderung in das Gefäßendothel (119) leistet der Tumor-Nekrosefaktor einen erheblichen Beitrag zur Entwicklung der Atherosklerose (119) und kardiovaskulären Krankheiten (84).

IL-6 löst ähnliche Prozesse aus. Es führt ebenfalls zu Insulinresistenz (107) und Dyslipidämien und wirkt damit auch bei der Progression von kardiovaskulären Krankheiten mit (120).

Zusätzlich sinkt beim Vorliegen hoher TNF- α - und IL-6-Werte, sowie bei oxidativem Stress und Hypoxie die Adiponektin Ausschüttung (121), wodurch sich die inverse Assoziation zu Insulinresistenz und dem DMT2 manifestiert (122). Auch Kershaw und Flier (122) fassten anhand mehrerer Arbeiten die antidiabetischen, antiinflammatorischen und antiatherogenen Effekte des Adiponektins zusammen, die bei PCOS aufgrund des Mangels von ebendiesem nicht wirken können. Carvalho et al. (15) zitierten eine Arbeit von Santos und Torrent, in der gleiche Ergebnisse, sowie die Wirkung auf den Lipidmetabolismus diskutiert werden. Sie fanden dabei eine Reduktion der Triglyceridproduktion und eine Verminderung der freien Fettsäuren im Serum aufgrund der positiven Adiponektin-Wirkung.

Während chronische low-grade Entzündungen mit einer gestörten Sekretion von Adipokinen, Chemokinen und Interleukinen assoziiert sind (123), gibt es mittlerweile auch alternative Marker, die die Betrachtungsweise der Entzündung bei PCOS noch einmal verändern. So brachten Carvalho et al. 2017 (124), Haptoglobin, ein Akute-Phase-Protein mit PCOS in Zusammenhang und stellten eine Assoziation zum allgemein bekannten Entzündungsmarker CRP und pro-oxidativen Prozessen her. Im gleichen Jahr wurden Carvalho et al. (125) auf das Vorhandensein von Leukocyte Derived Microparticles (LMPs) aufmerksam, die in extrazellulären Vesikeln auf ihren Einsatz bei der Zell-Zell Kommunikation warten. Carvalho et al.

fassten ihr Aufgabengebiet wie folgt zusammen: LMPs modifizieren die Endothelfunktion und rekrutieren Entzündungszellen ins Endothel, fördern die leukozytäre Interaktion und sind Teil der Koagulation sowie Plättchenaktivierung. Somit, schlussfolgerten sie, könnten LMPs bei der veränderten Blutgerinnung und Entzündung involviert sein (15).

Oxidativer Stress und PCOS

Oxidativer Stress ist ein Zustand, in dem die Menge an zellschädigenden Oxidantien und schützenden Antioxidantien nicht ausgeglichen ist und es zur überschießenden Bildung von ROS und/oder reaktiven Stickstoffspezies (RNS) kommt. Da oxidativer Stress in der Pathophysiologie vieler verschiedener Krankheiten auftaucht, ist sein Vorkommen beim PCOS nur naheliegend (126,127).

Auswirkungen von oxidativem Stress (126) [Ein Auszug]

- ◆ Oxidativer Stress aktiviert Transkriptionsfaktoren, die die Expression von proinflammatorischen Zytokinen, die Zelldifferenzierung und Apoptose regulieren. Damit trägt auch oxidativer Stress zur Entstehung von low-grade Entzündungen, wie sie beim PCOS zu finden sind, bei. Beispielsweise wird der Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert (126), der seinerseits die Produktion des wohlbekannte TNF- α fördert (88).
- ◆ ROS katalysieren die Advanced-Glycation-Endproduct (AGE) Entwicklung aus Kohlenhydraten, indem die Zucker die mit Lipiden oder Proteinen reagieren (128). Das bekannteste Protein, das mit Glukose reagiert, ist wohl das Hämoglobin, dessen glykierte Form HbA1c zur Langzeitzuckermessung beim DMT2 verwendet wird (129). Besagte AGEs induzieren wiederum oxidativen Stress, der schlussendlich zu Entzündung und Gewebeschäden führt (130).

Diamanti-Kandarakis et al. (131) zeigten zudem eine positive Korrelation zwischen AGEs und dem Serum-T-Spiegel. In einer Tierstudie konnten sie diese Korrelation mit dem Fund von AGE-Ablagerungen in den Theka-Zellen des Ovars und einer vermehrten Ausbildung von AGE-Rezeptoren (RAGE) in den Granulosa-Zellen weiter unterstützen (132).

Genetik

Escobar-Morreale et al. (26) präsentierten 2005 die Hypothese einer grundlegenden genetischen Variabilität bei PCOS-Frauen, welche sowohl die Androgenbiosynthese und -funktion selbst, als auch die anderen schon genannten Teile der Pathogenese wie Insulinresistenz, Metabolisches Syndrom mit Adipositas und einen genetisch proinflammatorischen Phänotyp beinhaltet. 2007 führten Escobar-Morreale und San Millan (55) diese Hypothese weiter und postulierten, dass es sowohl unterschiedliche genetische Belastungsgrade als auch unterschiedliche Ausprägungen von Triggerfaktoren wie abdominale Adipositas und IR gibt.

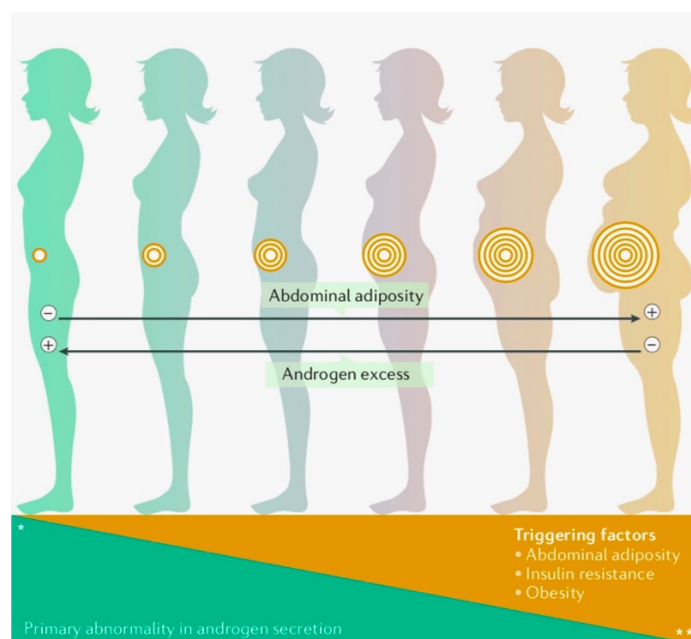


Abbildung 13.: Die pathophysiologische Heterogenität beim PCOS (6).

Die Abbildung zeigt PCOS-Patientinnen mit unterschiedlichen Körperformen. Frauen, die dem türkisen Teil angehören, weisen den höchsten genetischen Belastungsgrad auf und benötigen quasi keinerlei Triggerfaktoren, um das Bild des PCOS zu generieren. Gegenteilig verhält es sich auf der anderen Seite des Spektrums, auf dem die Frauen in Gelb voll ausgebildete Triggerfaktoren tragen und die genetische Variation nur ein Sprungbrett ist um das PCOS zu manifestieren (6).

Weitere Funde der Wissenschaft, die PCOS-Familien in ihrem Vorhandensein fundiert unterstützen sind:

Kahsar-Miller et al. (24), die schon 1998 herausfanden, dass das Risiko einer Frau an PCOS zu erkranken 40% beträgt, wenn ihre Schwester auch betroffen ist.

Legro et al. (25), die zeigten, dass Brüder von PCOS-Frauen analog zu ihnen ebenfalls erhöhte DEHAS-Spiegel aufweisen.

Sam et al. (133), die Schwestern von PCOS-Frauen mit normaler Menses, aber ebenfalls erhöhten Androgenspiegeln untersuchten und analog zu ihren Müttern (134) erhöhte Blutfettwerte und ein erhöhtes Risiko am metabolische Syndrom zu erkranken, ausmachen konnten.

Allerdings muss die große Hoffnung, die in die Genetik gesetzt wurde, ganz klar relativiert werden. PCOS beschreibt eine sehr heterogene genetische Zusammensetzung, weshalb es schier unmöglich ist, die Pathogenese allein auf einzelne Gene zurückzuführen. (135,136)

Weitere Forschungsbemühungen werden nunmehr u.a. in einem internationalen PCOS-Konsortium (unter Beteiligung der Grazer Forscher*innen) fortgeführt.

1.3 Wie man die Kontrolle zurückgewinnt - Therapieoptionen

1.3.1 Lifestyle

Eine randomisierte Studie aus dem Jahr 2011, untersuchte den Einfluss von diätischen Maßnahmen und/oder körperliche Bewegung auf die Funktion der Ovarien. Nach 4 Monaten konnte sie eine Reduktion des BMI um 6% bei rein diätischer Intervention, um 3% bei physischer Intervention und 5% mit einer Kombination aus Beiden erzielen. In der Folge stiegen die SHBG Werte, was zu einer Senkung des freien Testosterons führte und bei 96% der Teilnehmerinnen den Menstruationszyklus wiederherstellte. Nybacka et al. resümierten, dass die Lifestyleänderung bezogen auf die Diät als auch auf die körperliche Bewegung zu gleichen Resultaten führte und der zugrunde liegende Mechanismus in beiden Fällen Einfluss auf die Insulinsensitivität nimmt. (137)

Pasquali und Gambineri et al. (138) erzielten mit einer einjährigen hypokalorischen Diät bei PCOS-Patientinnen eine BMI-Reduktion 38 kg/m² auf 34 kg/m². Dieses moderate Ergebnis reichte schon aus, um signifikante Verbesserungen bei T-Spiegeln, Hirsutismus, Menses, Insulin-Sensitivität und HDL-Werten festzustellen. Tatsächlich werden in diesem Zusammenhang sämtliche PCOS-Symptome mit einer Gewichtsreduktion, ungeachtet der diätischen Zusammensetzung mit welcher diese herbeigeführt worden ist, verbessert (139).

Die Reduktion des kardiovaskuläre Risikos profitiert jedoch laut mehreren Studien (140,141) sehr wohl von einer dezidierten Umstellung der Ernährung auf Lebensmittel mit niedrigem glykämischen Index. Dazu zählen Kohlenhydrate, die den Blutzucker nur langsam ansteigen lassen, wie etwa Vollkorngetreide (142). Der Hauptnutzen für das kardiovaskuläre System sei die einhergehende Senkung des LDL-Cholesterins (140) und die Verbesserung der Insulin-Sensitivität (141) durch diese Diät.

An dieser Stelle muss allerdings auch die bescheidene Aussicht darauf, die Gewichtsreduktion aus eigener Kraft aufrecht zu erhalten, erwähnt werden. Ein 898 Papers enthaltender, systematischer Review fasste demnach die medianen Erfolgsrate, das reduzierte Gewicht langfristig zu halten, mit 15% zusammen (143).

1.3.2 Adipositas-Chirurgie / bariatrische Chirurgie

Als bestimmt drastischste Maßnahme, ist in Anlehnung an den letzten Absatz auch die chirurgische Intervention eine Möglichkeit einen niedrigeren BMI und die damit einhergehenden Verbesserungen des Metabolischen Syndroms und Reproduktionsfähigkeit der PCOS-Frauen zu erzielen (144).

Die European Society of Endocrinology führt die Adipositas-Chirurgie als Langzeitlösung an und betont hierbei die Vorteile vor allem für morbid übergewichtige PCOS-Patientinnen (145). Als morbid übergewichtig wird in diesem Kontext ein BMI von $>35-40\text{kg/m}^2$ beschrieben, der zusammen mit erfolgloser, intensiver Lifestylemodifikation (reduzierte Kalorienaufnahme, Sport, Verhaltensänderungen für mindestens 6 Monate) als Indikation für eine Adipositas-Chirurgie dient (146).

Eine, die generelle Population widerspiegelnden Meta-Analyse zeigte mit dieser Lösung eine Gewichtsreduktion von 38kg im ersten Jahr und eine Regression des DMT2 bei 78% (147). Balen et al. (146) fassten anhand mehrerer Arbeiten, weitere Faktoren zusammen die sich in Bezug nehmend auf das PCOS durch eine bariatrische Operation verbessern. Dazu zählten Fruchtbarkeitsmarker, die Anovulation inkludieren, sowie Hirsutismus, IR und Libido.

Allerdings ist die Liste der Nebenwirkungen ebenso beeindruckend. Signifikante Komplikationen wie Malabsorption und psychische Probleme wie Essstörungen zählen zu den häufigsten (148). Auch das SGA (small for gestational age) stellt bezogen auf die Malabsorption, für die Säuglinge ein Problem dar (149).

Demnach ist jede Schwangerschaft eine PCOS-Patientin nach einer bariatrischen Operation als Risikoschwangerschaft zu werten und muss unbedingt engmaschig überwacht werden (146).

1.3.3 Metformin – der Insulin-Sensitizer

Während Metformin der Lifestyleänderung entsprechend ähnliche Effekte auf die Gewichtsreduktion aufweist, ist es bei der Reduktion der zirkulierenden Androgenen aber deutlich überlegen. Genauer macht die Kombination aus Lifestyle und Metformin den Unterschied, wodurch ein niedrigerer BMI und eine Reduktion des SAT sowie ein verbesserter Menstruationszyklus im Vergleich zu einer solitären Lifestyleintervention erreicht werden konnte. (150)

Ein plausibler Mechanismus in der Senkung des HA umfasst dabei die verbesserte Insulinsensitivität in der Leber und peripheren Geweben, die mit einem direkten Effekt auf ovarielle Steroidgenese einhergeht (151). Es wirkt demnach weniger Insulin auf die Ovarien, wodurch die ovarielle und adrenerge Androgensekretion verringert wird (152).

Weitere Mechanismen beschreiben die reduzierte (insulininduzierte) LH-Sekretion aus der Hypophyse und den erhöhten (insulingehemmten) SHBG-Spiegel aus der Leber. Beides ebenfalls aufgrund der verbesserten Insulinsensitivität. (152)

Zusätzlich häufen sich die Belege dafür, dass Metformin unabhängig der Insulinresistenz und Glukoseintoleranz die Reproduktionskraft verbessert (153). Es soll die Ovulationsfähigkeit und die Schwangerschaftsraten bei PCOS-Patientinnen erhöhen, wenngleich Tang et al. (154) aber die mangelnde Evidenz für die Erhöhung der Lebendgeburtenrate durch dieses Medikament betont.

Somit sollen bezogen auf die Ovulationsinduktion, Clomifen (Östrogen-Rezeptor-Antagonist) und Letrozol (Aromatasehemmer) [beide siehe nächster Punkt] als erste Wahl verwendet werden (146) und Metformin soll hauptsächlich bei Patientinnen mit dokumentierter Störung der Glukosetoleranz zur Anwendung kommen (155).

Diamanti-Kandarakis et al. (156) zeigten außerdem, dass sich eine Metformin-Behandlung positiv auf die flussvermittelte Vasodilatation, ein frühes Indiz des kardiovaskulären Risikos, auswirkt. Damit verbessert Metformin die kardiovaskulären Anomalien des PCOS.

Zusammenfassend sei gesagt, dass Metformin bei ausgeprägten metabolischen Störungen seine Berechtigung hat (155), aber in der Behandlung der psychisch sehr belastenden dermatokutanen Symptome seine Lücken aufweist und hier nicht wirkungsvoll ist (145,154,157). Außerdem sind die hauptsächlich gastrointestinalen Nebenwirkungen aufgrund der geringen Dosis, die bei PCOS eingenommen wird, zwar mild, aber dennoch nicht fehlend (157).

1.3.4 Ovulationsinduktoren

Clomifen

Der Wirkmechanismus des Östrogen-Rezeptor-Antagonisten umfasst eine Änderung der GnRH-Pulsfrequenz im Hypothalamus, mit folgender Bevorzugung

der FSH-Ausschüttung aus der Hypophyse, wodurch der Follikelarrest unterbrochen wird. (146)

Clomifen als empfohlene erst-Linien Therapie (158) erzielt eine Ovulationsrate in 73%, eine erfolgreiche Schwangerschaftsinduktion in 36% und in 29% eine Lebendgeburt innerhalb von 6 Monaten (159).

Jedoch ist das Risiko einer Mehrlingsschwangerschaft ebenfalls mit bis zu 11% gegeben. Darum empfiehlt sich die konsequente ultraschallgestützte Therapie-Überwachung. Diese ermöglicht eine individuelle Dosisanpassung an die Patientin, um die Hyperstimulation der Ovarien zu minimieren. (160)

Leider sind ca. 20% der behandelten Patientinnen resistent gegenüber der Clomifen-Wirkung und bleiben anovulatorisch (146). Imani et al. (161) bemerkten hierzu, dass diese Patientinnen jedoch übergewichtiger und insulinresistenter wären, sowie einen höheren HA aufweisen würden als die, die auf das Präparat reagierten.

Die Nebenwirkungen schließen Sehstörungen (unter welchen die Therapie sofort abgebrochen werden muss), Flush, Brustspannen, Schwindel und Übelkeit mit ein (146). Zudem liegt es in der Wirkungsnatur eines Antiöstrogens, die (östrogeninduzierte) Endometriumproliferation nicht zu unterstützen, was eine schlechtere Voraussetzung für die erfolgreiche Induktion der Schwangerschaft darstellt (146,162).

Letrozol

Der Aromatasehemmer besorgt seine Wirkung nicht wie Clomifen direkt über zentrale Rezeptoren, sondern greift im Schritt davor ein und verhindert schon die Entstehung von Östrogenen aus Androgenen. Das Ergebnis wird zwar durch einen anderen Mechanismus erreicht, bleibt aber das gleiche, da auch hier weniger Östrogen im Hypothalamus wirken kann, woraufhin dieser genauso die GnRH-Ausschüttung erhöht. In der Folge unterstützt die ebenfalls vermehrte FSH-Sekretion die regelrechte Follikelreifung. (163)

Die Ovulationsrate beträgt mit dieser Therapie bis zu 84% und eine Schwangerschaftsinduktion kann in bis zu 27% erzielt werden (163). Die Lebendgeburtenrate ist bei 27% datiert (164).

Wenn auch durch den anderen Wirkmechanismus die Nebenwirkungen durch die Östrogenrezeptor-Hemmung ausbleiben, so treten an deren Stelle Probleme wie

gastrointestinale Störungen, Flush, Kopfschmerzen, Rückenschmerzen und Schwächegefühl. (146)

Zudem ist zu Beginn ein erhöhtes fetales Risiko für kongenitale Anomalien in den Fokus gerückt, das Balen et al. (146) allerdings aufgrund der Ergebnisse weiterführender Arbeiten dementieren konnten.

In Summe plädieren Balen et al. (146) dafür, Letrozole als zweit-Linien Therapie zu verwenden, wenn eine Clomifen-Resistenz und Anovulation oder Infertilität ohne andere Ursache besteht.

Nicht zuletzt sei auch noch der erheblichen Kosten-Mehraufwand in Bezug auf beide vorgestellten Ovulationsinduktoren zu erwähnen (157).

1.3.5 „Die Pille“

Der letzte Absatz hat die überlegene Wirkung von Metformin gegenüber Lifestyleveränderungen in der Behandlung des HA beim PCOS gezeigt. Allerdings hat Metformin keinen Effekt auf die dermokutanen Symptome des HA. Diese seien Akne, Hirsutismus und Alopezie. (145)

Hier entspringt die Relevanz der Antibabypille in der Behandlung des PCOS, die sich langfristig um die hyperandrogenen Manifestationen und menstruellen Unregelmäßigkeiten kümmern kann (145,165,166).

Alpañés et al. (167) beispielsweise, verglichen die Wirksamkeit von Kombinierten oralen Kontrazeptiva (*30 μ g Ethinylestradiol (EE) und 150 μ g Desogestrel*) plus Spironolacton (*Antiandrogen*) mit Metformin. Bei den Markern Hirsutismus, Testosteronspiegel und menstruelle Dysfunktion war die Variante der kombinierten oralen Kontrazeption zusammen mit dem Spironolacton dem Metformin klar überlegen.

