

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

Die Entwicklung des Zytokinexpressionsmusters im ersten Lebensjahr von Bauern- und  
Nicht-Bauernkindern: Rolle der Einflussfaktoren Gesundheit, Ernährung und  
Lebensumstände. Eine Untersuchung im Rahmen der PASTURE-Studie.



Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christine Adderson-Kisser

aus Eckernförde

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Erika von Mutius

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Harald Barwitz  
Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas Ruzicka

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: PD Dr. med. Susanne Krauss-Etschmann

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2011

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das Immunsystem .....	1
1.1.1 Das angeborene und das erworbene Immunsystem .....	1
1.1.2 Die Zytokine .....	3
1.1.3 Besonderheiten des kindlichen Immunsystems .....	5
1.2 Perinatale Modulatoren des Immunsystems .....	5
1.2.1 Die Hygienehypothese .....	5
1.2.2 Die Bauernstudien .....	6
1.2.2.1 Endotoxinbelastung .....	6
1.2.2.2 Haus- und Stalltierkontakt .....	7
1.2.3 Probiotika .....	7
<b>2 Zielsetzung</b>	<b>10</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>12</b>
3.1 Studiendesign und Aufgabenverteilung .....	12
3.2 Pilotstudien und Bestimmung der Studiengröße .....	14
3.3 Studienpopulation .....	15
3.4 Materialgewinnung .....	16
3.4.1 Blutentnahme, Transport und Lagerung .....	16
3.4.2 Fragebögen .....	17
3.5 Methoden .....	18
3.5.1 Zytokinbestimmung .....	18
3.5.2 Blutbild .....	19
3.5.3 ELISA .....	19
3.6 Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	20
3.6.1 Verbrauchsmaterialien .....	20
3.6.2 Reagenzien .....	20
3.6.3 Geräte .....	21
3.6.4 Software .....	22
3.7 Statistische Auswertung .....	22
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>24</b>
4.1 Zusammensetzung der Studienpopulation und Materialgewinnung .....	24

4.2 Allgemeine Charakteristika der Studienpopulation.....	25
4.3 Analyse der Zytokinwerte der Subpopulation .....	36
4.3.1 Deskription der Zytokinwerte aus dem Nabelschnurblut und dem peripher-venösen Blut der Kinder nach einem Jahr .....	36
4.3.2 Responderraten in n/N im Nabelschnurblut und im venösen Blut nach einem Jahr .....	43
4.3.3 Entwicklung des Geburts-Responderstatus im ersten Lebensjahr.....	44
4.3.4 Untersuchung möglicher Einflussfaktoren auf die Entwicklung des Responderstatus der Non-Responder bei Geburt.....	45
4.3.5 Binäre logistische Regressionsanalyse: Abhängigkeit des Responder-Entwicklungsstatus von verschiedenen Einflussfaktoren.....	60
<b>5 Diskussion</b>	<b>62</b>
5.1 Studie .....	62
5.2 Methoden .....	63
5.3 Ergebnisse.....	66
5.3.1 Zytokindaten bei Geburt und nach einem Jahr in Bezug zum Bauern- status .....	66
5.3.1.1 TNF- $\alpha$ .....	68
5.3.1.2 IL-10 .....	69
5.3.1.3 IL-12 .....	70
5.3.1.4 IL-5 und IFN- $\gamma$ .....	70
5.3.1.5 Einfluss des Bauernstatus .....	72
5.3.2 Entwicklung vom Non-Responder- zum Responderstatus im ersten Lebensjahr.....	74
5.3.3 Einflussfaktoren der Responderentwicklung im ersten Lebensjahr.....	75
5.3.3.1 Schulbildung der Eltern .....	76
5.3.3.2 Ernährung von Mutter und Kind.....	77
5.3.3.3 Genetische Prädisposition und allergische und infektiöse Erkrankungen von Mutter und Kind.....	81
5.3.3.3.1 Allergische Vorerkrankungen in der Familie.....	81
5.3.3.3.2 Erkrankungen der Mutter in der Schwangerschaft.....	83
5.3.3.3.3 Erkrankungen des Kindes im ersten Lebensjahr.....	84
5.3.3.4 Haustiere .....	87

5.3.3.5 Geschwister .....	89
5.3.3.6 Art der Heizung .....	91
5.3.3.7 Einflussfaktoren der ländlichen Umgebung .....	92
5.3.3.7.1 Stallaufenthalt .....	92
5.3.3.7.2 Mikrobielle Stoffe in ländlicher Umgebung .....	93
5.3.3.7.3 Mikrobielle Stoffe im Haus und durch mütterliche Farmtätigkeiten .....	96
5.3.3.7.4 Verkehrsabgase .....	98
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>100</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>104</b>
7.1 Literaturverzeichnis .....	104
7.2 Abkürzungsverzeichnis .....	122
7.3 Tabellenverzeichnis .....	125
7.4 Abbildungsverzeichnis .....	127
7.5 Ergänzende Ergebnisstabellen .....	128
7.5.1 Boxplots mit Ausreißern .....	128
7.5.2 Responderraten in n/N im Nabelschnurblut und im venösen Blut nach einem Jahr nach Bauernstatus getrennt .....	129
7.5.3 Untersuchung möglicher Einflussfaktoren auf die Entwicklung des Responderstatus der Non-Responder bei Geburt - tendentiell signifikante Ergebnisse bis $p < 0,01$ .....	131
7.6 Erklärung über eigenständige Abfassung der Arbeit .....	145

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

### 1.1.1 Das angeborene und das erworbene Immunsystem

Das Immunsystem wird in das angeborene (unspezifische) und das erworbene (spezifische) Immunsystem eingeteilt, die eng zusammenarbeiten und sich gegenseitig beeinflussen [1].

Das angeborene Immunsystem arbeitet antigen-unspezifisch, d.h. es erkennt häufig vorkommende Merkmale von Pathogenen und unterscheidet so Fremd von Eigen. Zellen des angeborenen Immunsystems sind Phagozyten wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten, inflammatorische Zellen wie basophile Granulozyten und Mastzellen, ferner dendritische Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen).

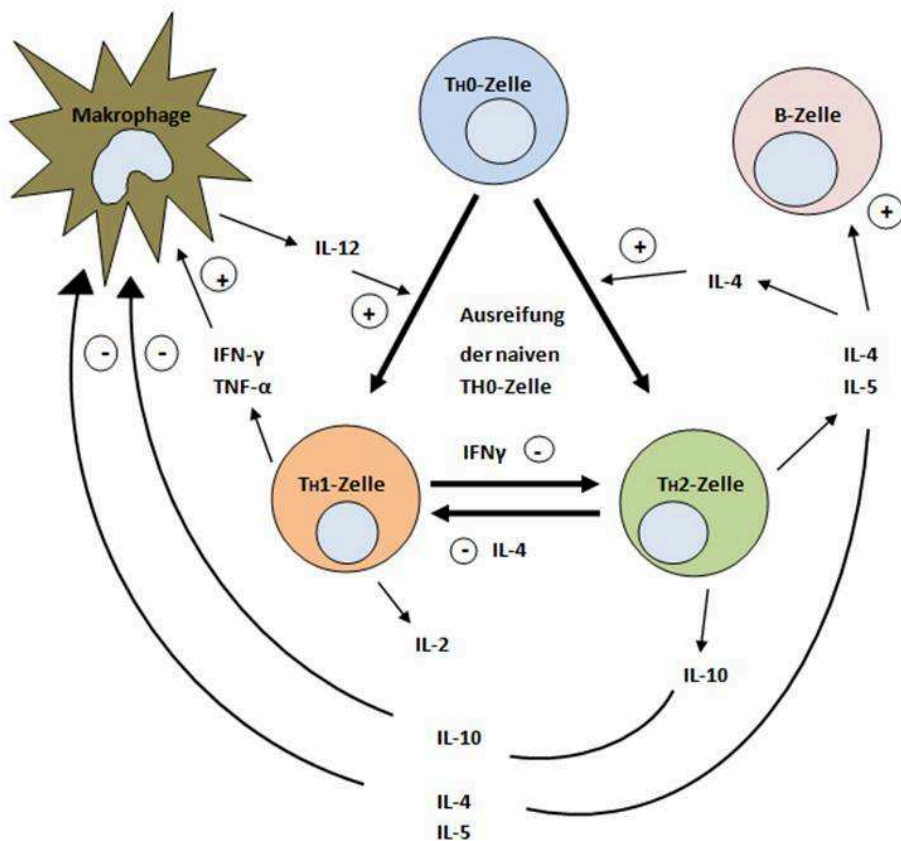
Zum erworbenen Immunsystem, das antigen-spezifisch ist und sich im Laufe des Lebens entwickelt, gehören die T-Lymphozyten (zelluläre Abwehr) und die B-Lymphozyten (humorale Abwehr). Die T-Lymphozyten wiederum werden in T-Helferzellen (Th1/Th2-Zellen), zytotoxische T-Zellen (TC1/TC2-Zellen) und regulatorische T-Zellen (Treg) eingeteilt [2].

Für die erworbene Immunabwehr spielt die Präsentation von Pathogenen durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) im Zusammenspiel mit Molekülen des MHC (Major Histocompatibility Complex) eine wichtige Rolle. Zu den APC gehören unter anderem Dendritische Zellen (DC), deren unreife Formen über die Blutbahn in periphere Gewebe wandern. Auf der Oberfläche der DC finden sich Pattern Recognition Receptors (PRR) wie Toll-like-Rezeptoren, Lecithin und intrazelluläre „nucleotide-oligomerization domains“ (NOD). Diese erkennen Moleküle verschiedener Pathogene, die „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMP) und führen zu einer Aktivierung der Dendritischen Zellen. Daraufhin reduzieren die DCs ihre endozytotische Aktivität und steigern die Expression von MHC, Adhäsions- und Co-stimulierenden Molekülen (wie CD 80+, CD 86+) auf ihrer Oberfläche und wandern in die T-Zell-Zonen der sekundären lymphatischen Organe. Dort präsentieren sie die Antigen-Peptide mit Hilfe der MHC-Moleküle den T-Zell-Rezeptoren (TZR) naiver T-Zellen (CD45RA+) [2].

Abhängig von Art und Menge des präsentierten Antigens, der co-stimulierenden Faktoren und des umgebenden Zytokinmilieus differenzieren sich die naiven Th0-Zellen zu Th1- bzw. Th2-Zellen [3]. CD4+ T-Helferzellen (TH1) entwickeln sich bevorzugt bei einem IL-

IL-12-dominierten Zytokinmilieu und aktivieren durch Ausschüttung von IFN- $\gamma$ , aber auch IL-2, IL-12 und TNF- $\beta$ , Makrophagen und zytotoxische T-Zellen [4, 5]. Sie sind für die Abwehr von intrazellulären Pathogenen (Bakterien, Viren und Pilzen) verantwortlich [2, 3, 6-9].

Die Entwicklung zu CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen (Th2) wird dagegen durch IL-4 eingeleitet. Th2-Zellen produzieren hauptsächlich IL-4, IL-5 und IL-13 [5] und aktivieren dadurch B-Zellen (unter anderem verantwortlich für den Isotypwechsel von IgM zu IgE) [10, 11], Mastzellen und eosinophile Granulozyten, die sich gegen extrazelluläre Pathogene (Würmer) richten [2, 3, 6, 7]. Th1- und Th2-Zellen regulieren sich gegenseitig und befinden sich dadurch normalerweise in einem Gleichgewicht. So unterdrückt IFN- $\gamma$  (produziert von Th1-Zellen) die Ausbildung von Th2-Zellen und IL-4 (produziert von Th2-Zellen) die Entwicklung von Th1-Zellen [3]. Ein Ungleichgewicht zugunsten der Th1-Zellen kann zur Ausbildung von Autoimmunkrankheiten und chronischen Entzündungen führen, eine überschießende Th2-Zellaktivierung zur Entstehung von Erkrankungen des atopischen Formenkreises [12-15].



**Abb.1:** Einfluss der verschiedenen Zytokine auf die Ausreifung der naiven Th0-Zelle, auf die Beziehungen der Th1- und Th2-Zellen untereinander und zu anderen Zellen des Immunsystems.

Die dritte Gruppe der T-Zellen, die Treg-Zellen (natürliche regulatorische T-Zellen, induzierte Tr1- und Th3-Zellen), macht etwa 1% der T-Zellen aus. Diese produzieren inhibitorische Zytokine wie TGF- $\beta$  und IL-10, außerdem den Transkriptionsfaktor FOX P3 [16]. Treg-Zellen regulieren die Balance zwischen Th1- und Th2-Antwort [17], induzieren eine Immuntoleranz gegenüber Eigen- und Fremd-Antigenen [18], inhibieren die Bildung von spezifischem IgE und fördern die Bildung von IgG4 und IgA [19]. Störungen der regulierenden Treg-Aktivität führen zu einem Th1-/Th2-Ungleichgewicht [17, 20].

### 1.1.2 Die Zytokine

Zytokine stellen eine heterogene Gruppe von Polypeptiden und Glycoproteinen (~25 kDa) dar, die von verschiedenen Zellen des Körpers gebildet werden können. Die Wirkung der Zytokine zeigt sich autokrin (auf die produzierende Zelle selbst), parakrin (auf Nachbarzellen) oder auch endokrin (auf entfernter gelegene Zellen). Durch Bindung an spezifische Zell-Rezeptoren wird über die darauffolgende veränderte Genexpression in der Zelle eine Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der Zelle, ebenso Chemotaxis und Apoptose bewirkt [2].

Die verschiedenen Zytokine sind je nach Struktur in Gruppen zusammengefasst, zu deren bedeutendsten die Hämatopoetin-Familie, die TNF-Familie und die Chemokin-Familie gehören. Daneben gibt es noch andere Zytokine, die keiner bestimmten Gruppe zugeordnet werden können [2] [siehe Tab. 1].