Der Wirkmechanismus, der bei uns vorwiegend eingesetzten Kombinationspräparate ergibt sich dabei aus dem Zusammenspiel der Östrogen- und Gestagen-Komponente. Beide Komponenten führen zu einer negativen Rückkoppelung im Hypothalamus, wodurch die GnRH-Sekretion supprimiert wird, was im Folgenden sowohl die FSH-Freisetzung als auch den LH-Peak vor der Ovulation und die Ovulation selbst hemmt. Außerdem erhöht das Östrogen die SHBG-Bildung in der Leber (168) und die oralen Kontrazeptionspräparate führen durch einen noch nicht entdeckten Mechanismus auch zur Androgen-Senkung in

den Nebennieren (165). Das Gestagen bewirkt zusätzlich eine Verdickung des Zervixschleims, eine Abnahme der Endometriumdicke und die Herabsetzung der Tubenmotilität. (169)

Progestin Type	Progestin Dose, mg	EE Dose, μg
First generation		
Norethindrone	1	20
Norethindrone	1.5	30
Norethindrone	0.4/0.5/1	35
Norethindrone	1	50
Ethinodiol diacetate	1	35/50
Second generation		
Norgestrel	0.3	30
Norgestrel	0.5	50
Levonorgestrel	0.1	20
Levonorgestrel	0.15/0.5	30
Levonorgestrel	0.125	50
Third generation		
Norgestimate	0.25	35
Gestodene	0.75	30
Desogestrel	0.15	20/30
Antiandrogenic		
Drospirenone	3	20/30
Cyproterone acetate	2	35

Abbildung 14.: Auflistung der momentan verfügbaren, niedrig dosierten orale Kontrazeptiva ($\leq 35 \mu\text{g EE}$) nach Progesteron-Typ und EE-Dosierung (168).

Die meisten momentan verfügbaren Präparate enthalten EE als synthetische Östrogen-Komponente in der „low-dose“ Applikation von maximal $35 \mu\text{g}$. Diese Dosierung ist die optimale Schnittstelle zwischen Effizienz, Sicherheit und Toleranz. (168)

Doch auch hier gibt es einen Verbesserungsbedarf, da das EE erhebliche Auswirkungen auf den hepatischen Metabolismus (erhöhte SHBG-Synthese, vermehrtes VLDL und Angiotensinogen, Veränderungen von östrogen-abhängigen Plättchenfaktoren) hat. Die Lösung dieses Problems scheint aber mit natürlichen Östrogenen (Estradiol, Estradiolvalerat) gefunden. (170)

Die Gestagene haben eine lange Geschichte in der Pharmakologie - die erste Generation wurde vor 1970 entwickelt – und werden, wie Abbildung 14 veranschaulicht, in Generationen eingeteilt (168).

Die synthetischen Gestagene der 1. und 2. Generation sind chemisch enger mit dem T verwandt und binden mit unterschiedlichen Affinitäten an den T-Rezeptor, wohingegen die Gestagene der 3. Generation eine höhere Affinität zum Progesteron-Rezeptor aufweisen und dementsprechend weniger androgen wirken. (170)

Es leuchtet wohl ein, dass ebendiese Kontrazeptiva mit androgen wirkenden Gestagenen von PCOS-Frauen gemieden werden sollen. Dies auch darum, da sie im Zusammenhang mit PCOS-Patientinnen zusätzlich mit einem höheren

kardiovaskulären Risiko und einer Verschlechterung der IR sowie der Dyslipidämie assoziiert sind. (145)

In diesem Sinne konnten in den jüngsten Dekaden spezielle Gestagene ganz ohne androgene, östrogene oder Glukokortikoid-Effekte entwickelt werden (170). Diese leiten sich dann von dem Progesteron oder Spironolacton ab und stehen für Präparate wie Drospirenon oder Cyproteronacetat [siehe Abb. 14] (168).

Die Grenzen der Langzeit-Behandlung gegen HA und Menstruationsstörungen (165,166), belaufen sich auf die naturgemäß ausgeschlossene Anwendung bei Kinderwunsch. Während die schon angesprochene Verschlechterung der IR und Dyslipidämien (145) vorrangig bei der Anwendung von androgen wirkenden Gestagenen auftritt (145,170), so ist das Risiko einer tiefen Venenthrombose mit anschließender Embolie immer – und bei PCOS-Patientinnen besonders erhöht (137,145).

1.3.6 Vitamin D

Auch der Serum 25-(OH)-Vitamin-D Wert ist mit der Menge an SHBG assoziiert und kann daher bei Patientinnen mit Vitamin D Defizienz die Insulinsensitivität verbessern und die Testosteronspiegel reduzieren. Das macht orales Vitamin D zu einer zusätzlichen Stütze in der PCOS-Behandlung, wenn denn ein Vitamin D-Mangel vorliegt (171).

1.4 Das Mikrobiom

Das gastrointestinale Mikrobiom bezeichnet die Gesamtheit aller im Gastrointestinaltrakt wohnenden Mikroorganismen (172). In absoluten Zahlen beherbergen wir Menschen zumindest 10^{14} Mikroorganismen (172), was sich mit einem Gesamtgewicht von 1,5 kg niederschlägt (173). Die Summe aller Gene der Mikroorganismen wird hierbei als Genom zusammengefasst und deren Informationsgehalt ist mindestens um den Faktor 100 größer als der des menschlichen „Wirt“-Genoms, weshalb man durchaus von einem „zweiten Genom“ des Menschen sprechen kann (173).

Außerdem ist die Diversität des Darm-Mikrobioms um ein Vielfaches höher. So unterscheiden sich selbst gesunde Zwillinge um mehr als 50% in ihrer Mikrobiom-Zusammensetzung (174), während menschliche Genome generell in nur ca. 0,1% ihrer Sequenzen variieren (173). Das Mikrobiom setzt sich dabei aus vielen Spezies zusammen, wie Bakterien, Archäen, Viren und Eukaryonten, die sowohl untereinander als auch mit dem Wirt interagieren (172).

Wenngleich auch interpersonelle Unterschiede in der Zusammensetzung groß sein können, so gibt es doch ein Grundgerüst, welches allen Individuen gemein ist (175). Typischerweise lässt sich eine Dominanz der Bacteroides (Gattung) und Firmicutes (Stamm) ausmachen (176).

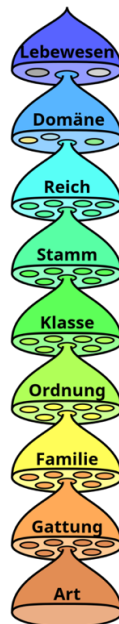


Abbildung 15.: Hierarchie der taxonomischen Stufen (ohne Zwischenstufen) (177)

1.4.1 Aufgaben des Mikrobioms

Das gastrointestinale Mikrobiom spielt eine große Rolle bei metabolischen Funktionen (177) und interagiert mit dem Immunsystem (178). Demnach konnten Assoziationen zwischen einer Mikrobiom-Dysbalance und Adipositas, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, DMT2 sowie Autismus gezeigt werden (172).

1.4.2 Entwicklungen post partum

Neugeborene weisen in ihrem ersten Stuhl, dem Mekonium, eine sehr geringe Diversität an Bakterien auf (179) und werden je nach Geburtsvorgang (vaginal oder C-Section) von den jeweilig ansässigen Bakterien besiedelt (180). Mit 11 Monaten unterscheidet sich ihr Mikrobiom eindeutig von dem der Mutter (181) und mit 2,5 Jahren ist eine vollständige Ähnlichkeit zur erwachsenen phylogenetischen Zusammensetzung erreicht (179).

1.4.3 Das Mikrobiom analysieren (182)

Die DNA kodiert für die RNA und die RNA baut Proteine auf. Dazu benötigt werden drei verschiedene RNAs: messenger-RNA (mRNA), die eine einzelsträngige Kopie der DNA darstellt, ribosomale-RNA (rRNA), die die Ribosomen bildet, an denen die Aminosäurekette zusammengesetzt wird um das Grundgerüst der Proteine zu aufzubauen und die transfer-RNA (tRNA), die die Aminosäurebausteine in der richtigen Reihenfolge an den einzelsträngigen mRNA Strang synthetisiert.

16S rRNA

Der Sedimentationskoeffizient der ribosomalen RNA von Bakterien liegt bei 70S (S steht hierbei für Svedberg und entspricht dem Wert von 10^{-13} s), der sich wiederum aus einer 50S und 30S Untereinheit zusammensetzt. Die 16S rRNA fungiert ausschließlich als ribosomales Aufbaustück in der 30S Untereinheit und ist für die Domäne der Bakterien spezifisch.

Bei der Mikrobiomanalyse werden nun die circa 1500 Nukleotide langen 16S-rRNA-Stücke von den in der Probe enthaltenen Bakterien sequenziert und im Anschluss miteinander verglichen. Im Gegensatz zur Gegenüberstellung aller bakteriellen Gene der Probe, bedeutet dies eine enorme Zeit- und Energieersparnis.

Grundsätzlich werden ribosomale Bestandteile aus konservierten und variablen Genen aufgebaut. Hierbei stellen konservierte Gene jene Teile dar, die das Ribosom unbedingt für seine korrekte Funktionsfähigkeit benötigt. Konservierte

Gene sind bei allen Bakterien gleich. Die variablen Regionen indes, sind viel eher mit einem individuellen Fingerabdruck zu vergleichen.

Identifikation der Spezies

Da das 1500 Nukleotide lange 16S-rRNA-Stück einen zu großen Informationspool darstellt, werden in der Aufbereitung 9 variable Regionen (V1-V9) mit einer Länge von ungefähr 100 Nukleotiden extrahiert. Anhand dieser 100 Nukleotide gelingt im Weiteren die Identifikation der verschiedenartigen Bakteriengattungen.

Konkret bedeutet das, dass aus den 9 variablen Regionen der 16S rRNA zwei ausgewählt werden, um möglichst viele Bakterien voneinander zu unterscheiden.

Durchführung

Da auf eine konservierte Region stets eine variable folgt und so weiter, wird ein 10-20 Basen langer Primer gebildet, der sowohl vor als auch nach einer relativ variablen Region, also an zwei konservierten Stellen, ansetzt. Der Abschnitt zwischen den beiden Primer, wird mittels PCR vervielfältigt. Hierdurch erhält man zig Kopien der ausgewählten zwei Regionen. Und das von jedem in der Probe enthaltenen Bakteriums.

Somit fallen bei jeder PCR Sequenzierung Sequenzen im Größenbereich von 10.000.000 an. Diese Tatsache macht einen weiteren Schritt zum erfolgreichen Vergleichen nötig.

Operational Taxonomic Unit = OTU

Hier kommt die Operational Taxonomic Unit ins Spiel. Sie fasst Sequenzen, die in mindestens 97% übereinstimmen, zu Clustern zusammen. Dadurch kann die Datenmenge der 10.000.000 Sequenzen auf vergleichbares Maß reduziert werden.

1.4.4 Alpha Diversität (183)

Unter Alpha Diversität versteht man die Diversität innerhalb (räumlich lokal) einer Probe oder eines Milieus.

- ◆ „Richness“ bezeichnet die absolute Menge an Spezies. Es werden alle wahrgenommenen Spezies gezählt.

Der Chao1 Index korrigiert diese Anzahl um die Spezies, die zwar vorhanden sind, aber nicht wahrgenommen wurden.

- ◆ „Eveness“ bezeichnet wie gleichmäßig die Spezies in der Gesamtmenge vertreten sind. Grundsätzlich gilt, in zwei Proben mit identischer Richness, ist jene Probe mit der größeren Eveness überlegen.

Der Shannon-Index kombiniert Richness und Eveness und stellt damit ein nützliches Tool dar, um die einzelnen Spezies und ihre Verteilung innerhalb einer Probe zu beschreiben.

- ◆ „Phylogenetic Diversity“ berechnet den Abstand zweier OTUs am Lebensbaum / phylogenetischen Baum mit ein.

Rarefizierung

Ein weiteres lohnendes Verfahren stellt die Rarefizierung dar, da sie den absoluten Vergleich zwischen zwei Proben möglich macht. Sie kalkuliert die „Richness“ mit ein, indem aus zwei Proben eine identische Anzahl an OTUs entnommen werden. Hierbei liefert die Probe mit den wenigsten Spezies/der geringsten „Richness“ den untersten Orientierungspunkt. Der damit einhergehende Nachteil, ist der Verlust von selten vorkommenden Spezies.

Mit der Rarefaction Curve erfolgt im Weiteren die Visualisierung dieses Vergleichs. Auch über den Endpunkt der „Richness“ erlaubt die Rarefaction Curve eine gute Aussagekraft. Der Endpunkt einer flachen Kurve, stellt ein Synonym für die Unwahrscheinlichkeit noch weitere Spezies zu finden dar. Zeichnet die Kurve allerdings einen steilen Verlauf, ist das ein Hinweis auf noch weitere Diversität, die es in der Probe zu entdecken gilt.

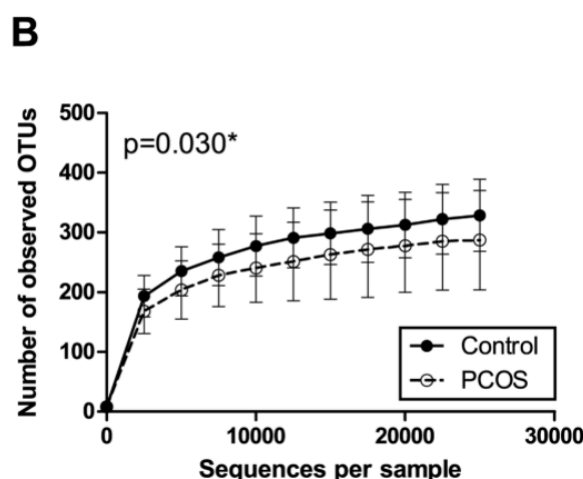


Abbildung 16.: The nuber of observed OTUs (185).

In Abbildung 9 wurden alle Proben anhand der kleinsten, detektierbaren Menge an OTUs (24.991) rarefiziert. Es ist in der Arbeit von Lindheim et al. (184) deutlich zu erkennen, dass die PCOS-Gruppe mit ihrer Alpha-Diversität der gesunden Kontrollgruppe im absoluten Vergleich unterlegen ist.

Zudem kann man anhand der Abflachung der Kurve sehen, dass der Endpunkt der Diversität wohl erreicht ist.

Normalisierung

Die Normalisierung vergleicht im Gegensatz dazu, die relative „Richness“ zweier Proben. Somit werden relative Häufigkeiten der Spezies in verschiedenen Samples verglichen. Der Vorteil besteht hierbei darin, dass alle OTUs miteinbezogen werden. Dadurch finden sich auch selten vorkommende Spezies in der Beurteilung wieder. Allerdings können dabei absolute Häufigkeiten nicht beurteilt werden, und es kann sein, dass sich die relativen Häufigkeiten zweier Proben nicht unterscheiden, obwohl eine Probe um ein Vielfaches mehr Sequenzen enthält.

1.4.5 Beta Diversität (185)

Unter Beta Diversität versteht man die Diversität zwischen zwei (räumlich verteilten) Proben.

Unterschiede zwischen Proben werden in Distanzen angegeben.

- ◆ Der Euklidische Abstand, die Bray-Curtis Unähnlichkeit und der Chi-Quadrat-Test sind Werkzeuge, um die Distanz zu messen, wobei Letztgenannter am besten geeignet ist.
- ◆ UniFrac bezieht in der Distanzmessung auch die phylogenetische Verwandtschaft mit ein.
- ◆ Principal component Analysis (PCoA): visualisiert dann die gemessenen Distanzen in einem mehrdimensionalen Koordinatensystem als Punktwolken. Jedes vorhandene Bakterium fügt eine weitere Dimension zum Feld hinzu, wobei anstelle von Bakterien auch alle anderen vorhandenen Metadaten, wie der BMI, das Alter etc. herangezogen werden können. Die PCoA erschafft jedenfalls im Folgenden ein 2D oder 3D Feld indem es den Pool der Bakterien solange verkleinert bis nur noch die zwei beziehungsweise drei wichtigsten übrigbleiben. Die wichtigsten Bakterien sind dabei die, die den größten Unterschied zwischen den Samples ausmachen.

Der Anteil der Principal components wird in % angegeben. Wer die Principal components bildet ist allerdings nicht bekannt.

Dies und die sehr unwahrscheinlich übereinstimmenden relativen Häufigkeiten der Principal components in zwei Plots müssen beachtet werden, da dadurch der Vergleich zwischen zwei verschiedenen Plots unseriös ist.

- ◆ Die Redundanzanalyse verfolgt das gleiche Prinzip wie PCoA mit dem Unterschied, dass gemischte Variablen überbleiben. Außerdem weiß der Anwender bei dieser Methode über das Mischverhältnis der Variablen Bescheid.
- ◆ ANOSIM ist der statistische Test, der die Signifikanz der Unterschiede beurteilt. Er wertet dabei die Distanz innerhalb einer Gruppe im Vergleich zur Distanz zwischen zwei Gruppen aus und hilft so, Gruppen statistisch signifikant voneinander abzugrenzen.
- ◆ LEfSe (Linear discriminant analysis (LDA) effect size) ist ein Algorithmus, der genomische Eigenschaften von mikrobiellen Gemeinschaften herausarbeitet, um signifikante Unterschiede zwischen mehreren Gruppen zu identifizieren (186). Dabei werden jene Bakterien, die den Unterschied am besten erklären, zusammen mit dem Häufigkeitsunterschied dargestellt. PCoA und LDA reihen beide ihre Axen nach Wichtigkeit. PCoA konzentriert sich dabei auf die Bakterien, die am unterschiedlichsten sind. LDA hingegen versucht, die mit LEfSe herausgearbeiteten genomischen Eigenschaften/Kategorien zu separieren, indem sie hier die beiden unterschiedlichsten heraussucht. (187)

1.4.6 PCOS und das Mikrobiom

An erster Stelle seien hier Lindheim et al. (184) erwähnt, da sie auf diesem Gebiet 2017 Pionierarbeit geleistet haben. Durch ihre Arbeit konnte nämlich eine niedrigere Diversität und eine veränderte phylogentische Zusammensetzung bei PCOS-Patientinnen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe gezeigt werden. Konkret detektierten sie das signifikant verminderte Vorkommen der Stämme Tenericutes (u.a. die Ordnung ML615J-28) und Bacteroides (Familie S24-7) und konnten damit schlechtere Darmbarrierefunktionen, erhöhte Endotoxämie und Entzündungswerte sowie Veränderungen der Reproduktiven Parametern assoziieren.

2018 gelang es auch Torres et al. (188) die Assoziation zwischen der Darmflora und dem Auftreten sowie Fortbestehen von PCOS-Symptomen zu untermauern. Sie fanden bei PCOS-Patientinnen, im Vergleich zu gesunden Frauen, eine geringere Alpha-Diversität, die ihrerseits invers mit HA, TT und Hirsutismus korreliert ist.

Ebenso weitere Arbeiten zeigen den Zusammenhang zwischen geringer Alpha-Diversität und Insulinresistenz, Dyslipidämien (189) sowie Adipositas auf (175,189), welche durch die verwendeten Parameter die Schlussfolgerung auf das PCOS schlüssig erscheinen lässt.

Außerdem konnten auch Zhang et al. (190) Quervernetzungen zwischen Insulinresistenz und Menstruationsunregelmäßigkeiten mit der Darmbarrierefunktion herstellen. Zur Hilfe kam ihnen hierbei das Zonulin, welches bei höheren Konzentrationen im Serum auf eine vermehrte Darmdurchlässigkeit hindeutet. Die Gruppe entdeckte bei PCOS-Frauen erhöhte Zonulin-Werte und positive Korrelationen mit den metabolischen und reproduktiven Veränderungen des PCOS.

Ein weiteres Forschungsprojekt beschreibt, dass Darmbakterien (*Clostridium scindens*) sogar selbst in der Lage sind, Steroidhormone zu produzieren, indem sie Glukokortikoide in Androgene umwandeln (191).