**Tabelle 1:** Übersicht über einige wichtige Zytokine

Zytokin	Größe	Produzierende Zellen	Rezeptoren	Wirkungen
<b>IL-2 (H)</b>	133 AS, Monomer	T-Zellen	CD25 ( $\alpha$ ), CD122 ( $\beta$ ), CD132 ( $\gamma$ )	Proliferation der T-Zellen
<i>IL-4 (H)</i>	129 AS, Monomer	T-Zellen, Mastzellen	CD124, CD132 ( $\gamma$ )	B-Zell-Aktivierung, IgE-Wechsel, hemmt Th1-Zellen
<i>IL-5 (H)</i>	115 AS, Homodimer	T-Zellen, Mastzellen	CD125 ( $\beta$ )	Wachstum und Differenzierung der eosinophilen Zellen



<b>Zytokin</b>	<b>Größe</b>	<b>Produzierende Zellen</b>	<b>Rezeptoren</b>	<b>Wirkungen</b>
<i>IL-10 (S)</i>	160 AS, Homodimer	T-Zellen, Makrophagen, EBV- transformierte B-Zellen	IL-10R $\alpha$ , CFR2-4, IL10-R $\beta$	Wirksamer Inhibitor von Makrophagenfunktionen Immunmodulation
<b>IL-12 (S)</b>	197 und 306 AS, Heterodimer	B-Zellen, Makrophagen	IL-12R $\beta$ 1, IL-12R $\beta$ 2	Aktiviert NK-Zellen, induziert die Differenzierung von CD4-T-Zellen zu Th1- ähnlichen Zellen
<i>IL-13 (H)</i>	132 AS, Monomer	T-Zellen	IL-13R, CD132 ( $\gamma$ ), evtl. CD24	Wachstum und Differenzierung der B- Zellen, hemmt Th1-Zellen und die Produktion inflammatorischer Zytokine durch Makrophagen
<b>IFN-<math>\gamma</math> (I)</b>	143 AS, Homodimer	T-Zellen, NK-Zellen	CD119, IFNGR2	Aktivierung der Makrophagen, erhöhte Expression von MHC- Molekülen und Komponenten des Antigenprozessierungs- systems, Ig-Klassenwechsel, hemmt Th2-Zellen
<b>TNF-<math>\alpha</math> (T)</b>	157 AS, Trimere	Makrophagen, NK-Zellen, T-Zellen	P55, p75, CD120a, CD120b	Lokale Entzündungen, Endothelaktivierung

**Tabelle 1:** Übersicht über einige wichtige Zytokine.

H:Hämatopoetin-Familie, I: Interferon-Familie, T: TNF-Familie, S: Sonstige ohne bestimmte Zugehörigkeit; **fett:** Zytokine, die hauptsächlich eine Th1-Antwort begünstigen; *kursiv:* Zytokine, die hauptsächlich eine Th2-Antwort hervorrufen [nach Janeway, S.725 ff.]

### **1.1.3 Besonderheiten des kindlichen Immunsystems**

Schon pränatal, etwa in der 22. Schwangerschaftswoche, lässt sich Zytokinproduktion beim Ungeborenen nachweisen, die zur Ausreifung des kindlichen Immunsystems beiträgt [21].

Die in der Fetalperiode und unmittelbar nach Geburt untersuchten Zellen im kindlichen Blut zeigen eine deutliche Th2-Gewichtung. Es wird vermutet, dass diese durch den Einfluss mütterlicher Hormone entsteht, die durch die Unterdrückung einer Th1-Antwort einen Schutz vor dem plazentatoxischen IFN- $\gamma$  bieten und eine Abstoßung des semiallogenen fetalen Gewebes verhindern sollen [22-26].

Das kindliche Immunsystem bei Geburt ist zwar durchaus schon funktionsfähig, allerdings zeigt es im Vergleich zum Immunsystem von Erwachsenen Unterschiede bezüglich Anzahl und Funktion der verschiedenen, an der Abwehr beteiligten Zelltypen wie APC, NK-Zellen, B-Zellen und T-Zellen, ebenso fallen erniedrigte Werte für bestimmte Zytokine, v.a. IL-4 und IFN- $\gamma$ , und eine verminderte AK-Produktion auf [26].

In den ersten 18 Monaten nach Geburt wird wohl durch mikrobielle Stimuli, besonders durch die Besiedelung des Darms mit Bakterien, die Ausbildung einer Th1-Antwort gefördert und so ein Gleichgewicht der Th1- und Th2-Immunantwort geschaffen [27, 28]. Bleibt dies aus, kann die Th2-Persistenz zur Ausbildung von Atopien prädisponieren [29, 30]. Die Sensibilisierung gegenüber Allergenen erfolgt hierbei der sogenannten „Allergiekarriere“ („allergic march“). Die recht durchlässige Darmmukosa der Kinder in den ersten Lebensmonaten begünstigt die Sensibilisierung für Nahrungsmittelallergene mit Ausbildung einer atopischen Dermatitis. Später steigt die Empfindlichkeit gegenüber inhalativen Allergenen mit der Ausbildung eines Asthma [31-35]. So haben Kinder, die schon früh Allergien zeigen, wohl später ein erhöhtes Risiko, an Asthma zu erkranken, v.a. wenn zusätzlich noch keuchendes Atmen, z.B. bei Atemwegsinfektionen, auftritt [27, 32, 35].

## **1.2 Perinatale Modulatoren des Immunsystems**

### **1.2.1 Die Hygienehypothese**

Im Laufe der letzten Jahrzehnte konnte eine deutliche Verbesserung der hygienischen Lebensbedingungen in den westlichen Ländern erreicht werden, gleichzeitig beobachtete man allerdings auch ein gehäuftes Auftreten atopischer Erkrankungen und

Autoimmunerkrankungen [36]. Den Zusammenhang dieser Beobachtungen beschrieb erstmals David Strachan im Jahr 1989 [37]. Er zeigte, dass Kinder, die mit älteren Geschwistern aufwuchsen und daher mehreren Infektionen in frühester Kindheit ausgesetzt waren, seltener an Asthma und anderen allergischen Erkrankungen litten. Seine Überlegungen wurden unter dem Begriff der „Hygienehypothese“ zusammengefasst.

Diese Hypothese wurde auch durch zahlreiche andere Beobachtungen gestützt: Die Zunahme an allergischen Erkrankungen, aber auch an Autoimmunerkrankungen, korreliert direkt mit der Zunahme der hygienischen Bedingungen, und zwar sowohl auf nationaler Ebene (verbesserte Trinkwasser- und Nahrungsmittelqualität, Antibiotikagebrauch, Impfungen, etc.) als auch auf individueller Ebene (sozio-ökonomischer Status [38], Anzahl der älteren Geschwister [39-41], etc.) . Dies wurde ebenfalls am Nord-Süd-Gradienten des Auftretens von Autoimmunerkrankungen in Europa deutlich, der ebenfalls mit dem sozioökonomischen Status zusammenhängt [42], wie auch in einer großangelegten Studie (ISAAC), die Kinder aus West- und Ostdeutschland 5 Jahre nach der Wende beobachtete. Direkt nach der Wende fand sich im Osten des Landes eine deutlich niedrigere Prävalenz an atopischen Erkrankungen [43-45], während 5 Jahre später schon eine deutliche Zunahme beobachtet werden konnte [46].

Gestützt wurde die Hygienehypothese auch durch Beobachtungen bei der Einführung von Präventionsmaßnahmen gegen Infektionserkrankungen in ärmeren Ländern. So stieg die Atopierate sowohl in Südafrika - möglicherweise als Folge einer weitläufigen Impfung gegen *Streptokokkus pneumoniae* [47] - als auch in Venezuela und Gabon nach Einführung einer systematischen antihelminthischen Therapie von befallenen Kindern [48, 49], deutlich an.

## **1.2.2 Bauernstudien**

### **1.2.2.1 Endotoxinbelastung**

Die Inhalation von Extrakten aus Stallstaub zeigte im Mausmodell einen möglichen allergieprotektiven Effekt und eine Verringerung der IgG1- und IgE-Produktion, wobei das Staubextrakt neben den Lipopolysacchariden noch weitere biologisch aktive Substanzen enthielt [50].

Eine wichtige Erkenntnis lieferte eine Untersuchung an Schulkindern, deren Mütter in der Schwangerschaft regelmäßigen Stallkontakt hatten. Es zeigten sich hier stärkere protektive Effekte bzgl. der atopischen Sensibilisierung, aber auch eine erhöhte Expression von Rezeptorgenen des angeborenen Immunsystems wie TLR2, TLR4 und CD14 dieser Kinder, als bei allein gegenwärtiger Exposition [51].

Allerdings zeigte die ALEX-Studie wiederum einen vom Stallaufenthalt unabhängigen Endotoxin-Effekt [52], was zu der Annahme führte, dass es wohl noch andere mikrobielle Einflussfaktoren im Stallmilieu geben muss. In der PARSIFAL-Studie konnte zudem nachgewiesen werden, dass auch Kinder aus anthroposophischen Familien protektiven Faktoren ausgesetzt waren, allerdings mit geringerem Effekt als bei den Bauernkindern [53].

### **1.2.2.2 Haus- und Stalltierkontakt**

Auch Haustiere wurden in einigen Studien als protektive Faktoren für die Entstehung allergischer Erkrankungen angenommen [54-61], in anderen dagegen als Risikofaktoren gesehen [62-64]. Da der Haustier-Effekt vornehmlich bei Bauernkindern beobachtet wurde, musste die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass der protektive Effekt eventuell vom gleichzeitig bestehenden Stalltierkontakt herrührte. Die in Bauernfamilien meist größere Anzahl an Haustieren und das gemeinsame Vorkommen von Katzen und Hunden könnten ebenfalls ausschlaggebend gewesen sein [56, 65].

### **1.2.3 Probiotika**

Erste Untersuchungen der Darmflora atopischer Kinder haben gezeigt, dass diese im Vergleich zu gesunden Kindern oftmals eine geringere Kolonisation mit Bakteroides und Bifidobakterien, dafür aber eine vermehrte Zahl an Clostridien aufweist [66-69]. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass die mikrobielle Besiedelung des Magen-Darm-Traktes womöglich eine entscheidende Rolle bei der Ausreifung des kindlichen Immunsystems spielt.

Zum Zeitpunkt der Geburt ist der Magen-Darm-Trakt von Kindern steril. In den ersten Lebensmonaten und -jahren erfolgt die Kolonisation mit Mikroorganismen bis hin zur Ausbildung einer stabilen Darmflora [70, 71]. Diese Entwicklung wird von verschiedenen

Faktoren beeinflusst, so nimmt man an, dass der Geburtsmodus und die individuelle Darmflora der Mutter hierbei eine Rolle spielen, ebenso wie die Ernährung des Kindes und die damit verbundene Aufnahme verschiedener Mikroorganismen [72, 73].

Oben genannte Beobachtungen bzgl. der mikrobiellen Darmbesiedelung und des Auftretens allergischer Erkrankungen – im jungen Lebensalter vornehmlich atopische Dermatitis und Nahrungsmittelallergien - führten zu der Annahme, dass die intestinale Flora ein sehr potenter Stimulator für den Reifungsprozess von Vorläuferzellen des Immunsystems zu sein scheint. Diese Zellen zirkulieren durch den Darm, bevor sie auch in andere Gewebe auswandern. So kann die Art der mikrobiellen Besiedelung Einfluss auf das gesamte Immunsystem des Körpers nehmen, was Effekte auf die IgA-Produktion im Respirationstrakt und damit auf ein später mögliches Auftreten von allergischem Asthma erklären könnte [74, 75].

Im Hinblick auf den Einfluss mikrobieller Substanzen auf die Ausbildung des kindlichen Immunsystems wurden in den letzten Jahren vermehrt Studien durchgeführt, die den Effekt einer Probiotika-Supplementation auf die Entwicklung atopischer Erkrankungen untersuchen sollten.

Probiotika sind Kulturen, die lebensfähige Mikroorganismen in einer Menge enthalten, die groß genug ist, um die Wirtsmikroflora zu beeinflussen und dabei gute Effekte auf die Gesundheit des Wirtes haben [76, 77].

So verbessern Probiotika die Darmschleimhautbarrierefunktion, die bei Kindern mit Nahrungsmittelallergien und atopischem Ekzem vermehrt durchlässig ist, und fördern die darmspezifische IgA-Antwort [70, 78, 79]. Sie können Nahrungs-Antigene enzymatisch modifizieren und degradieren und fördern die Umwandlung der Th2-gewichteten Immunität in eine Th1-gewichtete, vornehmlich durch eine vermehrte Bildung von Treg-Zellen, die IL-10 bilden und so die Ausbildung anderer T-Zellen regulieren können. [70, 76, 80, 81]. Dadurch können inflammatorische Reaktionen, sowie die Ausbildung allergischer Erkrankungen durch eine persistierende Th2-Gewichtung wohl vermieden werden.

Die Studienlage bezüglich des Einflusses der Probiotikasupplementation zur Primärprophylaxe allergischer Erkrankungen ist allerdings uneinheitlich.

Kalliomäki et al. konnten in ihrer Studie von 2001 eine 50%ige Reduktion des Auftretens von atopischem Ekzem bei Kindern, die Lactobacillus rhamnosus GG bis zum 6. LM einnahmen, zeigen. Ähnliche Studien in Australien [74] und Deutschland [82] konnten diesen positiven Effekt nicht bestätigen. Abrahamsson et al. konnten lediglich einen positiven Effekt von Lactobacillus reuteri auf die Entstehung des IgE-assoziierten Ekzems feststellen [68]. Zudem fiel in den oben genannten Studien teilweise ein erhöhtes Auftreten von Bronchitiden mit keuchendem Atemgeräusch [82], allergischem Schnupfen und allerg. Asthma [77, 82-84] und eine höhere IgE-Sensibilisierung [74] auf. Die teils widersprüchlichen Ergebnisse können in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund der untersuchten Kinder (TLR-Polymorphismus) [76, 85], und ihrer allergischen Prädisposition gesehen werden, ebenso kommen unterschiedliche Umwelteinflüsse wie die individuelle mikrobielle Belastung, Ernährungsgewohnheiten, aber auch Antibiotikagebrauch, in Betracht. Unterschiede im Studiendesign bzgl. der verwendeten Probiotika und Art und Zeitraum der Applikation könnten ebenso zu den teils widersprüchlichen Ergebnissen beigetragen haben. Die verschiedenen Probiotika scheinen zudem unterschiedliche Wirkweisen und Einflüsse zu haben, auch ein dosisabhängiger Effekt und die Art der Supplementation müssen als mögliche Faktoren der unterschiedlichen Wirkungen diskutiert werden [68, 80, 86, 87]. Die oben genannten Punkte führen dazu, dass die Probiotikasupplementation nach der derzeitigen Studienlage nicht als Primärprophylaxe empfohlen werden kann und weitere Studien in diesem Bereich notwendig sein werden.