Nicht nur mit diesem kleinen Auszug an Arbeiten sei der Einfluss des Mikrobioms auf das PCOS anschaulich dargelegt - auch Zhang et al. (192) resümierten 2019 in einem Tiermodell, dass die Wiederherstellung eines gesunden Mikrobioms die reproduktiven Funktionen bei PCOS deutlich verbessern kann.

Nun stellt sich nur noch die Frage, wie man denn in die Mikrobiom-Zusammensetzung eingreifen kann, um sich ihrer potenziell positiven Eigenschaften zu bedienen.

1.4.7 Probiotika

Probiotika sind definiert als lebende Mikroorganismen, die, in ausreichend großer Menge appliziert, gesundheitliche Vorteile für den Menschen liefern (193). Das bedeutet, dass sich die Anzahl an verabreichten Mikroorganismen dabei im Milliardenbereich befinden sollte (194).

Außerdem müssen Mikroorganismen drei Kriterien (195,196) erfüllen, um als Probiotika bezeichnet zu werden:

- 1) Die Organismen müssen gegenüber der Magen- und Gallensäure resistent sein, um lebendig im unteren Gastrointestinaltrakt anzukommen.
- 2) Die Organismen müssen adhärente Eigenschaften an der intestinalen Zellwand aufweisen, um nicht sofort im Stuhl verloren zu gehen.
- 3) Die Organismen müssen den Wirt bereichern, indem sie nicht pathogen (also sicher) sind und antimikrobielle Substanzen produzieren, die eine gesunde Darmflora begünstigen.

Am häufigsten werden die Stämme Bifidobakterien und Lactobazillen probiotisch verwendet, da sie alle oben angeführten Kriterien erfüllen (196).

Probiotika sind nicht mit Präbiotika zu verwechseln. Präbiotika sind hierbei fermentierte Lebensmittelbestandteile, die nicht verdaut werden können und so im Kolon landen, um dort selektiv die guten Bakterien zu ernähren (z.B. Lactobacillen, Bifidobakterien) (197,198). Unter den Begriff „bioaktive Präbiotika“ fallen Fructo-Oligosaccharide, Inulin, Glactooligosaccharide und Lactulose, die in Spargel, Bananen, Roggen, Weizen, Zwiebeln, Haferflocken, Knoblauch und Artischocken und vielen weiteren zu finden sind. Allerdings kommen die präbiotischen Bestandteile der Lebensmittel in zu geringer Menge vor, sodass künstlich hergestelltes Inulin zur Supplementation besser geeignet ist. (197)

An dieser Stelle soll nun abschließend auch auf die Sicherheit von Probiotika eingegangen werden. So ist das Auftreten von ernststen Nebenwirkungen unter einer Probiotika-Therapie sehr selten (199) und - wenn vorhanden - mehrheitlich auf immunsupprimierte Personen beschränkt (199–201). Außer diesen besonders immunsupprimierten Patient*innen und kritisch Kranken sind auch Schwangere, Neugeborene und ältere Personen von einem höheren Risiko, an einer Probiotika-induzierten systemischen Infektion (z.B. Pilzkrankung - Fungämie), einer gastrointestinalen Ischämie oder einer exzessiven Stimulation des Immunsystems mit der Folge eines autoimmunen Geschehens zu erkranken, betroffen (201). Zusammenfassend sind Probiotika aber vornehmlich sicher in der Anwendung (202) und die eben geschilderten dramatischen Nebenwirkungen sind weitaus spärlicher anzutreffen als gastrointestinale Begleitsymptome (z.B. Blähungen), die ihrerseits per se selten vorkommen (199).

Probiotika bei PCOS

Bereits Anfang der 2010er Jahre gelang es den Zusammenhang zwischen Probiotika-Einnahme und Körpergewichts-Reduktion herzustellen. Probiotika moderieren demnach die Ausschüttung des Sättigungshormons GLP-1 (203) und induzieren die Expression des Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) Gens, wodurch die Fettspeicherung sinkt (204,205).

In Bezug auf die Gewichtsreduktion, des Adipositas-Rückgangs (204,205) und der Umkehrung der Insulinresistenz (206) leisten hierbei vorrangig die Lactobacillus-Stämme einen wichtigen Beitrag. Gleiches gilt für die Senkung des LDL-Spiegels (207), der TAG und des VLDLs (206).

Auch in einer groß angelegten Studie mit schwangeren Frauen, konnte die Probiotika-Behandlung (Lactobacillus rhamnosus GG, Bifidobacterium lactis Bb12) die Inzidenz eines Gestationsdiabetes signifikant reduzieren und die Insulinsensitivität sowohl während der Schwangerschaft, als auch 12 Monate post partum verbessern (208). Tremellen et al. folgerten darauf, dass bei PCOS-Frauen gleichsam die Insulin-Spiegel durch Probiotika absenkbar sind, wodurch sowohl der HA als auch die Oligo-/Anovulation verbessert würden (198).

Ein Tiermodell vermerkte ebenfalls die Normalisierung der ovariellen Morphologie und des Zyklus ihrer Ratten, nachdem sie eine Lactobacillus-Therapie verabreicht bekommen haben und ihnen der Stuhl von gesunden Artgenossen transplantiert worden ist und. Bei 75% der Ratten sanken unter gleicher Therapie zudem auch die Androgenspiegel ab. (209)

Nebenwirkungen und Grenzen der klassischen Therapie:

Wie die Überschrift vermuten lässt, seien im Folgenden noch einmal die Vorteile sowie Nebenwirkungen und Probleme der klassischen Therapie kurz gegenübergestellt:

THERAPIE	VORTEILE	NACHTEILE
Adipositas-Chirurgie	+ einsetzbar bei morbid übergewichtigen Patientinnen, die anders schwer an Gewicht verlieren (145) + bei 78% Regression des DMT2 (147)	- Malabsorption (148) - jede der Operation folgende Schwangerschaft ist eine Risikoschwangerschaft (146) - SGA-Säuglinge (149) - psychische Probleme, Essstörungen (148)

	+ generelle Verbesserung von allen PCOS-Markern (146)	
Metformin	+ Gewichtsreduktion + Reduktion der zirkulierenden Androgene (151,152) + evtl. Unabhängige Verbesserung der Reproduktionskraft (153) + Senkung des kardiovaskulären Risikos (156)	- dermatokutane Symptome werden nicht erfasst (145,154) - gastrointestinale Nebenwirkungen (157)
Clomifen	+ 73%ige Ovulationsrate, Lebendgeburt in 29% innerhalb von 6 Monaten (159)	- Mehrlings-schwangerschaften (160) - 20% Therapieresistenz (146) - starke Nebenwirkungen (Flush, Brustspannen, Schwindel, Übelkeit) (146) - Sehstörungen, die zum Therapieabbruch führen (146) - hohe Kosten (157)
Letrozol	+ bis zu 84% Ovulationsrate (163) + in 27% Lebendgeburt	- starke Nebenwirkungen (gastrointestinale Störungen, Flush, Kopfschmerzen, Rückenschmerzen, Schwächegefühl) - hohe Kosten (157)
Hormonelle Kontrazeption	+ wirkungsvoll gegen hyperandrogene, dermatokutane Symptome (145,165,166) + Wiederherstellung einer regelmäßigen Menses (145,166)	- Auswirkungen auf hepatischen Metabolismus (170) - Verschlechterung der IR und Dyslipidämien (145) - bei Kinderwunsch nicht anwendbar - Risiko TVT (137,145)

Tabelle 1.: Vorteile und Nachteile der derzeitigen PCOS-Therapiemöglichkeiten.

Da auch Lebensstil-Modifikationen nur selten zu einem langfristigen Erfolg führen (143,198), ist der Ruf nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten laut geworden (10,198) und bietet u.a. mit Probiotika eine potentielle Erweiterung an.

1.5 ProPCO - Pilot

Auf Basis der schon erwähnten Vorarbeiten von Lindheim et al. (184) sowie von Haudum et al. (210) aus der Grazer Arbeitsgruppe wurde die Hypothese, eine probiotische Intervention könnte die metabolischen und hormonellen Parameter des PCOS verbessern, aufgestellt. Zu diesem Zweck wurde eine Pilotstudie durchgeführt, die an einer kleinen Gruppe von PCOS-Patientinnen diese Hypothese erstmalig untersuchen sollte. Ziel war es, mit diesen Ergebnissen im Anschluss eine doppel-blind randomisiert-kontrollierte Studie mit größerer Teilnehmerinnenzahl durchzuführen.

Es wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

Arbeitshypothese

Es besteht eine Korrelation zwischen PCOS-Parametern und einer diätischen Intervention mit Probiotika, sowie mit Entzündungsmarkern, der Stuhlmikrobiom-Zusammensetzung und der intestinalen Permeabilität.

Zweite Hypothese

Es gibt eine probiotische Zusammensetzung, die besonders effektiv bei PCOS-Symptomen und PCOS-Parametern ist.

Alternative Hypothese

Es besteht keine Korrelationen zwischen PCOS-Parametern und einer diätischen Intervention mit Probiotika, sowie mit Entzündungsmarkern, der Stuhlmikrobiom-Zusammensetzung und der intestinalen Permeabilität.

2 Material und Methoden

Die Studie wurde unter dem Titel „ProPCO-Pilot“ – “Probiotic dietary Intervention in Polycystic Ovary Syndrome – a pilot trial” durchgeführt.

2.1 Studiendesign

Die Pilotstudie wurde zwischen September 2018 und August 2019 monozentrisch, offen und randomisiert durchgeführt. Es wurden 30 Teilnehmerinnen zwischen 18 und 45 Lebensjahren rekrutiert, die randomisiert auf drei Gruppen zu je 10 Patientinnen aufgeteilt wurden. Im Folgenden wurden jeder Gruppe über einen Zeitraum von 3 Monaten eines von drei verschiedenen OMNi-BiOTiC® Produkten verabreicht. Während dieser Zeitperiode wurden insgesamt drei Visiten an der Klinische Abteilung für Endokrinologie und Diabetologie durchgeführt: Das erste Treffen diente als Screening in Woche 0, bei Visite 1 wurden die OMNi-BiOTiC®-Produkte übergeben und bei Visite 2 eine retrospektive Kontrolle über die Veränderungen erhoben.

2.1.1 Verwendete Probiotika

Die verwendeten Präparate der Firma OMNi-BiOTiC®, bestehen aus einem Sachtet, das je nach Produkt mit 2-3g eines gelblichen Pulvers gefüllt ist. Dieses Pulver enthält Maisstärke, Maltodextrin, Fructo-Oligosaccharid P6, Inulin, Pflanzenprotein und eben die für uns interessanten Bakterienstämme – in unterschiedlicher Zusammensetzung je nach Produkt.

OMNi-BiOTiC® STRESS Repair

Dieses Präparat weist zumindest 7.5 Milliarden Organismen pro Portion (3g) auf und enthält die Stämme (Anzahl: 9): *Lactobacillus casei* W56, *Lactobacillus acidophilus* W22, *Lactobacillus paracasei* W20, *Bifidobacterium lactis* W51, *Lactobacillus salivarius* W24, *Lactococcus lactis* W19, *Bifidobacterium lactis* W52, *Lactobacillus plantarum* W62, *Bifidobacterium bifidum* W23.

OMNi-BiOTiC® 6

Hier finden sich mindestens 2 Milliarden Organismen pro 2g Tagesration mit den Stämmen (Anzahl: 6): *Bifidobacterium animalis* W53, *Lactobacillus acidophilus* W55, *Lactobacillus salivarius* W57, *Enterococcus faecium* W54, *Lactococcus lactis* W58, *Lactobacillus casei* W56.

OMNi-BiOTiC® metabolic

In diesen 3g Packungen sind je mindestens 3 Milliarden Organismen zu finden, aufgeteilt auf die Stämme (Anzahl: 7): Lactobacillus acidophilus W37, Lactobacillus casei W56, Enterococcus faecium W54, Lactobacillus acidophilus W22, Lactobacillus rhamnosus W71, Lactococcus lactis W58, Lactobacillus plantarum W62.

2.1.2 Studienendpunkte

Bei der Startvisite/Screening in Woche 0 sowie am Ende der Studie wurden folgende (1-5) Parameter gesammelt und deren Änderung als Endpunkte der Studie definiert:

1. Es wurde eine Stuhlprobe analysiert, um die Änderung der Mikrobiom-Zusammensetzung nach 3 Monaten der probiotischen Intervention zu ermitteln.
2. Ein umfassendes Hormonprofil wurde abgenommen. Dies inkludierte Schilddrüsen- und Nebenschilddrüsenwerte sowie Nierenparameter und Nebennierenhormone, Cortisol, LH, FSH, 17 β -Östradiol, 17 α -Progesteron, TT, fT, SHBG, DHEA-S, Androstendion ACTH, Prolaktin, IGF-1 und das AMH.
Weiters wurde ein Basis- und Differential-Blutbild erstellt und hsCRP, Phytohormone (Equol Metaboliten) sowie Appetit-Hormone (GLP1, Ghrelin) bewertet.
3. Ein oraler Glukosetoleranztest (oGTT) wurde zu diesem Zweck durchgeführt und der HOMA-Index berechnet. Die Veränderungen des errechneten Index sowie der Glukose, der Insulin- und der C-Peptid-Werte nach der Probiotika-Therapie wurden als Endpunkte analysiert.
4. Klinische PCOS-Symptome wurden mit einem Fragebogen und dem Ferriman-Galway Score [siehe Abb. 10] erfasst. Außerdem wurden Vitalparameter (Blutdruck, Größe, Gewicht, Bauchumfang und Hüftumfang) gemessen.
5. Weitere Fragebögen dokumentierten die Lebensqualität (Quality of life, QOL) sowie depressive Anzeichen und Symptome mittels eines Scores (BDI) und das Stuhlverhalten mit der Bristol stool scale.

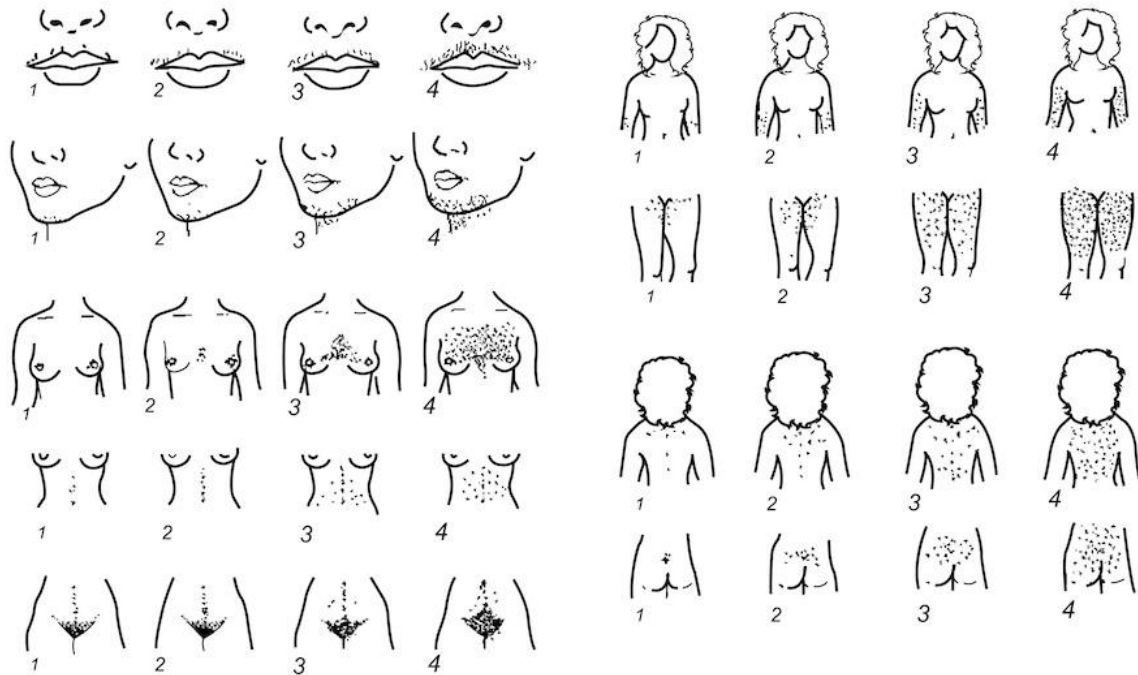


Abbildung 17.: Ferriman-Gallwey-Wert (mFG) (35).

Inklusions- und Exklusionskriterien

Anhand der Einschluss-Kriterien wurden PCOS-Patientinnen ausgewählt, die über 18 Jahre alt und noch nicht in die Menopause eingetreten waren (< 45 Jahre) sowie mindestens zwei der Rotterdam Kriterien (2) erfüllt hatten.

Ausgeschlossen wurde alle Jene, auf die eines oder mehr der Exklusionskriterien zutrafen:

- fehlende Zustimmung
- Schwangerschaft oder zum Studienzeitpunkt stillend
- Soja-Allergie, andere Studien-relevanten Allergien
- Diabetes Mellitus Typ 1
- Therapie mit Insulin-Sensitizer, Kontrazeptiva, Steroiden
- Antibiotika-Therapie, die weniger als 3 Monate zum Startzeitpunkt zurückliegt
- Reizdarmsyndrom, akute Gastrointestinale Infektion
- andere chronische Krankheiten oder Onkologische Erkrankungen
- HA durch ein Cushing Syndrom, Hyperprolaktinämie, adrenale Tumore, einAndrogenitales Syndrom oder seltene genetische Variationen bedingt (= nicht PCOS verursacht)

2.1.3 Studienverlauf

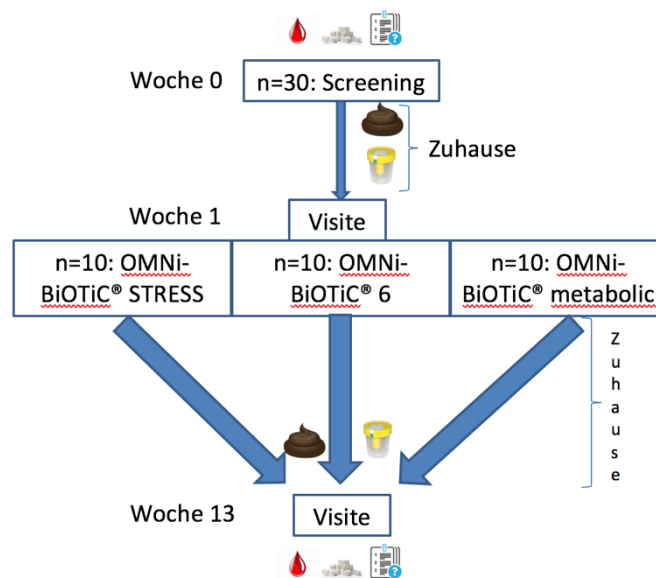


Abbildung 18.: Studiendesign und zeitlicher Ablauf.

In der Grafik sind die schon genannten drei Treffen erkennbar:

Beim ersten Treffen, dem Screening in Woche 0 wurden Blutwerte, oGTT, und Vitalparameter gemessen, Fragebögen ausgefüllt und die Ein- und Ausschlusskriterien überprüft.

Zur Visite 1 brachten die Patientinnen eine Harnprobe sowie den bei -20°C eingefrorenen Stuhl, den sie zwei Mal selbstständig zuhause gesammelt hatten, mit. Diese Stuhlprobe wurde dann in der Klinik bei -80°C weiter gelagert. Außerdem diente diese Visite zusätzlich der OMNi-BiOTiC®-Übergabe.

In den nächsten drei Monaten nahmen die Patientinnen täglich ihr zugewiesenes OMNi-BiOTiC®-Sachet ein und wurden einmalig telefonisch zu ihrem Gesundheitszustand befragt.

Bei Visite 2 in Woche 13 wurden alle Daten aus der Screeningvisite erneut erhoben. Dies inkludierte zwei neue Stuhlproben.

Um den Stuhl zu analysieren, wurde an beiden Zeitpunkten zuerst die bakterielle DNA in einem mehrstufigen Prozess isoliert. Die vereinfacht dargestellte Abfolge beschränkte sich dabei auf:

- Stuhl verdünnen,
- bakterielle Zellen, die nicht DNA sind, vernichten und
- bakterielle DNA vom Rest trennen.