## 2. Zielsetzung

In zahlreichen Studien wurde bisher das Zytokinprofil bei Geburt und zu bestimmten Zeitpunkten im ersten Lebensjahr untersucht, wobei jedoch die Entwicklung des bei Geburt gemessenen Zytokin-Responderstatus einzelner Individuen im Verlauf der ersten 12 Lebensmonate nicht genauer betrachtet wurde. Gegenstand dieser Arbeit ist es nun - neben der Darstellung des unterschiedlichen Zytokin-Sekretionsprofil zum Zeitpunkt der Geburt und nach 12 Monaten - auch den dynamischen Verlauf dieser Zytokinentwicklung darzustellen und mit möglichen Einflussfaktoren aus den Bereichen Schwangerschaftsexposition der Mutter, Umwelt, Ernährung und Gesundheitszustand von Mutter und Kind in Zusammenhang zu bringen.

Folgende Hypothese sollte getestet werden:

Die Immunantwort nach mikrobieller Stimulation von Nabelschnurblut und von peripherem Blut nach dem ersten Lebensjahr unterscheidet sich.

Nebenhypothese:

Einfluss auf die Immunantwort haben Umweltfaktoren sowie Lebens- und Ernährungsgewohnheiten von Mutter und Kind in der Perinatalzeit und im ersten Jahr nach Geburt.

Dabei ergaben sich im Einzelnen nachfolgende Fragen:

1. Inwiefern unterscheiden sich die Zytokinexpressionsmuster der Kinder nach Stimulation mit LPS, SEB und PI bei Geburt und nach einem Jahr?
  - a) Gibt es Unterschiede zwischen Bauern- und Nichtbauernkindern?
  - b) Treten Unterschiede bezüglich der verwendeten Stimulantien auf?
2. Wieviele Kinder zeigen bei Geburt einen positiven Responderstatus auf mindestens eines der verwendeten Stimulantien, wieviele nach einem Jahr?
3. Wie entwickeln sich die Non-Responder bei Geburt im ersten Lebensjahr?
4. Gibt es Umweltfaktoren oder bestimmte Lebens- und Ernährungsgewohnheiten bei Mutter und Kind, die die unter 3. genannte Entwicklung beeinflussen? Welche

Rolle spielen der Bauernstatus und die damit verbundenen unterschiedlichen Einflußfaktoren im ersten Lebensjahr im Vergleich zum Aufwachsen außerhalb eines Hofes?



### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Studiendesign und Aufgabenverteilung**

Die Daten dieser Arbeit wurden im Rahmen der PASTURE-Studie (Protection against Allergy: A Study in Rural Environments) erhoben, einer prospektiven longitudinalen Studie. Insgesamt waren fünf Länder beteiligt, neben Deutschland (Oberbayern) waren dies Österreich (Salzburger Raum), Frankreich (Besançon), Finnland (Kuopio) und die Schweiz (östlicher Teil). In Deutschland lief die Studie unter dem Namen LUKAS (Ländliche Umgebung und Kinder: Allergiestudie), es wurden hierfür die Regionen Peißenberg, Penzberg, Bad Tölz und Wolfratshausen ausgewählt.

Ziel der Studie war es, die Rolle der mikrobiellen Exposition von Bauernkindern im Vergleich zu nicht auf einem Bauernhof, aber in der gleichen Region lebenden Kindern, hinsichtlich ihrer Entwicklung allergischer Erkrankungen zu untersuchen. Desweiteren sollten die Faktoren näher betrachtet werden, die hierbei den protektiven „Bauernhofeffekt“ ausmachen, ebenso wie weitere immunologische und genetische Mechanismen, die hierbei eine Rolle spielen könnten.

In jedem der teilnehmenden Zentren wurden zwischen August 2002 und März 2005 schwangere Bäuerinnen und Nicht-Bäuerinnen im dritten Trimenon durch Hebammen bei der Vorstellung im Krankenhaus oder bei Schwangerschaftskursen rekrutiert. Die Studie wurde zudem bei den Versammlungen der Ortsbäuerinnen vorgestellt. Anhand von Fragebögen wurden demographische Daten der Mütter erhoben. Bei Geburt des Kindes wurde durch die Hebammen Nabelschnurblut und Blut der Mütter entnommen, Blutproben der Väter folgten im Laufe der ersten zwei Monate post partum. Die Proben wurden durch Feldarbeiter an das von Hauner'sche Kinderspital gesandt. Dort wurde in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Susanne Krauss-Etschmann das Nabelschnurblut zur späteren Zytokinbestimmung mit verschiedenen Substanzen stimuliert, ein differenziertes Blutbild zur Bestimmung der Leukozytenzahl angefertigt und mütterliches Serum zur IgE-Bestimmung gewonnen.

Die Extraktion von DNA aus mütterlichem, väterlichem und kindlichem Blut zur Detektion von Gen-Polymorphismen, die der Erkennung mikrobieller Stoffe dienen, und Messungen zur Expression dieser Gene wurde durch die Arbeitsgruppe von PD Dr. Michael Kabesch durchgeführt.

Nach dem 2. Lebensmonat der Kinder fand ein Hausbesuch statt, bei dem ein weiterer Fragebogen bezüglich Geburt und Entwicklung des Kindes mit den Müttern erhoben

wurde, desweiteren wurden Staub- und Milchproben (Muttermilch und Kuhmilch), ebenso Stuhlproben der Kinder eingesammelt.

Bis zum Ende des 1. Lebensjahres der Kinder führten die Mütter ein Tagebuch zu Gesundheit, Entwicklung und Tätigkeiten der Kinder. Nach 1 Jahr erfolgten eine weitere Befragung der Mütter zu den Kindern und eine Blutabnahme bei den Kindern zur erneuten Durchführung eines Stimulationsansatzes für die Zytokinbestimmung und Bestimmung der Leukozytenzahl aus dem peripheren Blut der Kinder.

Den zeitlichen Zusammenhang von Rekrutierung, Ausfüllen der Fragebögen und Blutentnahmen zeigt Abbildung 2.