Diese Arbeit übernahm eine Proteinase, bevor ein Buffer zugesetzt wurde, um die Proteinase in ihrer Vernichtungsarbeit wieder zu stoppen. Übrig blieb sowohl menschliche als auch bakterielle DNA, doch da bekanntlich nur Bakterien die 16s rRNA enthalten, konnte mittels PCR die rein bakterielle DNA vervielfältigt werden.

2.1.4 Auswertung und statistische Analyse

Da es sich um eine Pilotstudie handelte, wurden pro Gruppe nur 10 Frauen mit PCOS eingeschlossen. Das Ziel der Studie war es, das beste Probiotikum für eine groß angelegte randomisierte doppelblinde Studie (RCT) zu finden sowie unsere Methoden zu testen. Die Daten wurden ins Statistikprogramm SPSS (Version 25) eingegeben und Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) berechnet.

Die Stuhlsequenzierung wurde mittels Illumina-Sequenzierungstechnologie durchgeführt und anschließend mit QIIME2 analysiert. QIIME2 ist eine Analysemethode, um Mikrobiomdaten zu untersuchen und umfasst mehrere Rechenschritte.

Zunächst werden die DNA-Sequenzen auf ihre Qualität überprüft und wenn nötig aussortiert. Anschließend erfolgt die Identifizierung der geclusterten OTUs mittels einer Referenz-Datenbank, woraufhin dann Analysen zu Alpha- und Beta-Diversität durchgeführt werden können.

Die Grafiken zu den PCOS-Endpunkten wurden mittels SPSS erstellt, während die Mikrobiom-bezogenen Grafiken auf der Internet-Plattform „Calypso“ erstellt wurden (Link: <http://cgenome.net/wiki/index.php/Calypso>).

3 Ergebnisse

3.1 Patientinnenkollektiv

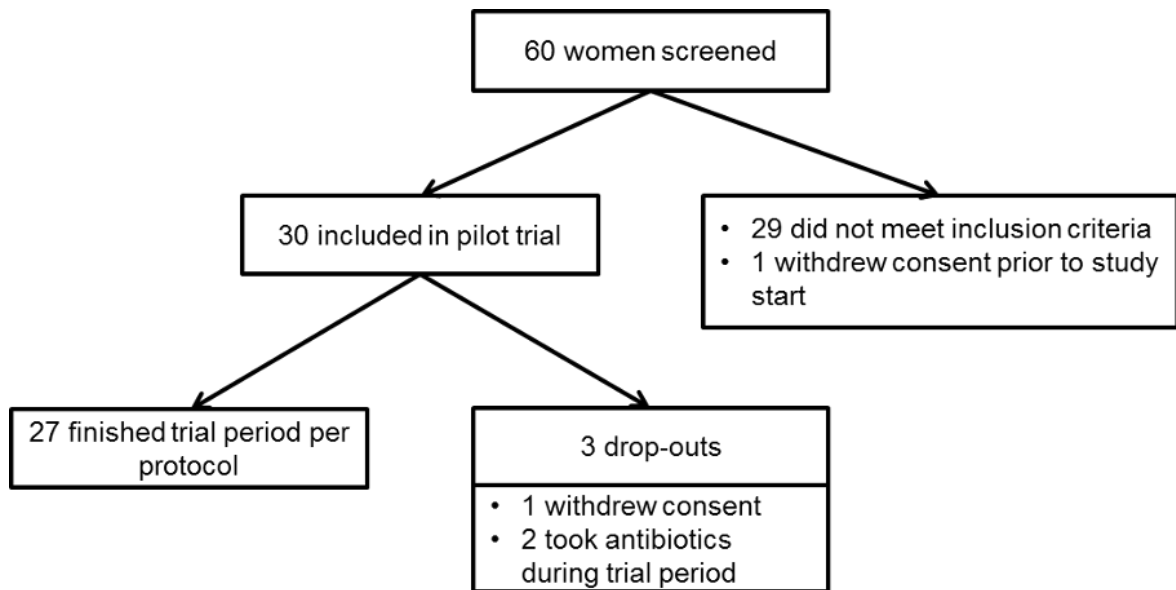


Abbildung 19.: Patientinnen In- und Exklusion während der Rekrutierungsphase.

Wie in der Grafik aus Abb. 19 ersichtlich, wurden von 60 Patientinnen 30 in die Pilotstudie aufgenommen. Von diesen 30 Teilnehmerinnen haben 27 den gesamten Studienverlauf abgeschlossen, die drei Übrigen sind vor der zweiten Visite ausgeschieden.

3.1.1 Hormonelle und metabolische Beschreibung der Patientinnen

In der nachfolgenden Tabelle [1] sind ausgewählte Endpunkte der 27 Studienteilnehmerinnen angeführt.

Bis auf das AMH konnten bei der ersten Messung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ausgemacht werden.

Parameter	OMNi-BiOTiC® STRESS Repair	OMNi-BiOTiC® 6	OMNi-BiOTiC® metabolic	p
Teilnehmerinnenanzahl	10	10	10	-
Alter [a]	29,2	24,3	26,4	0,053
TT [ng/ml]	0,45	0,37	0,45	0,079

fT [pg/ml]	3,07	2,08	2,58	0,098
Androstenedion [ng/ml]	4,74	2,61	3,75	0,219
DHEA-S [µg/ml]	1,55	1,18	2,07	0,099
mFG-Wert	13	13	12	0,804
SHBG [nmol/ml]	51,4	76,0	72,5	0,763
AMH [ng/ml]	7,98	4,04	7,99	0,025
FSH [mIU/ml]	6,86	5,53	5,06	0,302
LH [mIU/ml]	8,71	6,92	11,82	0,354
LH/FSH Ratio	1,494	1,350	2,404	0,153
17-OH-Progesteron [ng/ml]	0,70	0,58	1,03	0,407
17-β- Estradiol [pg/ml]	43,9	69,0	73,0	0,182
BMI [kg/m ²]	33,1	25,1	23,3	0,071
Beck's Depression Inventory [1]	10	4	5	0,065
HOMA-IR [1]	2,5	2,7	1,6	0,439
Glukose AUC [mgh/dl]	237,1	214,2	220,0	0,535
Insulin AUC* [mUh/l]	134,1	55,8	123,9	0,817

Tabelle 2.: Grundlegende hormonelle und metabolische Parameter vor der Intervention.

Die Daten spiegeln die Mittelwerte wieder und die p-Werte wurden mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (One-way ANOVA) berechnet. Anhängig von der Vergleichbarkeit der Varianzen, wurden die p-Werte auch mittels Welch-ANOVA im SPSS der Version 25.0 ermittelt.

* In der OMNi-BiOTiC® metabolic-Gruppe lieferten 4 von den 10 Teilnehmerinnen brauchbare Insulin-Proben zu allen vier Zeitpunkten und die restlichen 6 zumindest eine Blutprobe, was die Stichprobengröße bei dem Parameter Insulin AUC reduziert.

3.2 Ergebnisse der Intervention

Die Tabelle [2] zeigt die Gegenüberstellung der erhobenen hormonellen und metabolischen Parameter zu Beginn der Studie und nach der Intervention.

Parameter	OMNi-BiOTiC® STRESS Repair		OMNi-BiOTiC® 6		OMNi-BiOTiC® metabolic		p
	Before	After	Before	After	Before	After	
Teilnehmerinnenanzahl	10	9	10	8	10	10	-
Alter [a]	0,45	0,48	0,37	0,35	0,45	0,47	0,963
TT [ng/ml]	3,07	3,78	2,08	1,99	2,58	2,35	0,347
fT [pg/ml]	4,74	5,09	2,61	3,22	3,75	3,53	0,759
Androstenedion [ng/ml]	1,55	2,20	1,18	1,27	2,07	1,99	0,341
DHEA-S [µg/ml]	13	16	13	8	12	13	0,628
mFG-Wert	51,4	40,3	76,0	90,3	72,5	78,8	0,163
SHBG [nmol/ml]	7,98	8,82	4,04	4,89	7,99	7,23	0,869
AMH [ng/ml]	6,86	5,45	5,53	4,57	5,06	5,57	-
FSH [mIU/ml]	8,71	10,82	6,92	6,13	11,82	7,27	-
LH [mIU/ml]	1,494	1,95	1,350	1,59	2,404	1,84	0,141
LH/FSH Ratio	0,70	1,17	0,58	1,52	1,03	1,63	-
17-OH-Progesteron [ng/ml]	43,9	54,1	69,0	94,8	73,0	58,5	-
17-β-OH-Estradiol [pg/ml]	33,1	34,1	25,1	22,5	23,3	23,2	0,083
BMI [kg/m²]	10	4	4	4	5	5	0,124
Beck's Depression Inventory [1]	2,5	3,09	2,7	1,50	1,6	1,07	0,597
HOMA-IR [1]	237,1	248,8	214,2	184,4	220,0	187,4	0,620
Glukose AUC [mgh/dl]	134,1	120,7	55,8	52,2	123,9	66,0	0,588

Tabelle 3.: Gegenüberstellung der hormonellen und metabolischen Parameter zu Beginn der Studie und nach der Intervention.

Die Daten sind Mittelwerte und die p-Werte wurden mit der einfaktoriellem Varianzanalyse (One-way ANOVA) oder Welch-ANOVA im SPSS der Version 25.0 (abhängig von der Vergleichbarkeit der Varianzen) berechnet.

Es sind keine signifikanten Veränderungen zwischen den Gruppen nach dreimonatiger Probiotika-Intervention zu vermerken, wenngleich dieses Ergebnis aufgrund der kleinen Stichprobengröße so zu erwarten war. Vielmehr ist das Augenmerk auf Trends in den drei Gruppen bezüglich der Probiotika-Zusammensetzung gelegen.

Die folgende Visualisierung der Werte in Grafiken, soll der weiteren Interpretation dienen [siehe Abb. 20-25].

Es ist in der Abbildung 20a-b zu sehen, dass die Unterschiede des TT zwischen den Gruppen zwar vorhanden waren, aber für sich genommen nicht maßgeblich zur Abgrenzung eines überlegenen Probiotikums beitragen konnten.

Bezogen auf das fT konnte, wie in Abbildung 20c-d ersichtlich, die OMNi-BiOTiC® metabolic-Gruppe den größten Nutzen aus der Behandlung ziehen. Auch bei der OMNi-BiOTiC® 6-Gruppe konnte ein Rückgang des fT vermerkt werden, obgleich sich dieser in geringerer Ausprägung darstellte, wodurch das OMNi-BiOTiC® metabolic dennoch zum Sieger gekürt wurde.

Der Androstendion-Rückgang verhielt sich ähnlich zu dem des TT. Auch hier konnten keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden [siehe Abb. 21a-b]. Anders stellte es sich jedoch im Falle des DHEA-S dar, bei welchem sowohl das OMNi-BiOTiC® 6 als auch das OMNi-BiOTiC® metabolic einen anschaulicheren Rückgang im Vergleich zum STRESS-Repair-Präparat induzieren konnten. Zwischen diesen Beiden dagegen konnte sich abermals kein Primus hervortun, wie in Abbildung 21c-d zu sehen ist.

Auch beim Ferriman-Gallwey-Wert (mFG) haben sich erwartungsgemäß keine großen Veränderungen gezeigt, wobei hier die Erklärung auf der Hand liegt, da es länger als drei Monate braucht, um Veränderungen im Hirsutismus-Ausmaß beobachten zu können [siehe Abbildung 22a-b].

In Abbildung 22c-d ist ferner die Entwicklung der SHBG-Spiegel zu sehen. Diese stiegen wiederum, dicht gefolgt von der OMNi-BiOTiC® 6-Gruppe, in der OMNi-BiOTiC® metabolic-Gruppe am deutlichsten an.

Bezogen auf das AMH zeigten die Ergebnisse der OMNi-BiOTiC® metabolic- und OMNi-BiOTiC® 6-Gruppe eine kleine Differenz zugunsten der OMNi-BiOTiC® metabolic-Gruppe [siehe Abb. 23a-b]. Dieses Ergebnis setzte sich auch in der LH/FSH-Ratio fort, bei der ebenfalls das OMNi-BiOTiC® metabolic in der Effektivität

triumphierte [siehe Abb. 23c-d]. Der gleiche Trend konnte ebenso in puncto BMI beobachtet werden, wobei sich ein größerer Gewichtsverlust in der OMNi-BiOTiC® metabolic-Gruppe im Vergleich zu den beiden anderen gezeigt hatte. Tatsächlich ist in Abbildung 24a-b sogar eine BMI-Erhöhung sowohl in der OMNi-BiOTiC® STRESS-Repair- als auch in der OMNi-BiOTiC® 6-Gruppe zu sehen.

Die Depression, gemessen in einem Rückgang der Beck's Depression Inventory (BDI), verbesserte sich interessanterweise am deutlichsten in der OMNi-BiOTiC® STRESS Repair-Gruppe, was diesen Parameter zum einzigen Erfolg der Stress-repair-Gruppe macht [siehe Abb. 24c-d].

Bei den metabolischen Messwerten waren die Effekte des OMNi-BiOTiC® metabolic und OMNi-BiOTiC® 6 ziemlich ausgeglichen. Der Parameter HOMA-IR Index wurde mit dem OMNi-BiOTiC® metabolic positiver beeinflusst [siehe Abb. 25a-b], während die Glucose AUC mehr vom OMNi-BiOTiC® 6 profitieren konnte [siehe Abb. 25c-d].

In Summe wurden somit die meisten PCOS-Parameter unter Einsatz von OMNi-BiOTiC® metabolic verändert.

Ähnlich, aber weniger ausgeprägte Änderungen fanden sich bei OMNi-BiOTiC® 6, während OMNi-BiOTiC® STRESS Repair lediglich beim Parameter „Depression“ eine signifikante Veränderung zu vermerken hatte.

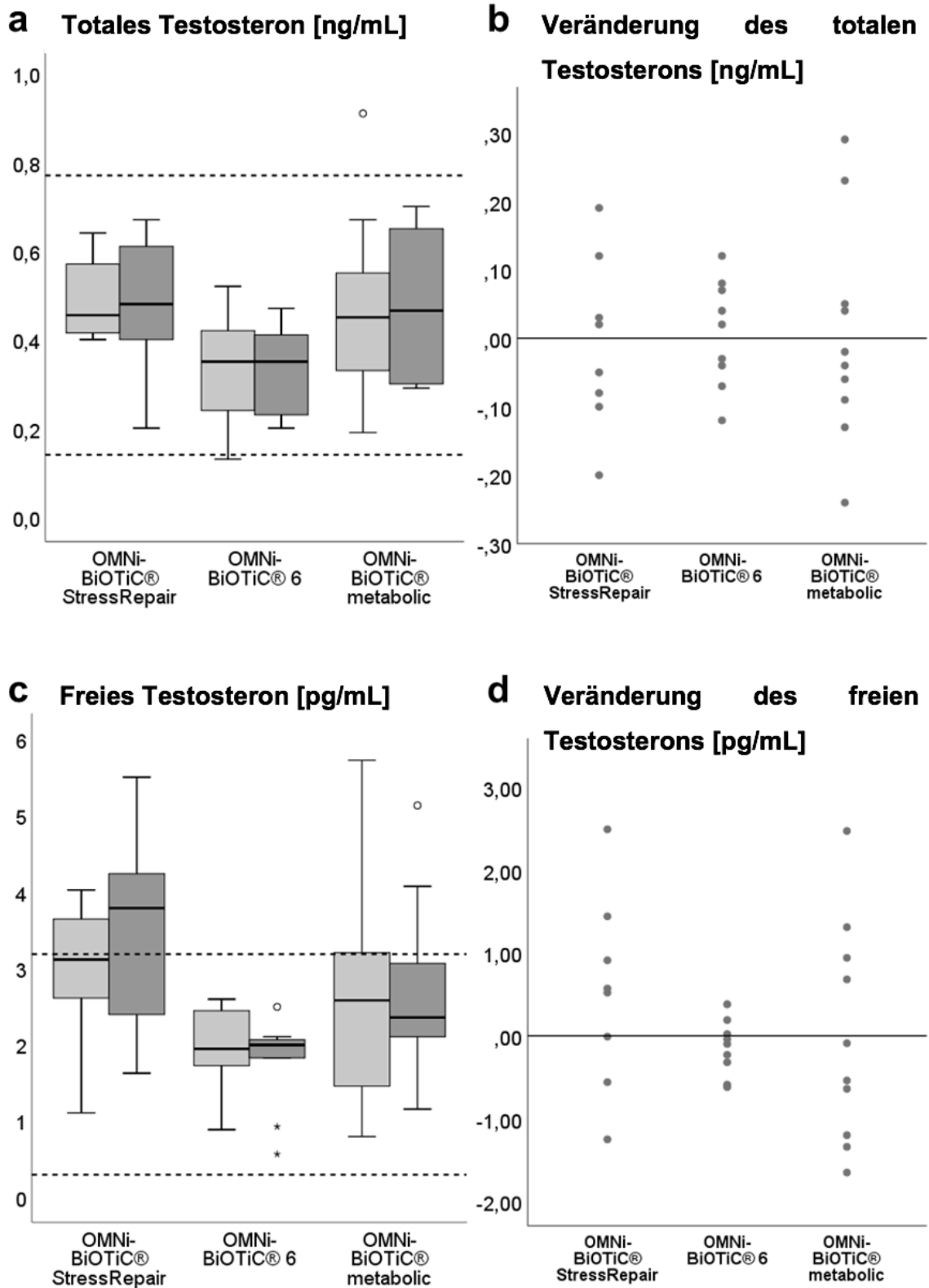


Abbildung 20.: Ergebnis: totales und freies Testosteron.

a,c Vergleich von Gesamt- und freiem Testosteron vor und nach der Intervention.

b,d Veränderungen des Gesamt- und freien Testosterons nach der Intervention.