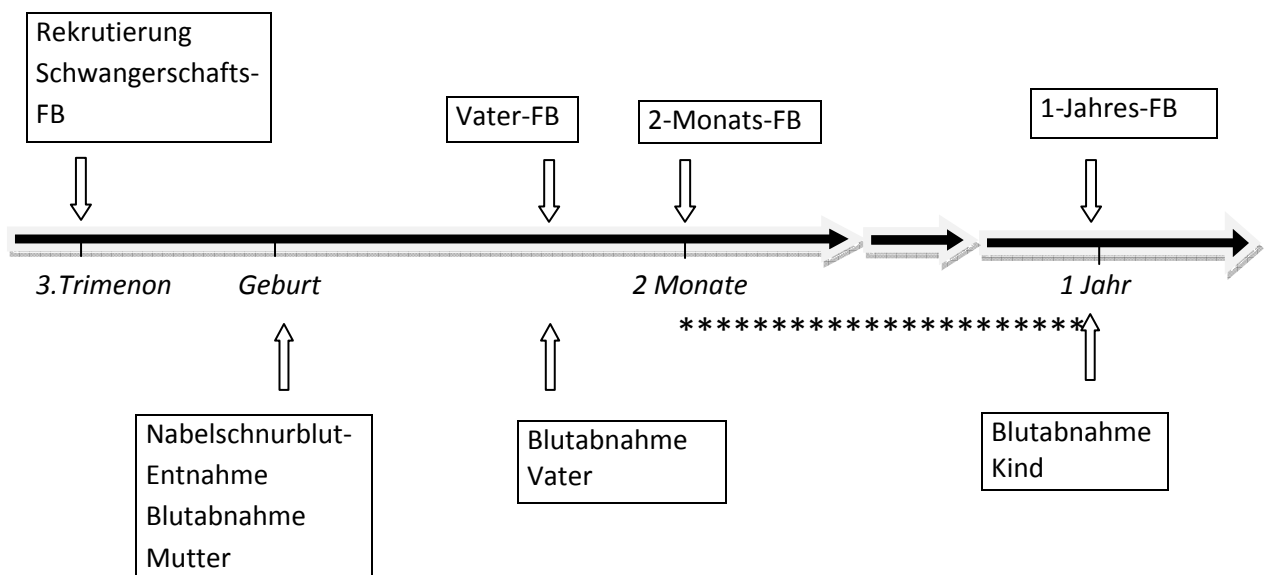


Abbildung 2: Studiendesign

\*: Tagebuch über Erkrankungen und Aktivitäten des Kindes; FB: Fragebogen

Die Staub-, Stuhl- und Milchproben wurden bis zur weiteren Verarbeitung in anderen Zentren zwischengelagert. Die gewonnenen Überstände der Stimulationsansätze und die Seren zur IgE-Bestimmung wurden an das Klinikum der Philipps-Universität in Marburg versandt, wo die weiteren Auswertungen unter Leitung von Prof. Dr. Harald Renz und PD Dr. Udo Herz vorgenommen wurden. Die Eingabe der Daten wurde zentral im Institut für Epidemiologie der Universität Ulm unter Leitung von Prof. Dr. Stephan Weiland durchgeführt.

Die Finanzierung der PASTURE-Studie erfolgte durch die Europäische Union, Studienkoordinatorin war Prof. Dr. E. von Mutius des Dr. von Hauner'schen Kinderspitals

in München. Des Weiteren waren beteiligt: Prof. Dr. Charlotte Braun-Fahrländer (Institut für Sozial- und Präventivmedizin, Basel), Prof. Dr. Joseph Riedler (Kinderspital der LKA, Salzburg), Prof. Juha Pekkanen M.D., Ph.D. (Unit of Environmental Epidemiology, national Public Health Institut, Kuopio), ebenso PD Dr. Roger Lauener (Zürich), PD Dr. Udo Herz (Marburg), Jeroen Douwes Ph.D. (Utrecht) und PD Dr. Michael Kabesch (München).

Aus allen fünf Ländern lagen die Einverständniserklärungen der Ethikkomitees von Studien an Menschen vor.

### **3.2 Pilotstudien und Bestimmung der Studiengröße**

Um im deutschen Studienarm der LUKAS-Studie die am besten geeigneten Gebiete zu finden, wurde zunächst eine Pilotstudie durchgeführt. Dazu wurden etwa 55 Geburtskliniken in Südbayern kontaktiert, um Angaben über die jeweilige Anzahl an Geburten und im Besonderen über den Anteil der Bäuerinnen unter den Schwangeren zu bekommen. Zudem wurden Daten des Bayerischen Statistikamtes eingesehen, um die Gebiete mit der höchsten Dichte an Bauern zu bestimmen. Mithilfe dieser Daten wurden 6 Regionen (Ebersberg, Agatharied, Miesbach, Hausham, Peißenberg und Füssen) für die Pilotstudie ausgewählt. Über einen Zeitraum von sechs Wochen wurden die Hebammen in den entsprechenden Gegenden gebeten, Daten über jede stattgehabte Entbindung zu sammeln. Am Ende dieser Testphase stellte sich heraus, dass sowohl in Ebersberg, als auch in Füssen der Anteil der Bäuerinnen unter den Gebärenden zu gering, und in Hausham die Kooperation mit den Hebammen nicht ausreichend war. Daraufhin wurde die Pilotstudie um fünf Gebiete erweitert: Schongau und Weilheim, in denen die Studie ebenfalls über sechs Wochen durchgeführt wurde, und Penzberg, Bad Tölz und Wolfratshausen mit einer Studiendauer von vier Wochen. In Schongau war der Anteil der Bäuerinnen unter den Gebärenden zu gering und in Weilheim die Kooperation mit den Hebammen nicht zufriedenstellend.

Letztendlich wurden daher Peißenberg, Penzberg, Bad Tölz und Wolfratshausen als geeignete Gebiete für die PASTURE-Studie ausgewählt.

Um die Anzahl der Studienteilnehmer zu bestimmen wurden Powerkalkulationen ( $\beta=80\%$ ,  $\alpha=0,05$ ) durchgeführt, die ergaben, dass in jedem Studienarm etwa 340 Teilnehmer rekrutiert werden müssen, um im Alter von 1 Jahr einen Unterschied in der atopischen Sensibilisierung von 12% vs. 6% zu entdecken. Das Vorkommen von atopischer

Sensibilisierung im Alter von 1 Jahr wurde in einer großen europäischen Multizentrischen Geburtenstudie bei der Nicht-Risiko-Gruppe mit 12% geschätzt. Dieser Schätzwert konnte auch in früheren Beobachtungen von Bauernpopulationen beobachtet werden. Ebenso wurden 340 Studienteilnehmer pro Arm als notwendig angesehen, um einen Anstieg des INF- $\gamma$  um 20% im Überstand stimulierter Nabelschnurblutzellen zu entdecken. Weitere Hinweise aus früheren Studien wurden berücksichtigt, so zum Beispiel, dass nur etwa 60% der als geeignet ausgewählten Studienteilnehmer auch ihre Zustimmung zur Studie geben würden (geschätzt nach Erfahrungen der AMICS Kohorte), und dass etwa noch 80% der Studienteilnehmer zum Klinikbesuch nach einem Jahr erscheinen würden. Unter Berücksichtigung dieser Schätzungen wurde schließlich festgelegt, dass etwa 400 Studienteilnehmer pro Studienarm eingeschlossen werden sollten.

### **3.3 Studienpopulation**

Bei der Rekrutierung wurde zwischen „Bauern“ und „Nicht-Bauern“ unterschieden. Als „Bauern“ galten diejenigen Frauen, die auf einem Bauernhof mit Viehhaltung lebten, ohne Unterscheidung zwischen Voll- oder Teilzeitbeschäftigung. Als „Nicht-Bauern“ wurden die Frauen bezeichnet, die in der gleichen Gegend, aber nicht auf einem Bauernhof, lebten und im gleichen Krankenhaus betreut wurden, wobei Frauen aus Städten mit mehr als 30.000 Einwohnern oder aus Industriestandorten ausgeschlossen wurden. Um eine annähernd gleich große Menge an Nicht-Bauern und Bauern zu erhalten, wurden zunächst alle geeigneten Schwangeren rekrutiert und anschließend eine randomisierte Stichprobe der Nicht-Bauern gebildet, entsprechend der Anzahl der im selben Zeitraum rekrutierten Bäuerinnen.

Als allgemeine Ausschlußkriterien für die Teilnahme an der Studie galten Zwillingschwangerschaften, ein Alter der Frau unter 18 Jahren, bereits in dieselbe Studie eingeschlossene Geschwister, geplanter Umzug vor Studienende, Familien ohne Telefon oder mit mangelnden deutschen Sprachkenntnissen und Familien, bei denen ein Elternteil täglich in die Stadt pendelte. Ausschlußkriterien nach der Geburt waren Frühgeburten vor der 37. Schwangerschaftswoche und schwerwiegende genetische Erkrankungen des Kindes.

Alle Schwangeren wurden ausführlich über Zweck und Durchführung der Studie informiert und gebeten, einen demographischen Fragebogen auszufüllen. Nach Prüfung der

Ein- und Ausschlusskriterien wurde von allen Frauen, die sich für die Teilnahme an der Studie eigneten, eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt.

### 3.4 Materialgewinnung

#### 3.4.1 Blutentnahme, Transport und Lagerung

Nach Einwilligung der Mutter zur Studienteilnahme wurde von der Hebamme bei der Geburt etwa 24 ml Nabelschnurblut nach einem festgelegten Schema entnommen, wobei die Abnahme des Lithium-Heparin-Bluts die höchste Priorität besaß. Das genaue Schema zeigt Tabelle 2.

<b>Röhrchen</b>	<b>Menge</b>	<b>Bestimmung</b>
Lithium-Heparin	2,5 ml	Stimulationsansatz und Zytokinbestimmung
EDTA	2,5 ml	Differential-Blutbild und DNA-Analysen
Serum	4,0 ml	IgE-Bestimmung
PAXgene	2,5 ml	Genexpressionsuntersuchungen
EDTA	10 ml	Isolierung von PBMCs (periphere mononukleäre Zellen)
PAXgene	2,5 ml	Genexpressionsuntersuchungen

Tabelle 2: Schema für die Blutabnahme aus Nabelschnur bei Geburt

Das entnommene Blut wurde bei 4°C gelagert und innerhalb der nächsten Stunden in das von-Hauner'sche Kinderspital in München gebracht.

Dort wurden das Lithium-Heparin-Blut für den Stimulationsansatz, die Serumröhrchen und das EDTA-Blut zur Bestimmung des Differentialblutbildes innerhalb von 24 Stunden weiterverarbeitet. Das abzentrifugierte Serum wurde bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert, überschüssiges Lithium-Heparin-Blut wurde im Verhältnis 1:4 mit Trizol gemischt und ebenfalls bei -20°C eingefroren. Die PAXgene-Röhrchen wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C zwischengelagert.

Von den Eltern der Kinder wurden jeweils etwa 15 ml Blut entnommen, davon 2,5 ml EDTA-Blut für die DNA-Analyse, 2,5 ml in ein PAXgene-Röhrchen zur Genexpressionsbestimmung und Serum zur IgE-Bestimmung.

### 3.4.2 Fragebögen

Im Rahmen der PASTURE-Studie wurden vier Fragebögen ausgefüllt. Der erste wurde vor der Geburt im persönlichen Gespräch mit einem Feldarbeiter bei der Mutter zu Hause erhoben. Hier wurden allgemeine Daten der Mutter festgehalten (Gewicht, Alter, Schulbildung etc.) und Fragen zum Allergiestatus der Mutter, ihrer Eltern und leiblichen Kinder (Asthma, Heuschnupfen, Husten, Ekzeme, etc.), zu Schwangerschaft, Rauchverhalten und Ernährung der Mutter gestellt. Außerdem wurden bei der Gruppe der „Bauern“ Charakteristika des Hofes (Hofgröße, Art der Tierhaltung, Art der Tierfütterung, etc.) und Tätigkeiten der Mutter auf dem Hof abgefragt.

Entsprechende Angaben zur Vorgeschichte allergischer Erkrankungen beim Vater und dessen Eltern, zu Tätigkeiten des Vaters auf der Farm und dessen Rauchverhalten wurden in einem von diesem selbst ausgefüllten Fragebogen gemacht. Dieser wurde ihm knapp zwei Monate nach der Geburt des Kindes zugesandt.

Der zweite Fragebogen zwei Monate nach der Geburt des Kindes wurde wieder im persönlichen Gespräch mit einem Feldarbeiter bei der Familie zu Hause ausgefüllt. Hier wurden Fragen zum Verlauf der Schwangerschaft, der Geburt, der ersten Lebenswoche des Kindes und zum Stillen gestellt. Ebenso wurden Angaben zum häuslichen Umfeld (Haustiere, Heizung, Rauchen der Eltern, etc.) und bei der Gruppe der „Bauern“ zu den Hofcharakteristika und der Exposition des Kindes auf dem Hof (zu Tieren, Tierfutter, Heu, etc.) gemacht. Außerdem wurden Daten zu Mutter und Kind aus dem Mutterpass entnommen (Vorkommnisse in der Schwangerschaft, Kopfumfang, Länge und Gewicht des Kindes bei Geburt, U2 und U3, etc.).

Ein Jahr nach der Geburt des Kindes fand im Rahmen eines Krankenhausbesuchs von Mutter und Kind eine weitere persönliche Befragung mittels eines 1-Jahres-Fragebogens statt, der Erkrankungen und Lebensumstände des Kindes erfragte (Aufenthalt in Stall oder Scheune, Kontakt zu Farmtieren, Genuss frischer Milch vom Hof, etc.). Auch Veränderungen im Haushalt seit dem letzten Besuch und bei der Gruppe der „Bauern“ in der Hofführung und Viehhaltung wurden festgehalten.

Zwischen dem zweiten Besuch bei der Familie zwei Monate nach der Geburt und ihrem Krankenhausbesuch nach einem Jahr, führte die Mutter ein Tagebuch über Gesundheit und Ernährung ihres Kindes, über Aufenthalte auf dem Bauernhof, Kontakt zu Tieren und regelmäßigen Kontakt des Kindes zu fremden Kindern.

Ausschnitte aus den jeweiligen Fragebögen finden sich im Anhang.

Grundlage der Fragebögen bildeten Fragen, die schon in der Studie “International Study of Allergy and Asthma in Childhood” (ISAAC), der “Allergy and Endotoxin Study” (ALEX) und der Studie “Prevention of Allergy- Risk factors for Sensitization in children related to farming and anthroposophic“ (PARSIFAL) Verwendung fanden [88-90]. Auch Teile des Fragebogens der American Toracic Society (ATS) wurden mit aufgenommen [91].

## **3.5 Methoden**

### **3.5.1 Zytokinbestimmung**

Zur Stimulation wurde Lithium-Heparin-Blut verwendet, das innerhalb von 24 h nach Abnahme weiterverarbeitet wurde. Zunächst wurden 2,5 ml Blut mit 7,5 ml Medium 1:4 verdünnt. Für den Stimulationsansatz wurden die Spalten 2 bis 5 einer 24-well-Platte benutzt. Um annähernd gleiche Bedingungen für alle wells zu schaffen, wurden in die wells der Spalten 1 und 6 jeweils 1000 µl PBS pipettiert.

In die wells der Spalten 2 bis 5 wurden nacheinander zuerst je 500 µl Medium, dann das jeweilige Stimulans (außer Spalte 2) und zuletzt 500 µl des mit Medium verdünnten Blutes pipettiert (s. Tabelle 3)

Falls sich im Lithium-Heparin-Röhrchen mehr als 2,5 ml Blut befand, wurde das Restblut in 3vol. Trizol aufgenommen und bei -20°C eingefroren.