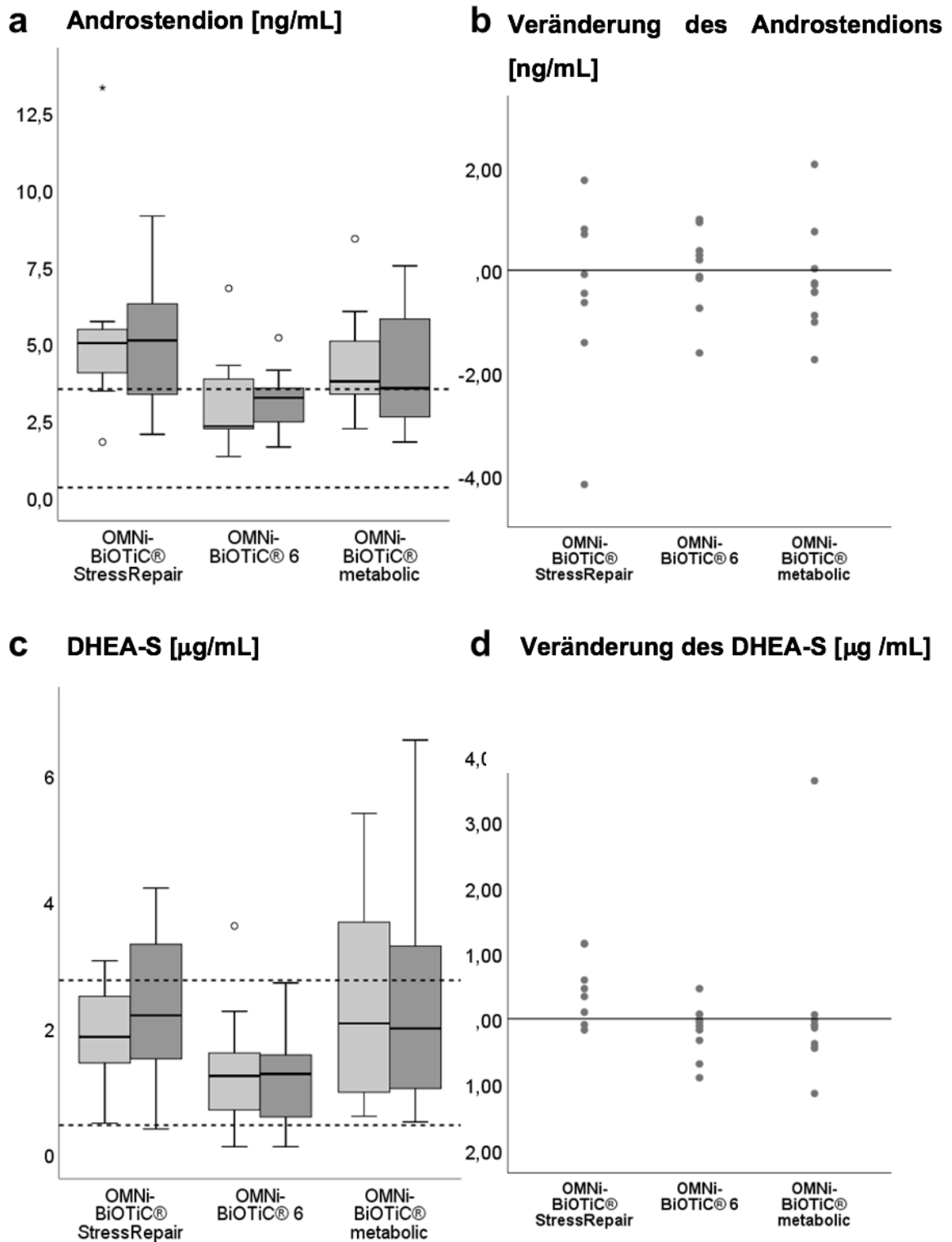
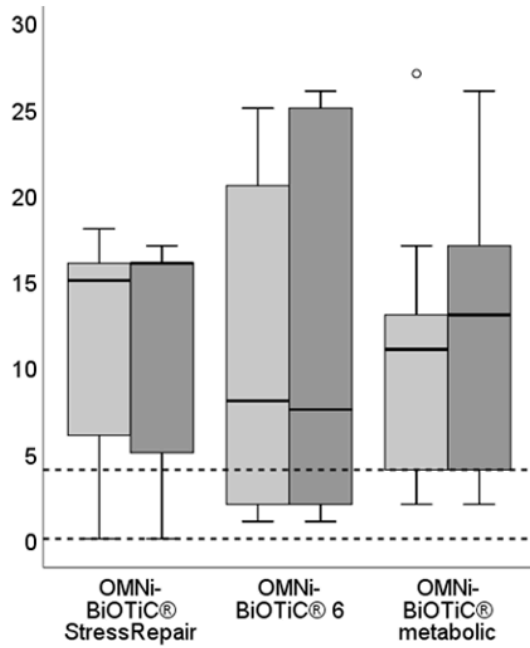


Abbildung 21.: Ergebnis: Androstendion und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEA-S).

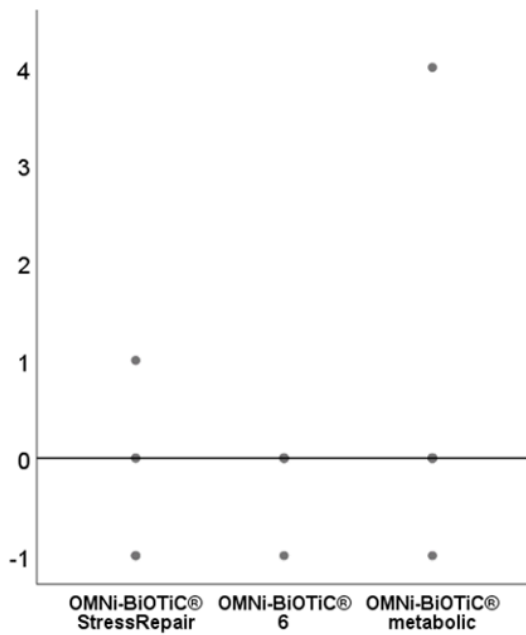
a,c Vergleich von Androstendion und DHEA-S vor und nach der Intervention.

b,d Veränderungen von Androstendion und DHEA-S nach der Intervention.

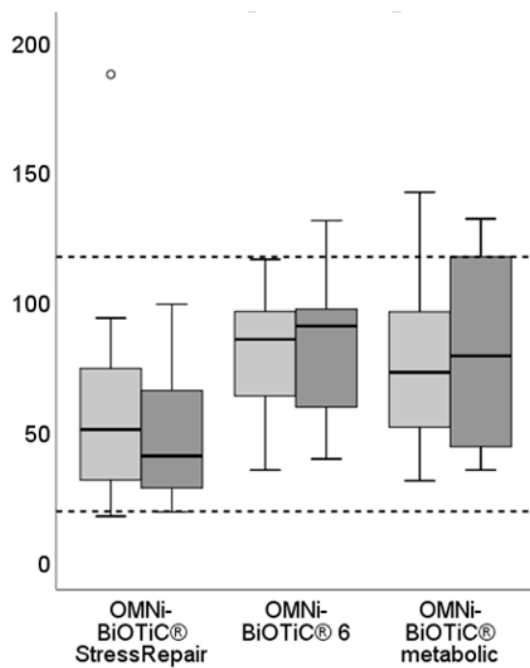
a mFG-Wert



b Veränderung des mFG-Werts



c SHBG [nmol/mL]



d Veränderung des SHBG [nmol/mL]

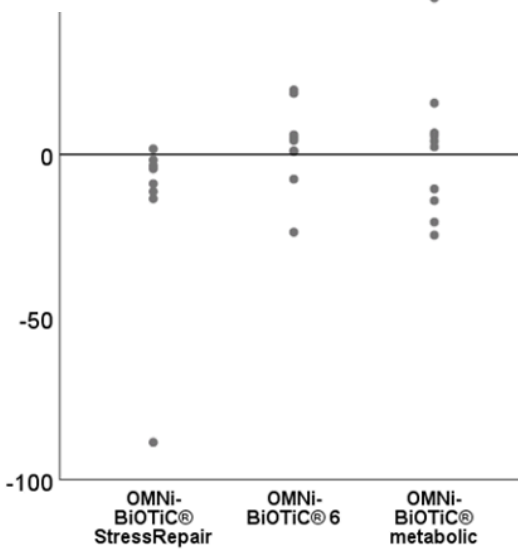


Abbildung 22.: Ergebnis: modifizierter Ferriman-Gallwey Wert (mFG) und SHBG.

a,c Vergleich des mFG-Werts und SHBG vor und nach der Intervention.

b,d Veränderungen von dem mFG-Wert und SHBG nach der Intervention.

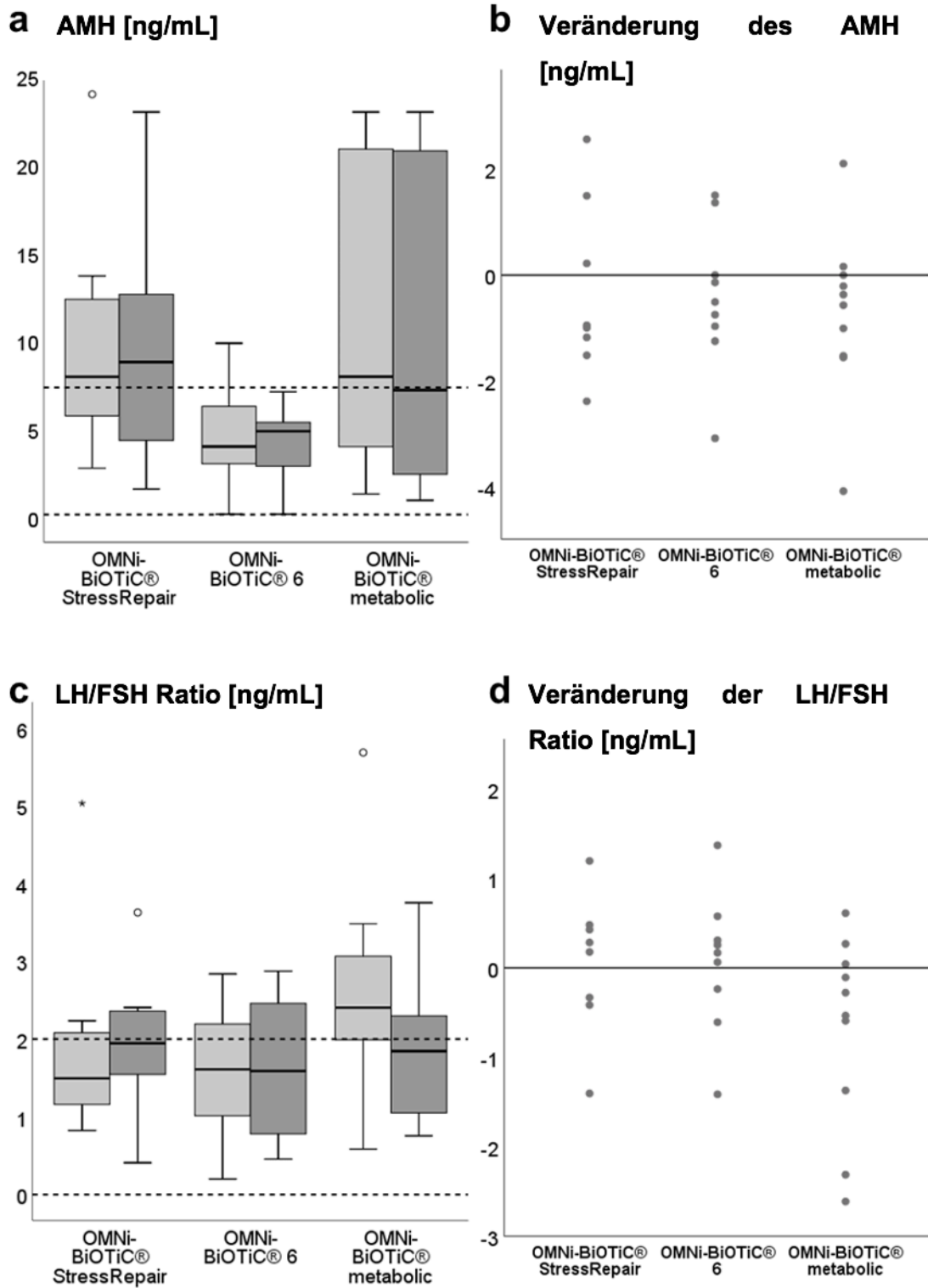
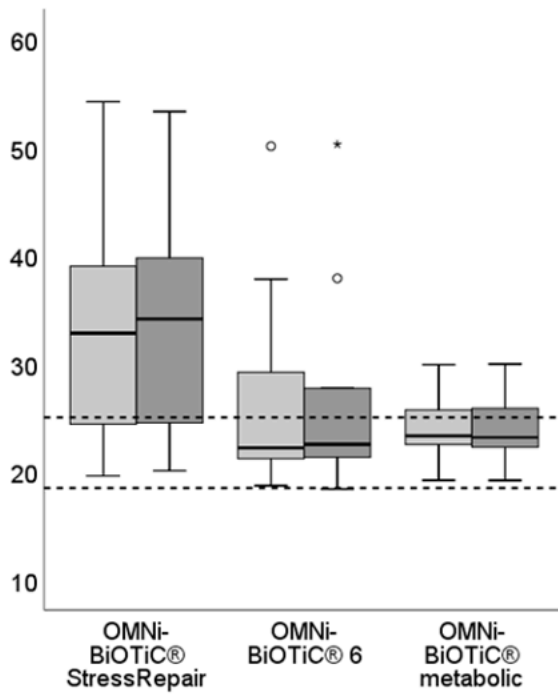


Abbildung 23.: Ergebnis: Anti-Müller Hormon (AMH) und LH/FSH Ratio.

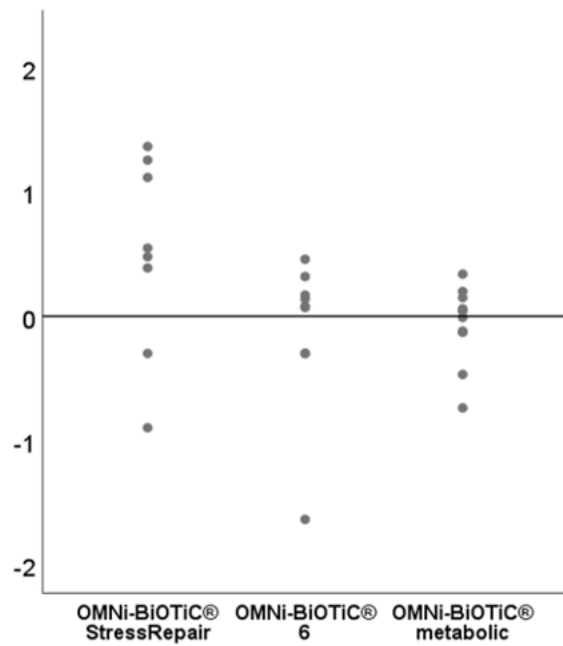
a,c Vergleich von AMH und der LH/FSH-Ratio vor und nach der Intervention.

b,d Veränderungen von AMH und der LH/FSH-Ratio nach der Intervention.

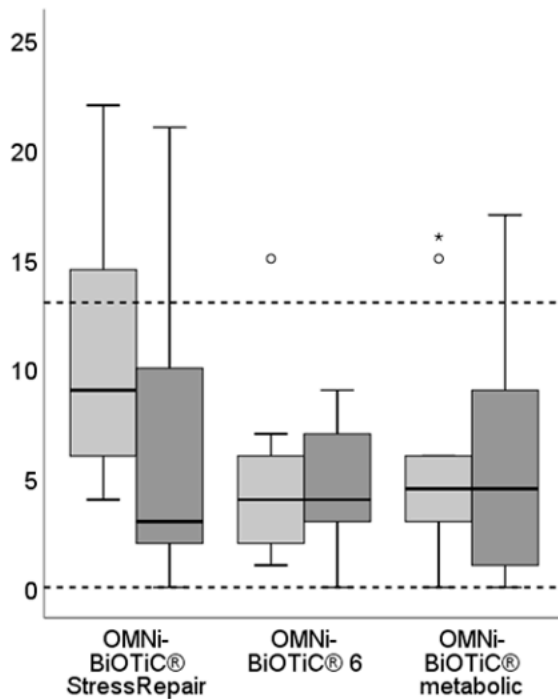
a BMI [kg/m²]



b Veränderung im BMI [kg/m²]



c BDI



d Veränderung der BDI

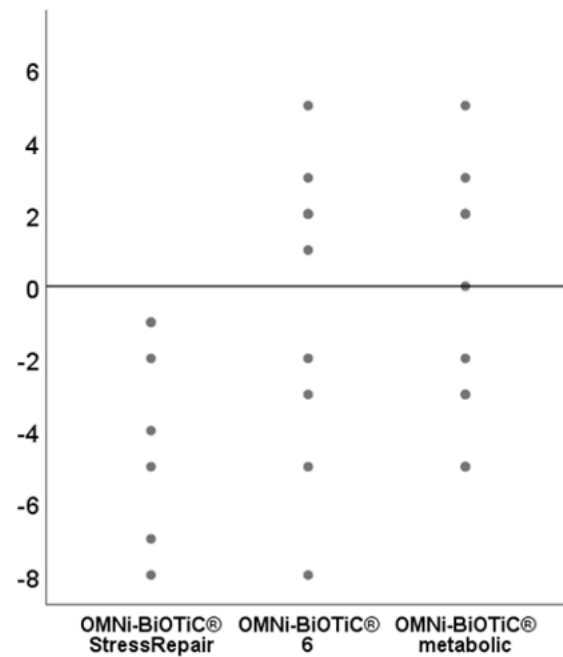
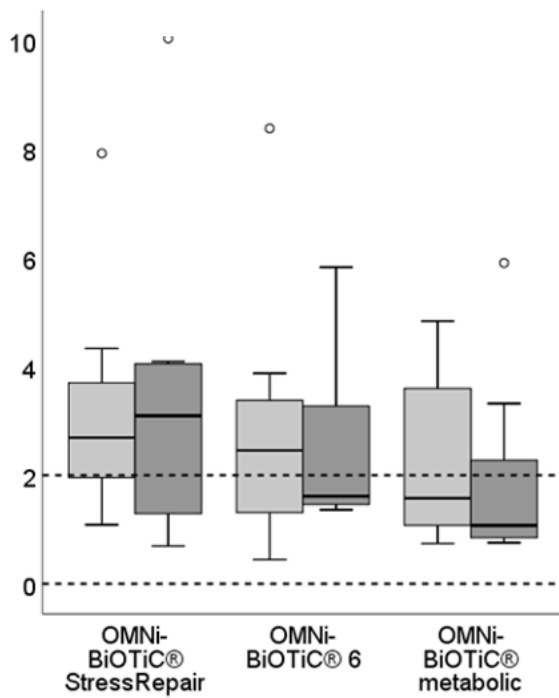


Abbildung 24.: Ergebnis: BMI und Beck's Depression Inventory (BDI).

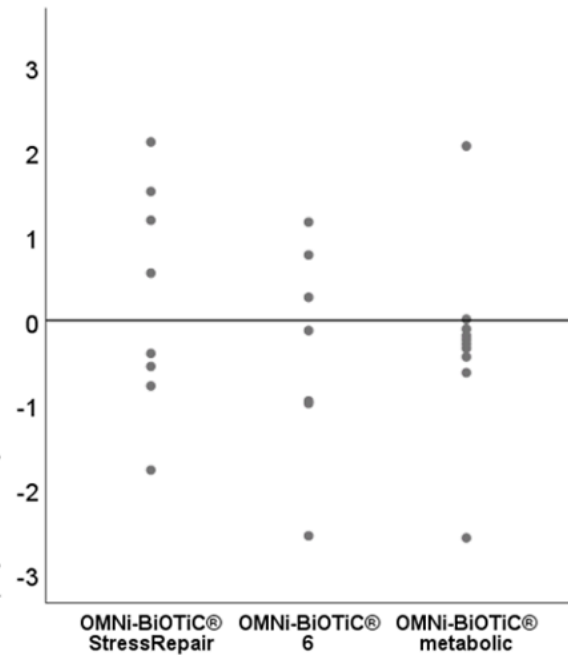
a,c Vergleich des BMI und BDI vor und nach der Intervention.

b,d Veränderungen des BMI und BDI nach der Intervention.

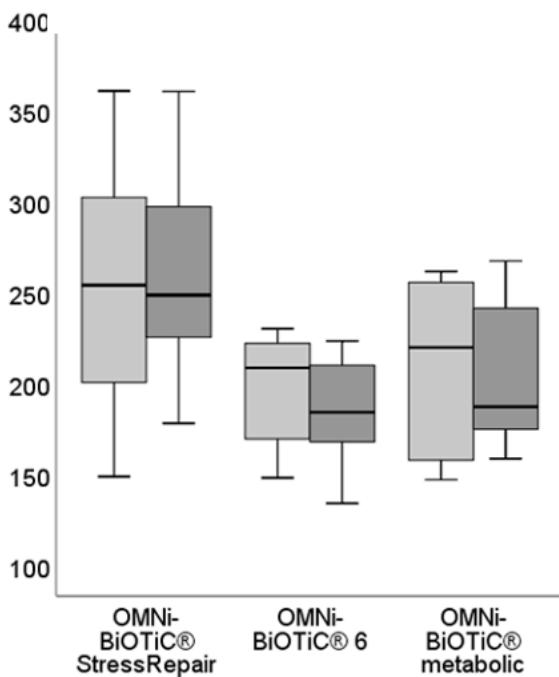
a HOMA-IR



b Veränderung des HOMA-IR



c Glukose AUC [mgH/dL]



d Veränderung der Glukose AUC [mgH/dL]

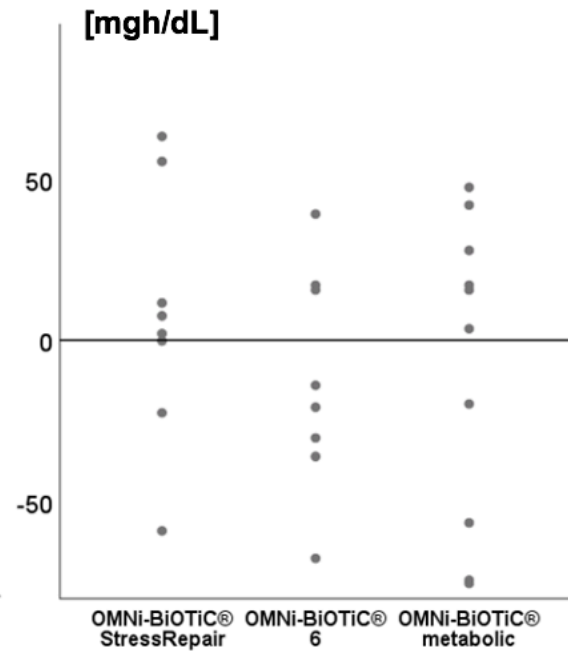


Abbildung 25.: Ergebnis: HOMA-IR und Glukose area under the curve (AUC).

a,c Vergleich des HOMA-IR und der Glukose AUC vor und nach der Intervention.

b,d Veränderungen des HOMA-IR und der Glukose AUC nach der Intervention.

3.3 Veränderungen im Mikrobiom nach der Intervention

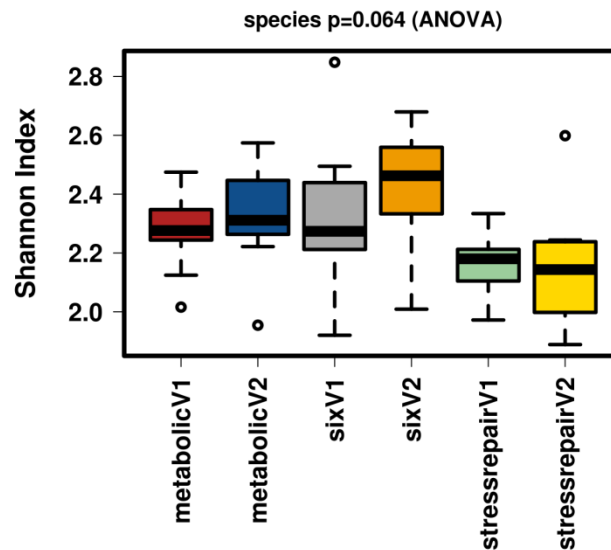


Abbildung 26.: Der Shannon-Index der OMNi-BiOTiC®-Gruppen vor und nach der Intervention.

Basierend auf der Kombination der „Richness“ und „Eveness“ – zwei Alpha-Diversitäts-Marker die im Shannon-Index zusammenfinden, kann man das deutlich bessere Abschneiden der OMNi-BiOTiC® metabolic- und OMNi-BiOTiC® 6-Gruppe, im Vergleich zur OMNi-BiOTiC® Stress repair-Gruppe erkennen. [siehe Abb. 20]

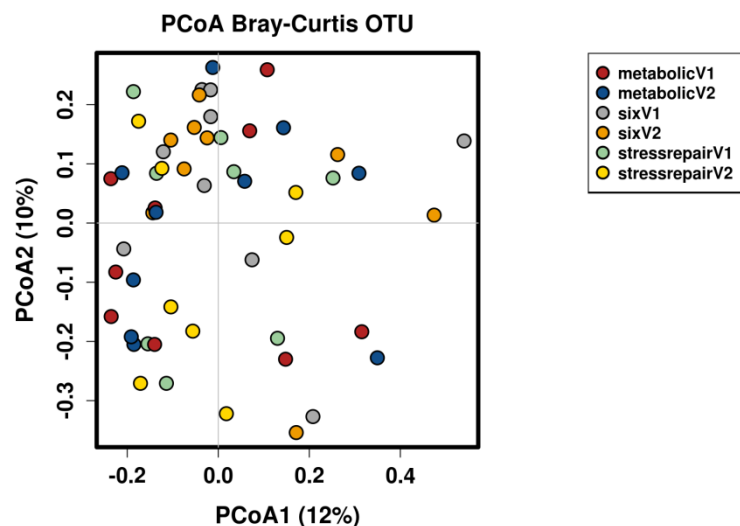


Abbildung 27.: Die Principal Component Analysis (PCoA) der OMNi-BiOTiC®-Gruppen vor und nach der Intervention.

Die PCoA als Darstellung der Beta-Diversität zeigt keine großen Unterschiede zwischen den Gruppen, da kein Clustering sichtbar wird [siehe Abb. 21].

Auch die zusätzlich durchgeführte Linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) ließ keine Unterschiede vor und nach der Intervention erkennen.

Dies deutet darauf hin, dass die interpersonellen Mikrobiom-Unterschiede [siehe Abb. 28] bedeutsamer waren, als die Unterschiede aufgrund der Probiotika-Intervention.

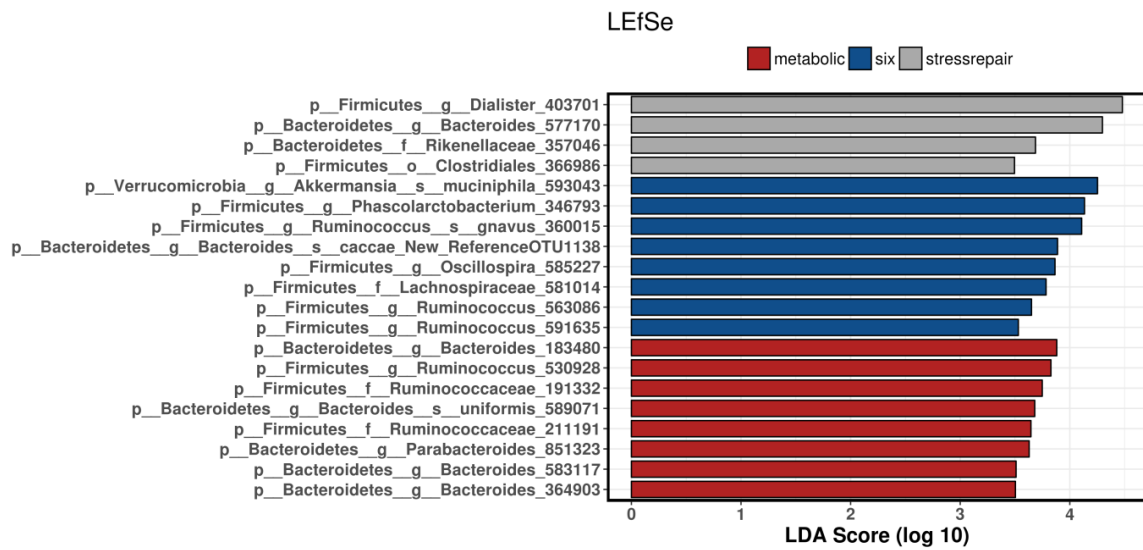


Abbildung 28.: LEfSe Analyse zwischen den drei OMNi-BiOTiC®-Gruppen.

4 Diskussion

In der gegenständlichen Pilot-Studie konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung von Probiotika für eine potentielle PCOS-Therapie eine wesentliche Rolle spielt.

Da aber schon die Therapiestrategie an sich innovativ ist und die hier zugehörigen Vergleichsarbeiten nur mäßig vorhanden sind, sieht es in Bezug auf die Zusammensetzung eines Probiotikums noch ungleich spärlicher aus. Jedoch stellt die Inkonstanz in den Ergebnissen dieser Arbeiten eine wichtige Anregung dar, sich die Zusammensetzungen, mit welchen einige Kollegen signifikante Verbesserungen relevanter PCOS-Parameter erzielen konnten (206,211,212), während andere Arbeitsgruppen kaum Änderungen fanden (213,214), genauer anzusehen.

Die folgende Tabelle zeigt unter A-E die Bakterienstämme der ausgewählten Vergleichsarbeiten und unter SR, 6 und M die der Pilot-Studie an.

Beim Betrachten der Vergleichsarbeiten fällt eines auf: Egal ob die Arbeiten gelungene [grün hinterlegt] oder erfolglose Interventionen [rot hinterlegt] vorweisen, die Mikroorganismen-Zusammensetzung gleicht sich in beiden Fällen.

	A (211)	B (206)	C (212)	D (214)	E (213)	SR	6	M
Lactobacillus acidophilus	x	x	x	x	x	x	x	x
Lactobacillus casei	x	x	x	x	x	x	x	x
Bifidobacterium bifidum	x	x	x			x		
Lactobacillus rhamnosus				x	x			x
Lactobacillus bulgaricus				x	x			
Bifidobacterium breve				x	x			
Bifidobacterium longum				x	x			
Streptococcus thermophiles				x	x			
Lactobacillus paracasei						x		
Bifidobacterium lactis						x		
Lactobacillus salivaris						x	x	
Lactococcus lactis						x	x	x
Bifidobacterium lactis						x		
Lactobacillus plantarum						x		x
Bifidobacterium animalis							x	
Enterococcus faecium							x	x
Lactococcus lactis							x	

Inulin		x	
--------	--	---	--

Tabelle 4.: Auflistung der Probiotika-Zusammensetzung in Vergleichsstudien und in der Pilot-Studie.
SR: OMNi-BiOTiC® stress repair, **6:** OMNi-BiOTiC® 6, **M:** OMNi-BiOTiC® metabolic

Die vorliegende Pilot-Studie schaffte es Aufschluss darüber zu geben, welche Probiotika-Zusammensetzung aus den drei vorgegeben am wirksamsten sein könnte. Und während dies allein als Erfolg zu werten ist, so wird in den Vergleichsarbeiten jedoch ein klares Erfolgsmuster sichtbar, das in der Pilot-Studie (noch) keine Entsprechung findet [siehe Tabelle 4, gelb hinterlegter Bereich im Vergleich zum roten und grünen]. Tatsache ist, dass die signifikant messbaren Verbesserungen in den SHBG-, TT- und mFG-Werten (211), den Insulin-Werten und dem HOMA-IR (206,212), sowie der Nüchtern glukose und dem BMI (206) unter den Vergleichsarbeiten zu finden sind, während sich im Rahmen der Pilot-Studie lediglich Trends ausmachen ließen.

Allerdings muss dies aber in erster Linie auf die Pilot-Studien-typische kleine Stichprobengröße zurückgeführt werden.

Die Vorstudie konnte nämlich durchaus aufzeigen, dass es mit dem erfolgreichsten Präparat der Studie (OMNi-BiOTiC® metabolic) eine theoretisch mögliche deutlich größere probiotische Therapie-Effektivität bei einer größeren Fallzahl und längerer Therapiedauer geben könnte.

Shoaei et al. (214) und Ahmadi et al. (206) machten sich ebenfalls Gedanken zu den unterschiedlichen Ergebnissen der vorhandenen Studien und führten diese gleichsinnig auf die verschieden verwendeten Bakterienstämme zurück. Zusätzlich berücksichtigten sie in ihren Überlegungen auch die verwendete Menge an Mikroorganismen, womit sich ein weiteres Feld mit Forschungsbedarf auftut.

Wieder andere Hinweise postulieren jedoch, dass der positive Effekt der Probiotika-Therapie mehr von der konstanten Einnahme, als von der Höhe der Dosis abhängig ist (215).

Von besonderer Relevanz für Probiotika-Studien ist jedenfalls eine ausreichend große Stichprobe, die allerdings nicht von allen bisher publizierten Arbeiten erreicht worden ist. Es ergibt sich sonst andernfalls die Gefahr die physiologisch vorhandene und interpersonell sehr ausgeprägte Mikrobiom-Variabilität anstelle des Probiotika-Intervention-Effekts zu messen.

Diese Fehlerquelle muss auch in der Pilot-Studie als Erklärung für einige fehlende oder nicht signifikante Änderungen angeführt werden und wird dementsprechend in

der nachfolgenden und aufbauenden RCT-Studie mit einer weitaus höheren Probandinnenzahl ausgeschalten werden.

Wenn sich die eben geschilderten Details auch als herausfordernd darstellen, so ist dieses Therapiekonzept dennoch vielversprechend.

Neben der schon erwähnten Arbeit von Ahmadi et al. (206), in der ein signifikanter Rückgang des BMIs erzielt werden konnte, konnte auch eine weitere Studie eine Reduktion des VAT, SAT und auch des BMIs bei gesunden Erwachsenen nach 12-wöchiger Aufnahme von 200g fermentierter Milch mit zugesetztem *Lactobacillus grasserii* demonstrieren (215). Dies weiter bekräftigend führte eine *Lactobacillus rhamnosus*-Einnahme bei gesunden aber übergewichtigen Frauen für 24 Wochen ebenfalls zu einer Gewichtsabnahme und Körperfettreduktion (216).

Probiotika können hierbei über die Modulation des Darmmikrobioms die Energiebilanz und/oder den Energiemetabolismus beeinflussen, sowie die Leptin-Spiegel reduzieren und damit eine Gewichtsabnahme hervorrufen (216). Die bei Adipositas typische niedrige Alpha-Diversität des Mikrobioms wird damit zusätzlich adressiert (175,189).

Samimi et al. (212) konzentrierten sich in ihren Studien u.a. auf Glukosemetabolismus-Marker und Serumlipide. In ihrer Arbeit ergaben sich so nach einer 12-wöchigen Probiotika-Intervention signifikante Verbesserungen des HOMA-IR, des Serum-Insulins und der Blutfettwerte. Da das PCOS bekanntermaßen stark mit dem Glukosestoffwechsel assoziiert ist (3), kann eine probiotische Intervention daher möglicherweise eine metabolische Progression zu DMT2 und kardiovaskulären Krankheiten verhindern helfen (98). Die Beziehung vom PCOS zur IR begründet sich hierbei zumindest gewissermaßen in der geringeren Alpha-Diversität der Mikrobiome von PCOS-Patientinnen (188,189), die davon positiv beeinflusst werden könnte.

Eine 4-wöchige *Lactobacillus acidophilus*-Einnahme unter DMT2-Proband*innen konnte so deren Insulinsensitivität erhalten, während sie in der Placebo-Gruppe reduziert wurde (217). In ähnlicher Weise konnte eine probiotische Multispezies-Supplementation für 8 Wochen bei Diabetes-Patient*innen eine Erhöhung des Nüchternblutzuckers vermeiden (218) und eine weitere in gleicher Ausgangslage den HOMA-IR signifikant senken (219).

Auch die schon zitierte Arbeit von Ahmadi et al. (206) konnte die Senkung des HOMA-IR zusammen mit dem Nüchternblutzucker und dem Seruminsulin bei PCOS-Patientinnen zusätzlich belegen.

Karamali et al. (211) erreichten außerdem mit einer 12-wöchigen Probiotika-Behandlung signifikante zusätzliche Verbesserungen der HA-Parameter, welche eine Erhöhung des SHBG bei gleichzeitiger Erniedrigung des TT und des mFG-Werts beinhalteten. Bezogen auf die SHBG-Erhöhung und mFG-Wert-Erniedrigung konnte dies auch eine zweite Arbeit bestätigen (220).

5 Conclusio

Zusammenfassend lieferte die Pro-PCOS Pilot-Studie wichtige Trends bezogen auf die Auswahl an potentiell therapeutisch wirksamen Bakterienstämmen. Damit trägt diese Studie in Zusammenschau mit den Vergleichsarbeiten zu einem bisher wenig beachteten Teil in der PCOS-Forschung bei.

Es sei betont, dass sich die Überlegung am Ende dieser Diplomarbeit weniger auf die Wirksamkeit der Probiotika per se bezieht, sondern ihr Augenmerk eher auf die Zusammensetzung und mögliche Endpunkte richtet. Die vorliegende Arbeit konnte damit das Potenzial des Mikroorganismen-gestützten Behandlungsansatzes aufzeigen und will nun anhand ihres Ergebnisses auf die Notwendigkeit zusätzlicher wissenschaftlicher Erkenntnisse im Kontext der Komposition an therapeutischen Bakterien hinweisen.

In diesem komplexen Forschungsgebiet sind große Stichprobengrößen ebenso von Bedeutung wie die überlegte Probiotika-Auswahl und eine adäquate und umfassende Untersuchungsmethodik. Damit sollte es in Zukunft gelingen, diese neuartige Intervention im Umgang mit dem PCOS für viele Patientinnen erfolgreich zu nutzen.

6 Literaturverzeichnis

1. Sichtermann B. Johanna von Orléans: Das unglaubliche Mädchen | ZEIT ONLINE. Johanna von Orléans: Das unglaubliche Mädchen [Internet]. 2012 [cited 2020 Aug 2]; Available from: <https://www.zeit.de/2012/02/Johanna-von-Orleans>
2. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2004 Jan;81(1):19–25.
3. Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. *Lancet (London, England)*. 2007 Aug;370(9588):685–97.
4. Diamanti-Kandarakis E, Kouli CR, Bergiele AT, Filandra FA, Tsianateli TC, Spina GG, et al. A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek island of Lesbos: hormonal and metabolic profile. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Nov;84(11):4006–11.
5. Yildiz BO, Bozdog G, Yapici Z, Esinler I, Yarali H. Prevalence, phenotype and cardiometabolic risk of polycystic ovary syndrome under different diagnostic criteria. *Hum Reprod*. 2012 Oct;27(10):3067–73.
6. Escobar-Morreale HF. Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 2018 May;14(5):270–84.
7. Puurunen J, Piltonen T, Morin-Papunen L, Perheentupa A, Järvelä I, Ruokonen A, et al. Unfavorable hormonal, metabolic, and inflammatory alterations persist after menopause in women with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Jun;96(6):1827–34.
8. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril*. 2009 Feb;91(2):456–88.
9. Udall SR. FRIDA KAHLO S MEXICAN BODY History, Identity, and Artistic Aspiration. 2011.
10. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Nov;91(11):4237–45.

11. Joham AE, Teede HJ, Ranasinha S, Zoungas S, Boyle J. Prevalence of infertility and use of fertility treatment in women with polycystic ovary syndrome: data from a large community-based cohort study. *J Womens Health (Larchmt)*. 2015 Apr;24(4):299–307.
12. Wehr SE, Wehr E, Obermayer-Pietsch B, Univ-Prof med Barbara Obermayer-Pietsch A. Online-Datenbank mit Autoren-und Stichwortsuche Das polyzystische Ovarialsyndrom: Im Spannungsfeld von Hormonen und Das polyzystische Ovarialsyndrom 7 Das polyzystische Ovarialsyndrom: Im Spannungsfeld von Hormonen und Stoffwechsel Einleitung [Internet]. Vol. 3, *Austrian Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism Austrian Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2010 [cited 2020 May 20]. Available from: www.kup.at/klinendokrinologie
13. Wells JCK. Sexual dimorphism of body composition. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2007 Sep;21(3):415–30.
14. Wehr E, Möller R, Horejsi R, Giuliani A, Kopera D, Schweighofer N, et al. Subcutaneous adipose tissue topography and metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome. *Wien Klin Wochenschr* [Internet]. 2009;121(7):262–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00508-009-1162-2>
15. Carvalho LML, Dos Reis FM, Candido AL, Nunes FFC, Ferreira CN, Gomes KB. Polycystic Ovary Syndrome as a systemic disease with multiple molecular pathways: a narrative review. *Endocr Regul*. 2018 Oct;52(4):208–21.
16. Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG, Kandarakis SA, Chrousos GP. Pathophysiology and types of dyslipidemia in PCOS. *Trends Endocrinol Metab*. 2007 Sep;18(7):280–5.
17. Franks S, McCarthy M. Genetics of ovarian disorders: polycystic ovary syndrome. *Rev Endocr Metab Disord*. 2004 Mar;5(1):69–76.
18. Palomba S, Santagni S, Falbo A, La Sala GB. Complications and challenges associated with polycystic ovary syndrome: current perspectives. *Int J Womens Health*. 2015;7:745–63.
19. Dokras A, Clifton S, Futterweit W, Wild R. Increased prevalence of anxiety symptoms in women with polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2012 Jan;97(1):225-30.e2.

20. Dokras A, Clifton S, Futterweit W, Wild R. Increased risk for abnormal depression scores in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2011 Jan;117(1):145–52.
21. Polak AM, Adamska A, Krentowska A, Łebkowska A, Hryniewicka J, Adamski M, et al. Body Composition, Serum Concentrations of Androgens and Insulin Resistance in Different Polycystic Ovary Syndrome Phenotypes. *J Clin Med.* 2020 Mar;9(3).
22. Moghetti P, Tosi F, Bonin C, Di Sarra D, Fiers T, Kaufman J-M, et al. Divergences in insulin resistance between the different phenotypes of the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Apr;98(4):E628-37.
23. Guastella E, Longo RA, Carmina E. Clinical and endocrine characteristics of the main polycystic ovary syndrome phenotypes. *Fertil Steril.* 2010 Nov;94(6):2197–201.
24. Kahsar-Miller M, Azziz R. The development of the polycystic ovary syndrome: family history as a risk factor. *Trends Endocrinol Metab.* 1998 Feb;9(2):55–8.
25. Legro RS, Kunesman AR, Demers L, Wang SC, Bentley-Lewis R, Dunaif A. Elevated dehydroepiandrosterone sulfate levels as the reproductive phenotype in the brothers of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 May;87(5):2134–8.
26. Escobar-Morreale HF, Luque-Ramírez M, San Millán JL. The Molecular-Genetic Basis of Functional Hyperandrogenism and the Polycystic Ovary Syndrome. *Endocr Rev* [Internet]. 2005 Apr;26(2):251–82. Available from: <https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/er.2004-0004>
27. Faghfoori Z, Fazelian S, Shadnoush M, Goodarzi R. Nutritional management in women with polycystic ovary syndrome: A review study. *Diabetes Metab Syndr.* 2017 Nov;11 Suppl 1:S429–32.
28. All Answers Ltd. Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Pathophysiology, Diagnosis, Causes and Risks [Internet]. Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Pathophysiology, Diagnosis, Causes and Risks. 2018 [cited 2020 Oct 1]. Available from: <https://ukdiss.com/examples/polycystic-ovary-syndrome-pathophysiology-risks.php>
29. Abbott DH, Barnett DK, Bruns CM, Dumesic DA. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for

- polycystic ovary syndrome? Hum Reprod Update. 2005;11(4):357–74.
30. Rojas J, Chávez M, Olivar L, Rojas M, Morillo J, Mejías J, et al. Polycystic ovary syndrome, insulin resistance, and obesity: navigating the pathophysiologic labyrinth. *Int J Reprod Med*. 2014;2014:719050.
 31. Burger HG. Androgen production in women. *Fertil Steril* [Internet]. 2002;77:3–5. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028202029850>
 32. AMBOSS GmbH. Sexualhormone - Wissen für Mediziner [Internet]. Sexualhormone. 2020 [cited 2020 May 17]. Available from: <https://www.amboss.com/de/wissen/Sexualhormone>
 33. Al Kindi MK, Al Essry FS, Al Essry FS, Mula-Abed W-AS. Validity of serum testosterone, free androgen index, and calculated free testosterone in women with suspected hyperandrogenism. *Oman Med J*. 2012 Nov;27(6):471–4.
 34. Kempegowda P, Melson E, Manolopoulos KN, Arlt W, O'Reilly MW. Implicating androgen excess in propagating metabolic disease in polycystic ovary syndrome. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2020;11:2042018820934319.
 35. Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Sluss PM, Raff H. Position statement: Utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an Endocrine Society position statement. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Feb;92(2):405–13.
 36. Wikipedia contributors. Testosteron – Wikipedia [Internet]. Testosteron. 2020 [cited 2020 Sep 27]. Available from: <https://de.wikipedia.org/wiki/Testosteron>
 37. Wikipedia contributors. Ferriman–Gallwey score - Wikipedia [Internet]. Ferriman–Gallwey score. 2020 [cited 2020 Aug 11]. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Ferriman–Gallwey_score
 38. Wikipedia contributors. Massenwirkungsgesetz – Wikipedia [Internet]. Massenwirkungsgesetz. 2020 [cited 2020 Sep 28]. Available from: <https://de.wikipedia.org/wiki/Massenwirkungsgesetz>
 39. Wikipedia contributors. Dissoziationskonstante – Wikipedia [Internet]. Dissoziationskonstante. 2020 [cited 2020 Sep 28]. Available from: <https://de.wikipedia.org/wiki/Dissoziationskonstante>
 40. Miller KK, Rosner W, Lee H, Hier J, Sesmilo G, Schoenfeld D, et al. Measurement of free testosterone in normal women and women with androgen deficiency: comparison of methods. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2004;89(2):525—533. Available from:

<https://doi.org/10.1210/jc.2003-030680>

41. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Oct;84(10):3666–72.
42. Sanchez-Garrido MA, Tena-Sempere M. Metabolic dysfunction in polycystic ovary syndrome: Pathogenic role of androgen excess and potential therapeutic strategies. *Mol Metab.* 2020 May;35:100937.
43. Gilling-Smith C, Willis DS, Beard RW, Franks S. Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 Oct;79(4):1158–65.
44. Qiao J, Feng HL. Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. *Hum Reprod Update.* 2011;17(1):17–33.
45. Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ, Bondy CA. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *J Clin Invest.* 1998 Jun;101(12):2622–9.
46. Vendola K, Zhou J, Wang J, Bondy CA. Androgens promote insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-I receptor gene expression in the primate ovary. *Hum Reprod.* 1999 Sep;14(9):2328–32.
47. Yildiz BO, Azziz R. The adrenal and polycystic ovary syndrome. *Rev Endocr Metab Disord.* 2007 Dec;8(4):331–42.
48. Diamanti-Kandarakis E. Role of obesity and adiposity in polycystic ovary syndrome. *Int J Obes (Lond).* 2007 Nov;31 Suppl 2:S8-13; discussion S31-2.
49. Lim SS, Norman RJ, Davies MJ, Moran LJ. The effect of obesity on polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev an Off J Int Assoc Study Obes.* 2013 Feb;14(2):95–109.
50. Dieudonne MN, Pecquery R, Boumediene A, Leneuve MC, Giudicelli Y. Androgen receptors in human preadipocytes and adipocytes: regional specificities and regulation by sex steroids. *Am J Physiol.* 1998 Jun;274(6):C1645-52.
51. Cortón M, Botella-Carretero JI, Benguría A, Villuendas G, Zaballos A, San Millán JL, et al. Differential gene expression profile in omental adipose tissue in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jan;92(1):328–37.

52. Mannerås-Holm L, Leonhardt H, Kullberg J, Jennische E, Odén A, Holm G, et al. Adipose tissue has aberrant morphology and function in PCOS: enlarged adipocytes and low serum adiponectin, but not circulating sex steroids, are strongly associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Feb;96(2):E304-11.
53. Danforth E. Failure of adipocyte differentiation causes type II diabetes mellitus? *Nat Genet* [Internet]. 2000;26(1):13. Available from: <https://doi.org/10.1038/79111>
54. de Zegher F, Lopez-Bermejo A, Ibáñez L. Adipose tissue expandability and the early origins of PCOS. *Trends Endocrinol Metab.* 2009 Nov;20(9):418–23.
55. Escobar-Morreale HF, San Millan JL. Abdominal adiposity and the polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol Metab.* 2007 Sep;18(7):266–72.
56. Rae M, Grace C, Hogg K, Wilson LM, McHaffie SL, Ramaswamy S, et al. The pancreas is altered by in utero androgen exposure: implications for clinical conditions such as polycystic ovary syndrome (PCOS). *PLoS One.* 2013;8(2):e56263.
57. Xu W, Morford J, Mauvais-Jarvis F. Emerging role of testosterone in pancreatic β -cell function and insulin secretion. *J Endocrinol.* 2019 Jan;
58. Jones H, Sprung VS, Pugh CJA, Daousi C, Irwin A, Aziz N, et al. Polycystic ovary syndrome with hyperandrogenism is characterized by an increased risk of hepatic steatosis compared to nonhyperandrogenic PCOS phenotypes and healthy controls, independent of obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Oct;97(10):3709–16.
59. Nestler JE, Powers LP, Matt DW, Steingold KA, Plymate SR, Rittmaster RS, et al. A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991 Jan;72(1):83–9.
60. AMBOSS GmbH. Menstruationszyklus und Zyklusanomalien - Wissen für Mediziner [Internet]. Menstruationszyklus und Zyklusanomalien. 2020 [cited 2020 May 18]. Available from: https://www.amboss.com/de/wissen/Menstruationszyklus_und_Zyklusanomalien
61. Georg Thieme Verlag KG. Steroidhormone: Synthese - via medici: leichter lernen - mehr verstehen [Internet]. Steroidhormone: Synthese. 2020 [cited

- 2020 Sep 21]. Available from: <https://viamedici.thieme.de/lernmodul/548972/subject/biochemie/hormone/die+einzelnen+hormone/steroidhormone+synthese>
62. Franks S, Stark J, Hardy K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*. 2008;14(4):367–78.
 63. Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Paul SJ, Ortolano GA, Kelch RP. Gonadotropin-releasing hormone pulses: regulators of gonadotropin synthesis and ovulatory cycles. *Recent Prog Horm Res*. 1991;47:155–9.
 64. Waldstreicher J, Santoro NF, Hall JE, Filicori M, Crowley WFJ. Hyperfunction of the hypothalamic-pituitary axis in women with polycystic ovarian disease: indirect evidence for partial gonadotroph desensitization. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988 Jan;66(1):165–72.
 65. Burt Solorzano CM, Beller JP, Abshire MY, Collins JS, McCartney CR, Marshall JC. Neuroendocrine dysfunction in polycystic ovary syndrome. *Steroids* [Internet]. 2011/12/08. 2012 Mar 10;77(4):332–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22172593>
 66. Eagleson CA, Gingrich MB, Pastor CL, Arora TK, Burt CM, Evans WS, et al. Polycystic ovarian syndrome: evidence that flutamide restores sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Nov;85(11):4047–52.
 67. Azziz R, Carmina E, Chen Z, Dunaif A, Laven JSE, Legro RS, et al. Polycystic ovary syndrome. *Nat Rev Dis Prim*. 2016 Aug;2:16057.
 68. Broekmans FJ, Visser JA, Laven JSE, Broer SL, Themmen APN, Fauser BC. Anti-Müllerian hormone and ovarian dysfunction. *Trends Endocrinol Metab*. 2008 Nov;19(9):340–7.
 69. Catteau-Jonard S, Dewailly D. Pathophysiology of polycystic ovary syndrome: the role of hyperandrogenism. *Front Horm Res*. 2013;40:22–7.
 70. Dewailly D, Lujan ME, Carmina E, Cedars MI, Laven J, Norman RJ, et al. Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Hum Reprod Update*. 2014;20(3):334–52.
 71. DocCheck Medical Services GmbH. Insulinsekretion - DocCheck Flexikon [Internet]. Insulinsekretion. 2020 [cited 2020 May 28]. Available from: <https://flexikon.doccheck.com/de/Insulinsekretion>

72. Cheng K, Andrikopoulos S, Gunton JE. First phase insulin secretion and type 2 diabetes. *Curr Mol Med*. 2013 Jan;13(1):126–39.
73. Leibowitz G, Kaiser N, Cerasi E. β -Cell failure in type 2 diabetes. *J Diabetes Investig*. 2011 Apr;2(2):82–91.
74. Legro RS, Castracane VD, Kauffman RP. Detecting insulin resistance in polycystic ovary syndrome: purposes and pitfalls. *Obstet Gynecol Surv*. 2004 Feb;59(2):141–54.
75. Khan KA, Stas S, Kurukulasuriya LR. Polycystic ovarian syndrome. *J Cardiometab Syndr*. 2006;1(2):122–5.
76. Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocr Rev*. 2012 Dec;33(6):981–1030.
77. Dunaif A, Finegood DT. Beta-cell dysfunction independent of obesity and glucose intolerance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Mar;81(3):942–7.
78. Ehrmann DA, Sturis J, Byrne MM, Karrison T, Rosenfield RL, Polonsky KS. Insulin secretory defects in polycystic ovary syndrome. Relationship to insulin sensitivity and family history of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1995 Jul;96(1):520–7.
79. Bergman RN, Phillips LS, Cobelli C. Physiologic evaluation of factors controlling glucose tolerance in man: measurement of insulin sensitivity and beta-cell glucose sensitivity from the response to intravenous glucose. *J Clin Invest*. 1981 Dec;68(6):1456–67.
80. Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK, Boyko EJ, Bergman RN, Schwartz MW, et al. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. *Diabetes*. 1993 Nov;42(11):1663–72.
81. Arslanian SA, Lewy VD, Danadian K. Glucose intolerance in obese adolescents with polycystic ovary syndrome: roles of insulin resistance and beta-cell dysfunction and risk of cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Jan;86(1):66–71.
82. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*.

- 1985 Jul;28(7):412–9.
83. Singh B, Saxena A. Surrogate markers of insulin resistance: A review. *World J Diabetes*. 2010 May;1(2):36–47.
 84. Green A, Rumberger JM, Stuart CA, Ruhoff MS. Stimulation of lipolysis by tumor necrosis factor-alpha in 3T3-L1 adipocytes is glucose dependent: implications for long-term regulation of lipolysis. *Diabetes*. 2004 Jan;53(1):74–81.
 85. Boden G, Chen X, Ruiz J, White J V, Rossetti L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest*. 1994 Jun;93(6):2438–46.
 86. Carmina E, Bucchieri S, Esposito A, Del Puente A, Mansueto P, Orio F, et al. Abdominal fat quantity and distribution in women with polycystic ovary syndrome and extent of its relation to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jul;92(7):2500–5.
 87. Dunaif A, Segal KR, Shelley DR, Green G, Dobrjansky A, Licholai T. Evidence for distinctive and intrinsic defects in insulin action in polycystic ovary syndrome. *Diabetes*. 1992 Oct;41(10):1257–66.
 88. González F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP. Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Jan;91(1):336–40.
 89. RIZZA RA, MANDARINO LJ, GERICH JE. Cortisol-Induced Insulin Resistance in Man: Impaired Suppression of Glucose Production and Stimulation of Glucose Utilization due to a Postreceptor Defect of Insulin Action*. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1982 Jan 1;54(1):131–8. Available from: <https://doi.org/10.1210/jcem-54-1-131>
 90. Pasquali R, Diamanti-Kandarakis E, Gambineri A. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Secondary polycystic ovary syndrome: theoretical and practical aspects. *Eur J Endocrinol* [Internet]. 2016;175(4):R157–69. Available from: <https://eje.bioscientifica.com/view/journals/eje/175/4/R157.xml>
 91. Tosi F, Negri C, Brun E, Castello R, Faccini G, Bonora E, et al. Insulin enhances ACTH-stimulated androgen and glucocorticoid metabolism in hyperandrogenic women. *Eur J Endocrinol*. 2011 Feb;164(2):197–203.
 92. Adashi EY, Hsueh AJ, Yen SS. Insulin enhancement of luteinizing hormone

- and follicle-stimulating hormone release by cultured pituitary cells. *Endocrinology*. 1981 Apr;108(4):1441–9.
93. Nestler JE, Jakubowicz DJ, de Vargas AF, Brik C, Quintero N, Medina F. Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Jun;83(6):2001–5.
 94. Magoffin DA. Ovarian theca cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 Jul;37(7):1344–9.
 95. Svendsen PF, Madsbad S, Nilas L. The insulin-resistant phenotype of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* [Internet]. 2010 Aug 1;94(3):1052–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.04.008>
 96. DeUgarte CM, Bartolucci AA, Azziz R. Prevalence of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment. *Fertil Steril*. 2005 May;83(5):1454–60.
 97. Glueck CJ, Papanna R, Wang P, Goldenberg N, Sieve-Smith L. Incidence and treatment of metabolic syndrome in newly referred women with confirmed polycystic ovarian syndrome. *Metabolism*. 2003 Jul;52(7):908–15.
 98. Ali AT. Polycystic ovary syndrome and metabolic syndrome. *Ces Gynecol*. 2015 Aug;80(4):279–89.
 99. Sam S. Adiposity and metabolic dysfunction in polycystic ovary syndrome. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2015 Feb;21(2):107–16.
 100. Echiburu B, Perez-Bravo F, Galgani JE, Sandoval D, Saldias C, Crisosto N, et al. Enlarged adipocytes in subcutaneous adipose tissue associated to hyperandrogenism and visceral adipose tissue volume in women with polycystic ovary syndrome. *Steroids*. 2018 Feb;130:15–21.
 101. Blouin K, Nadeau M, Perreault M, Veilleux A, Drolet R, Marceau P, et al. Effects of androgens on adipocyte differentiation and adipose tissue explant metabolism in men and women. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010 Feb;72(2):176–88.
 102. Arner P. Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005 Dec;19(4):471–82.
 103. AMBOSS GmbH. Fettgewebe - Wissen für Mediziner [Internet]. Fettgewebe. 2019 [cited 2020 May 22]. Available from:

<https://www.amboss.com/de/wissen/Fettgewebe>

104. DocCheck Medical Services GmbH. Adiponectin - DocCheck Flexikon [Internet]. Adiponectin. 2017 [cited 2020 May 22]. Available from: <https://flexikon.doccheck.com/de/Adiponektin>
105. DocCheck Medical Services GmbH. Interleukin-6 - DocCheck Flexikon [Internet]. Interleukin-6. 2020 [cited 2020 May 22]. Available from: <https://flexikon.doccheck.com/de/Interleukin-6>
106. DocCheck Medical Services GmbH. Tumornekrosefaktor - DocCheck Flexikon [Internet]. Tumornekrosefaktor. 2017 [cited 2020 May 22]. Available from: <https://flexikon.doccheck.com/de/Tumornekrosefaktor-alpha>
107. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011 Feb;11(2):85–97.
108. Xita N, Papassotiriou I, Georgiou I, Vounatsou M, Margeli A, Tsatsoulis A. The adiponectin-to-leptin ratio in women with polycystic ovary syndrome: relation to insulin resistance and proinflammatory markers. *Metabolism*. 2007 Jun;56(6):766–71.
109. Carmina E, Chu MC, Moran C, Tortoriello D, Vardhana P, Tena G, et al. Subcutaneous and omental fat expression of adiponectin and leptin in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2008 Mar;89(3):642–8.
110. Escobar-Morreale HF, Luque-Ramírez M, González F. Circulating inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: a systematic review and metaanalysis. *Fertil Steril*. 2011 Mar;95(3):1042–8.
111. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002 Dec;106(25):3143–421.
112. AMBOSS GmbH. Lipide - Wissen für Mediziner [Internet]. Lipide. 2020 [cited 2020 May 23]. Available from: <https://www.amboss.com/de/wissen/Lipide>
113. Holte J, Gennarelli G, Berne C, Bergh T, Lithell H. Elevated ambulatory daytime blood pressure in women with polycystic ovary syndrome: a sign of a pre-hypertensive state? *Hum Reprod*. 1996 Jan;11(1):23–8.
114. Lind L, Andersson PE, Andrén B, Hänni A, Lithell HO. Left ventricular hypertrophy in hypertension is associated with the insulin resistance metabolic syndrome. *J Hypertens*. 1995 Apr;13(4):433–8.

115. Scicchitano P, Dentamaro I, Carbonara R, Bulzis G, Dachille A, Caputo P, et al. Cardiovascular Risk in Women With PCOS. *Int J Endocrinol Metab* [Internet]. 2012/09/30. 2012;10(4):611–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23843832>
116. Gray L, Lee I-M, Sesso HD, Batty GD. Blood pressure in early adulthood, hypertension in middle age, and future cardiovascular disease mortality: HAHS (Harvard Alumni Health Study). *J Am Coll Cardiol*. 2011 Nov;58(23):2396–403.
117. Sarray S, Madan S, Saleh LR, Mahmoud N, Almawi WY. Validity of adiponectin-to-leptin and adiponectin-to-resistin ratios as predictors of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2015 Aug;104(2):460–6.
118. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*. 2001 Jul;286(3):327–34.
119. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)*. 2007 Nov;83(5 Suppl):S192-203.
120. Fernandez-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev*. 2003 Jun;24(3):278–301.
121. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*. 2007 Apr;56(4):901–11.
122. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jun;89(6):2548–56.
123. Delitala AP, Capobianco G, Delitala G, Cherchi PL, Dessole S. Polycystic ovary syndrome, adipose tissue and metabolic syndrome. *Arch Gynecol Obstet*. 2017 Sep;296(3):405–19.
124. Carvalho LML, Ferreira CN, de Oliveira DKD, Rodrigues KF, Duarte RCF, Teixeira MFA, et al. Haptoglobin levels, but not Hp1-Hp2 polymorphism, are associated with polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2017;34(12):1691—1698. Available from: <https://europepmc.org/articles/PMC5714822>
125. Carvalho LML, Ferreira CN, Sóter MO, Sales MF, Rodrigues KF, Martins SR, et al. Microparticles: Inflammatory and haemostatic biomarkers in Polycystic

- Ovary Syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2017 Mar;443:155–62.
126. Mohammadi M. Oxidative Stress and Polycystic Ovary Syndrome: A Brief Review. *Int J Prev Med*. 2019;10:86.
 127. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012 Jun;10:49.
 128. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol [Internet]*. 2006 Jun;141(2):312–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16760481>
 129. Amboss GmbH. Diabetes mellitus - AMBOSS [Internet]. Diabetes Mellitus. 2020 [cited 2020 May 30]. Available from: <https://next.amboss.com/de/article/3g0SE2#Zafd99d5f511edbccb9b7e30f02978af4>
 130. Thorpe SR, Baynes JW. Role of the Maillard reaction in diabetes mellitus and diseases of aging. *Drugs Aging*. 1996 Aug;9(2):69–77.
 131. Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Kalofoutis A, Creatsas G. Increased levels of serum advanced glycation end-products in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005 Jan;62(1):37–43.
 132. Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Korkolopoulou P, Kandarakis E, Levidou G, Papalois A, et al. Accumulation of dietary glycotoxins in the reproductive system of normal female rats. *J Mol Med (Berl)*. 2007 Dec;85(12):1413–20.
 133. Sam S, Legro RS, Bentley-Lewis R, Dunaif A. Dyslipidemia and metabolic syndrome in the sisters of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Aug;90(8):4797–802.
 134. Sam S, Legro RS, Essah PA, Apridonidze T, Dunaif A. Evidence for metabolic and reproductive phenotypes in mothers of women with polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 May;103(18):7030–5.
 135. Day F, Karaderi T, Jones MR, Meun C, He C, Drong A, et al. Large-scale genome-wide meta-analysis of polycystic ovary syndrome suggests shared genetic architecture for different diagnosis criteria. *PLoS Genet*. 2018 Dec;14(12):e1007813.
 136. Obermayer-Pietsch B, Trummer C, Schwetz V, Schweighofer N, Pieber T. Genetics of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Curr Opin Clin*

- Nutr Metab Care. 2015 Jul;18(4):401–6.
137. Nybacka Å, Carlström K, Ståhle A, Nyrén S, Hellström PM, Hirschberg AL. Randomized comparison of the influence of dietary management and/or physical exercise on ovarian function and metabolic parameters in overweight women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2011 Dec;96(6):1508–13.
 138. Pasquali R, Gambineri A. Role of changes in dietary habits in polycystic ovary syndrome. *Reprod Biomed Online*. 2004 Apr;8(4):431–9.
 139. Moran LJ, Ko H, Misso M, Marsh K, Noakes M, Talbot M, et al. Dietary composition in the treatment of polycystic ovary syndrome: a systematic review to inform evidence-based guidelines. *Hum Reprod Update*. 2013;19(5):432.
 140. McMillan-Price J, Petocz P, Atkinson F, O’neill K, Samman S, Steinbeck K, et al. Comparison of 4 diets of varying glycemic load on weight loss and cardiovascular risk reduction in overweight and obese young adults: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med*. 2006 Jul;166(14):1466–75.
 141. Marsh KA, Steinbeck KS, Atkinson FS, Petocz P, Brand-Miller JC. Effect of a low glycemic index compared with a conventional healthy diet on polycystic ovary syndrome. *Am J Clin Nutr*. 2010 Jul;92(1):83–92.
 142. Kub & Hopfinger GmbH. Glykämischer Index [Internet]. 2006 [cited 2020 May 29]. Available from: <https://diabetes-austria.com>
 143. Ayyad C, Andersen T. Long-term efficacy of dietary treatment of obesity: a systematic review of studies published between 1931 and 1999. *Obes Rev an Off J Int Assoc Study Obes*. 2000 Oct;1(2):113–9.
 144. Legro RS, Dodson WC, Gnatuk CL, Estes SJ, Kunselman AR, Meadows JW, et al. Effects of gastric bypass surgery on female reproductive function. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Dec;97(12):4540–8.
 145. Conway G, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Franks S, Gambineri A, et al. The polycystic ovary syndrome: a position statement from the European Society of Endocrinology. *Eur J Endocrinol*. 2014 Oct;171(4):P1-29.
 146. Balen AH, Morley LC, Misso M, Franks S, Legro RS, Wijeyaratne CN, et al. The management of anovulatory infertility in women with polycystic ovary syndrome: an analysis of the evidence to support the development of global

- WHO guidance. *Hum Reprod Update*. 2016 Nov;22(6):687–708.
147. Picot J, Jones J, Colquitt JL, Gospodarevskaya E, Loveman E, Baxter L, et al. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of bariatric (weight loss) surgery for obesity: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 2009 Sep;13(41):1–190, 215–357, iii–iv.
 148. Colquitt JL, Pickett K, Loveman E, Frampton GK. Surgery for weight loss in adults. *Cochrane database Syst Rev*. 2014 Aug;(8):CD003641.
 149. Lesko J, Peaceman A. Pregnancy outcomes in women after bariatric surgery compared with obese and morbidly obese controls. *Obstet Gynecol*. 2012 Mar;119(3):547–54.
 150. Naderpoor N, Shorakae S, de Courten B, Misso ML, Moran LJ, Teede HJ. Metformin and lifestyle modification in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2016 Apr;22(3):408–9.
 151. Diamanti-Kandarakis E, Christakou CD, Kandarakis E, Economou FN. Metformin: an old medication of new fashion: evolving new molecular mechanisms and clinical implications in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2010 Feb;162(2):193–212.
 152. Morgante G, Massaro MG, Di Sabatino A, Cappelli V, De Leo V. Therapeutic approach for metabolic disorders and infertility in women with PCOS. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 2018 Jan;34(1):4–9.
 153. Pasquali R, Gambineri A. Glucose intolerance states in women with the polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest*. 2013 Sep;36(8):648–53.
 154. Tang T, Lord JM, Norman RJ, Yasmin E, Balen AH. Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility. *Cochrane database Syst Rev*. 2010 Jan;(1):CD003053.
 155. Wild RA, Carmina E, Diamanti-Kandarakis E, Dokras A, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. Assessment of cardiovascular risk and prevention of cardiovascular disease in women with the polycystic ovary syndrome: a consensus statement by the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome (AE-PCOS) Society. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 May;95(5):2038–49.
 156. Diamanti-Kandarakis E, Alexandraki K, Protogerou A, Piperi C, Papamichael C, Aessopos A, et al. Metformin administration improves endothelial function

- in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2005 May;152(5):749–56.
157. Teede HJ, Misso ML, Costello MF, Dokras A, Laven J, Moran L, et al. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2018 Sep;33(9):1602–18.
 158. Balen AH, Rutherford AJ. Managing anovulatory infertility and polycystic ovary syndrome. *BMJ*. 2007 Sep;335(7621):663–6.
 159. Homburg R. Clomiphene citrate--end of an era? A mini-review. *Hum Reprod*. 2005 Aug;20(8):2043–51.
 160. Kousta E, White DM, Franks S. Modern use of clomiphene citrate in induction of ovulation. *Hum Reprod Update*. 1997;3(4):359–65.
 161. Imani B, Eijkemans MJ, te Velde ER, Habbema JD, Fauser BC. Predictors of patients remaining anovulatory during clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligomenorrheic infertility. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Jul;83(7):2361–5.
 162. Dickey RP, Olar TT, Taylor SN, Curole DN, Matulich EM. Relationship of endometrial thickness and pattern to fecundity in ovulation induction cycles: effect of clomiphene citrate alone and with human menopausal gonadotropin. *Fertil Steril*. 1993 Apr;59(4):756–60.
 163. Holzer H, Casper R, Tulandi T. A new era in ovulation induction. *Fertil Steril*. 2006 Feb;85(2):277–84.
 164. Legro RS, Brzyski RG, Diamond MP, Coutifaris C, Schlaff WD, Casson P, et al. Letrozole versus clomiphene for infertility in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. 2014 Jul;371(2):119–29.
 165. Fauser BCJM, Tarlatzis BC, Rebar RW, Legro RS, Balen AH, Lobo R, et al. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertil Steril*. 2012 Jan;97(1):28-38.e25.
 166. Legro RS, Arslanian SA, Ehrmann DA, Hoeger KM, Murad MH, Pasquali R, et al. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Dec;98(12):4565–92.
 167. Alpañés M, Álvarez-Blasco F, Fernández-Durán E, Luque-Ramírez M,

- Escobar-Morreale HF. Combined oral contraceptives plus spironolactone compared with metformin in women with polycystic ovary syndrome: a one-year randomized clinical trial. *Eur J Endocrinol*. 2017 Nov;177(5):399–408.
168. Yildiz BO. Approach to the patient: contraception in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Mar;100(3):794–802.
169. AMBOSS GmbH. Hormonelle Kontrazeption - Wissen für Mediziner [Internet]. Hormonelle Kontrazeption. 2020 [cited 2020 Oct 4]. Available from: https://www.amboss.com/de/wissen/Hormonelle_Kontrazeption
170. Sitruk-Ware R, Nath A. Characteristics and metabolic effects of estrogen and progestins contained in oral contraceptive pills. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2013 Feb;27(1):13–24.
171. Skowrońska P, Pastuszek E, Kuczyński W, Jaszczół M, Kuć P, Jakiel G, et al. The role of vitamin D in reproductive dysfunction in women – a systematic review. *Ann Agric Environ Med* [Internet]. 2016;23(4):671–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.5604/12321966.1226865>
172. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*. 2012 Mar;148(6):1258–70.
173. Gessner A. Das Mikrobiom [Internet]. Das Mikrobiom Entscheidender Faktor für die Personalisierte Medizin der Zukunft. 2016 [cited 2020 Jul 15]. Available from: <https://www.roche.de/res/literatur/984/Das-Mikrobiom-Entscheidender-Faktor-fuer-die-Personalisierte-Medizin-der-Zukunft-original-752ed7452522c1027df3de3c2d2e5299.pdf>
174. Turnbaugh PJ, Quince C, Faith JJ, McHardy AC, Yatsunenko T, Niazzi F, et al. Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr;107(16):7503–8.
175. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009 Jan;457(7228):480–4.
176. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* [Internet]. 2006;444(7122):1027–31. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature05414>

177. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006 Jun;312(5778):1355–9.
178. Chow J, Lee SM, Shen Y, Khosravi A, Mazmanian SK. Host-bacterial symbiosis in health and disease. *Adv Immunol*. 2010;107:243–74.
179. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar;108 Suppl(Suppl 1):4578–85.
180. Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum Dev*. 2010 Jul;86 Suppl 1:13–5.
181. Vaishampayan PA, Kuehl J V, Froula JL, Morgan JL, Ochman H, Francino MP. Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant. *Genome Biol Evol*. 2010 Jan;2:53–66.
182. Knights D. (2) Microbiome Discovery 3: 16S Variable Regions - YouTube [Internet]. Microbiome Discovery 3: 16S Variable Regions. 2016 [cited 2020 Jul 15]. Available from: https://www.youtube.com/watch?v=8Aa_mnyXm70
183. Knights D. (2) Microbiome Discovery 7: Alpha Diversity - YouTube [Internet]. Microbiome Discovery 7: Alpha Diversity. 2016 [cited 2020 Jul 15]. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=9ZvoR89HYP8>
184. Lindheim L, Bashir M, Munzker J, Trummer C, Zachhuber V, Leber B, et al. Alterations in Gut Microbiome Composition and Barrier Function Are Associated with Reproductive and Metabolic Defects in Women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): A Pilot Study. *PLoS One*. 2017;12(1):e0168390.
185. Knights D. (26) Microbiome Discovery 8: Beta Diversity - YouTube [Internet]. Microbiome Discovery 8: Beta Diversity. 2016 [cited 2020 Jul 31]. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=lcbp6EecDg4>
186. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*. 2011 Jun;12(6):R60.
187. Starmer J. StatQuest: Linear Discriminant Analysis (LDA) clearly explained. - YouTube [Internet]. Linear Discriminant Analysis (LDA). 2016 [cited 2020 Oct 3]. Available from:

https://www.youtube.com/watch?v=azXCzI57Yfc&ab_channel=StatQuestwithJoshStarmer

188. Torres PJ, Siakowska M, Banaszewska B, Pawelczyk L, Duleba AJ, Kelley ST, et al. Gut Microbial Diversity in Women With Polycystic Ovary Syndrome Correlates With Hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018 Apr;103(4):1502–11.
189. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature.* 2013 Aug;500(7464):541–6.
190. Zhang D, Zhang L, Yue F, Zheng Y, Russell R. Serum zonulin is elevated in women with polycystic ovary syndrome and correlates with insulin resistance and severity of anovulation. *Eur J Endocrinol.* 2015 Jan;172(1):29–36.
191. Ridlon JM, Ikegawa S, Alves JMP, Zhou B, Kobayashi A, Iida T, et al. *Clostridium scindens*: a human gut microbe with a high potential to convert glucocorticoids into androgens. *J Lipid Res.* 2013 Sep;54(9):2437–49.
192. Zhang F, Ma T, Cui P, Tamadon A, He S, Huo C, et al. Diversity of the Gut Microbiota in Dihydrotestosterone-Induced PCOS Rats and the Pharmacologic Effects of Diane-35, Probiotics, and Berberine. *Front Microbiol [Internet].* 2019;10:175. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00175>
193. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol [Internet].* 2014;11(8):506–14. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
194. Williams NT. Probiotics. *Am J Heal Pharm [Internet].* 2010 Mar 15;67(6):449–58. Available from: <https://doi.org/10.2146/ajhp090168>
195. Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr.* 2001 Feb;73(2 Suppl):386S–392S.
196. Kolida S, Gibson GR. Synbiotics in health and disease. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2011;2:373–93.
197. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr.* 2010 Aug;104

Suppl:S1-63.

198. Tremellen K, Pearce K. Dysbiosis of Gut Microbiota (DOGMA)--a novel theory for the development of Polycystic Ovarian Syndrome. *Med Hypotheses*. 2012 Jul;79(1):104–12.
199. Pandey KR, Naik SR, Vakil B V. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *J Food Sci Technol* [Internet]. 2015/07/22. 2015 Dec;52(12):7577–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26604335>
200. Didari T, Solki S, Mozaffari S, Nikfar S, Abdollahi M. A systematic review of the safety of probiotics. *Expert Opin Drug Saf*. 2014 Feb;13(2):227–39.
201. Doron S, Snyderman DR. Risk and safety of probiotics. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2015 May 15;60 Suppl 2(Suppl 2):S129–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25922398>
202. Islam SU. Clinical Uses of Probiotics. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2016 Feb;95(5):e2658–e2658. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26844491>
203. Yadav H, Lee J-H, Lloyd J, Walter P, Rane SG. Beneficial metabolic effects of a probiotic via butyrate-induced GLP-1 hormone secretion. *J Biol Chem*. 2013 Aug;288(35):25088–97.
204. Aronsson L, Huang Y, Parini P, Korach-André M, Håkansson J, Gustafsson J-Å, et al. Decreased fat storage by *Lactobacillus paracasei* is associated with increased levels of angiopoietin-like 4 protein (ANGPTL4). *PLoS One*. 2010 Sep;5(9).
205. Zafar U, Hassan J, Ismail K, Agha S, Memon Z, Bhatti S. Effectiveness of Probiotics, Metformin and Their Combination Therapy in Ameliorating Dyslipidemia Associated With PCOS. *J Pharm Res Int*. 2019 Oct 22;1–9.
206. Ahmadi S, Jamilian M, Karamali M, Tajabadi-Ebrahimi M, Jafari P, Taghizadeh M, et al. Probiotic supplementation and the effects on weight loss, glycaemia and lipid profiles in women with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Hum Fertil (Camb)*. 2017 Dec;20(4):254–61.
207. Sun J, Buys N. Effects of probiotics consumption on lowering lipids and CVD risk factors: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Med*. 2015;47(6):430–40.
208. Luoto R, Laitinen K, Nermes M, Isolauri E. Impact of maternal probiotic-

- supplemented dietary counselling on pregnancy outcome and prenatal and postnatal growth: a double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr*. 2010 Jun;103(12):1792–9.
209. Guo Y, Qi Y, Yang X, Zhao L, Wen S, Liu Y, et al. Association between Polycystic Ovary Syndrome and Gut Microbiota. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153196.
 210. Haudum C, Lindheim L, Ascani A, Trummer C, Horvath A, Münzker J, et al. Impact of Short-Term Isoflavone Intervention in Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Patients on Microbiota Composition and Metagenomics. *Nutrients*. 2020 Jun;12(6).
 211. Karamali M, Eghbalpour S, Rajabi S, Jamilian M, Bahmani F, TajabadiEbrahimi M, et al. Effects of Probiotic Supplementation on Hormonal Profiles, Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress in Women With Polycystic Ovary Syndrome: A Randomized, DoubleBlind, Placebo-Controlled Trial. *Arch Iran Med [Internet]*. 2018 Jan 1;21(1):1–7. Available from: <http://www.aimjournal.ir/Article/aim-1912>
 212. Samimi M, Dadkhah A, Haddad Kashani H, Tajabadi-Ebrahimi M, Seyed Hosseini E, Asemi Z. The Effects of Synbiotic Supplementation on Metabolic Status in Women With Polycystic Ovary Syndrome: a Randomized Double-Blind Clinical Trial. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2019 Dec;11(4):1355–61.
 213. Karimi E, Moini A, Yaseri M, Shirzad N, Sepidarkish M, Hossein-Boroujerdi M, et al. Effects of synbiotic supplementation on metabolic parameters and apelin in women with polycystic ovary syndrome: a randomised double-blind placebo-controlled trial. *Br J Nutr [Internet]*. 2018;119(4):398—406. Available from: <https://doi.org/10.1017/S0007114517003920>
 214. Shoaee T, Heidari-Beni M, Tehrani HG, Feizi A, Esmailzadeh A, Askari G. Effects of Probiotic Supplementation on Pancreatic β -cell Function and C-reactive Protein in Women with Polycystic Ovary Syndrome: A Randomized Double-blind Placebo-controlled Clinical Trial. *Int J Prev Med*. 2015;6:27.
 215. Kadooka Y, Sato M, Ogawa A, Miyoshi M, Uenishi H, Ogawa H, et al. Effect of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in fermented milk on abdominal adiposity in adults in a randomised controlled trial. *Br J Nutr*. 2013 Nov;110(9):1696–703.
 216. Sanchez M, Darimont C, Drapeau V, Emady-Azar S, Lepage M, Rezzonico E, et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC1.3724 supplementation

- on weight loss and maintenance in obese men and women. *Br J Nutr.* 2014 Apr;111(8):1507–19.
217. Andreasen AS, Larsen N, Pedersen-Skovsgaard T, Berg RMG, Møller K, Svendsen KD, et al. Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *Br J Nutr.* 2010 Dec;104(12):1831–8.
218. Asemi Z, Zare Z, Shakeri H, Sabihi S-S, Esmailzadeh A. Effect of multispecies probiotic supplements on metabolic profiles, hs-CRP, and oxidative stress in patients with type 2 diabetes. *Ann Nutr Metab.* 2013;63(1–2):1–9.
219. Kobylak N, Falalyeyeva T, Mykhalchyshyn G, Kyriienko D, Komissarenko I. Effect of alive probiotic on insulin resistance in type 2 diabetes patients: Randomized clinical trial. *Diabetes Metab Syndr.* 2018 Sep;12(5):617–24.
220. Nasri K, Jamilian M, Rahmani E, Bahmani F, Tajabadi-Ebrahimi M, Asemi Z. The effects of synbiotic supplementation on hormonal status, biomarkers of inflammation and oxidative stress in subjects with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *BMC Endocr Disord.* 2018 Apr;18(1):21.