Wenn weniger als 2,5 ml Lithium-Heparin-Blut vorlag, wurde das Blut zunächst im Verhältnis 1:4 mit Medium gemischt und dann in einer zuvor festgelegten Reihenfolge in die einzelnen wells pipettiert. Dabei wurde mit den Reihen 2 und 3 begonnen, da die wells dort alle von mit PBS oder Medium gefüllten wells umgeben waren, und hier somit die besten Bedingungen vorlagen. Innerhalb der Reihen wurde zuerst das well mit dem Medium (Spalte 2), dann das mit LPS (Spalte 3), SEB (Spalte 5) und zuletzt das well mit PI (Spalte 4) befüllt. Erst wenn alle wells der Reihen 2 und 3 gefüllt waren, wurde das Restblut in gleicher Reihenfolge in die wells der Reihen 1 und 4 pipettiert.

Anschließend wurde die Platte bei 37°C und 5% CO<sup>2</sup>-befeuchteter Raumluft inkubiert.

Nach 24h wurden die Überstände der Reihen 1 und 2, nach 48h die der Reihen 3 und 4 in Eppendorf-Tubes abpipettiert und bei 5000 rpm 3 Minuten zentrifugiert. Die hierbei gewonnenen Überstände wurden wiederum in Eppendorf-Tubes abpipettiert, mit den entsprechenden Studienaufklebern versehen und bei -18°C bis zum Versand an das Klinikum der Philipps-Universität in Marburg gelagert.

	Spalte 1	Spalte 2	Spalte 3	Spalte 4	Spalte 5	Spalte 6
<b>Reihe 1</b>	1000 µl PBS	M/B	M/B + 10 µl LPS	M/B + 10 µl P + 5 µl I	M/B + 4 µl SEB	1000 µl PBS
<b>Reihe 2</b>	1000 µl PBS	M/B	M/B + 10 µl LPS	M/B + 10 µl P + 5 µl I	M/B + 4 µl SEB	1000 µl PBS
<b>Reihe 3</b>	1000 µl PBS	M/B	M/B + 10 µl LPS	M/B + 10 µl P + 5 µl I	M/B + 4 µl SEB	1000 µl PBS
<b>Reihe 4</b>	1000 µl PBS	M/B	M/B + 10 µl LPS	M/B + 10 µl P + 5 µl I	M/B + 4 µl SEB	1000 µl PBS

**Tabelle 3: Stimulationsschema;** PBS = Phosphatpuffer; M/B = 500 µl Medium + 500 µl verdünntes Blut; LPS = Lipopolysaccharid; P = Phorbol-12-Myristat-13-Acetat; I = Ionomycin; SEB = Staphylokokken Enterotoxin B

### 3.5.2 Blutbild

Für die spätere Zytokinbestimmung unerlässlich war die Bestimmung des Differentialblutbildes, um den prozentualen Anteil der Leukozyten/Lymphozyten zu ermitteln, die für die Zytokinproduktion verantwortlich waren und auf deren Werte die Zytokinergebnisse bezogen werden konnten. Hierfür wurde Blut aus dem EDTA-Röhrchen verwendet und innerhalb von 24 h nach Blutabnahme ein maschinelles Differentialblutbild mit dem Sysmex-T-1800i im Labor des Dr. von Hauner'schen Kinderspitals erstellt.

### 3.5.3 ELISA

Die quantitative Bestimmung der Zytokine erfolgte mittels ELISA im Labor von Prof. Renz in Marburg. Hierbei wurden Opteia ELISA kits (BD, Heidelberg) und 384 well-Platten (Nunc) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet, allerdings mit einem reduzierten Reaktionsvolumen von 50 µl und einem höher konzentrierten ersten Standard von 1000 pg/ml. Jede Probe wurde sowohl unverdünnt, als auch in einer 1:20 Verdünnung gemessen, höher konzentrierte Proben zusätzlich noch in einer 1:40 Verdünnung. Es wurden folgende Zytokine untersucht: IL-5 (charakteristisches Th2-Zytokin), IFN-γ (charakteristisches TH1-Zytokin), IL-10 (Zytokin der regulatorischen T-Zellen), TNF-α



(beteiligt an einer generellen inflammatorischen Immunität), und IL-12 (Einleitung einer Th1-Entwicklung). Die Sensitivitäten lagen bei folgenden Werten: 10 pg/ml für IFN- $\gamma$ , 7,7 pg/ml für TNF- $\alpha$ , 8 pg/ml für IL-5, 7,2 pg/ml für IL-12 und 11,4 pg/ml für IL-10. Die Mediumwerte wurden immer gleich Null gesetzt, außer sie wiesen einen anormal hohen Wert auf. In diesem Fall wurden sie aus den Messungen ausgeschlossen. Die Abweichungen innerhalb derselben Probe lagen für drei verschiedene Verdünnungen zwischen 1,2% und 5,2% (Variationskoeffizient).

### 3.6 Verbrauchsmaterialien und Geräte

#### 3.6.1 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Firma
Gewebekulturplatten, 24 well (steril)	Becton & Dickinson GmbH, Heidelberg
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Probenröhrchen Falcon (15 ml, 50 ml), Polystyren	Becton & Dickinson GmbH, Heidelberg
Pipettenspitzen (2-200 $\mu$ l, 500-1250 $\mu$ l)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einmalpipetten 10 ml	Sarsted, Nümbrecht, Deutschland
Probenröhrchen Cellstar 50 ml	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Deutschland
S-Monovette® 7,5ml K3E	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® 7,5ml LH	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
CarePlan®VpH Handschuhe	Inverness medical Unipath Diagnostics, Köln, Deutschland

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

#### 3.6.2 Reagenzien

Reagenzien	Firma
<u>Kulturmedium:</u>	
RPMI	Gibco, Invitrogen Life Technologies Karlsruhe, Deutschland
Mit 20% inaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe
Mit Antibiotika/Antimykotika (100x)	Gibco, Karlsruhe

<b>Reagenzien</b>	<b>Firma</b>
<u>Stimulantien:</u>	
PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) Stammlösung: 10 mg/ml in DMSO Endkonzentration: 5 ng/ml in Medium	Sigma, Deisenhofen
Ionomycin Stammlösung: 1 mg/ml in DMSO Endkonzentration: 1 µg/ml in Medium	Sigma, Deisenhofen
LPS (Lipopolysaccharide von E. coli) Stammlösung: 1 mg/ml in DMSO Endkonzentration: 0,1 µg/ml in Medium	Prof. Otto Holst, Forschungszentrum Borstel
SEB (Staphylokokken enterotoxin B) Stammlösung: 250 µg/ml in Medium Endkonzentration: 0,1 µg/ml in Medium	Sigma, Deisenhofen
<u>Lösungen:</u>	
PBS: 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH auf 7,3 eingestellt	Gibco, Invitrogen Life Technologies; Karlsruhe, Deutschland
Trizol© RS Reagent	Invitrogen Life Technologies Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 5: Reagenzien

### 3.6.3 Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Firma</b>
Laminarflow Laminair HBB 2472	Heraeus Instruments, Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Inkubator BB6060	Heraeus Instruments, Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
Eppendorf Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultrazentrifuge Rotanta 460R	Heraeus, Osterode

<b>Geräte</b>	<b>Firma</b>
Pipetten „Research“ (0-2 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Blood counter: XT-1800i Haematology Analyser	Sysmex America, inc. Mundelein, USA
Kühlschrank +4°C	Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Siemens, München, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	Kendro, Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
Personal Computer (PC)	Acer

Tabelle 6: Geräte

### 3.6.4 Software

<b>Software</b>	<b>Firma</b>
Windows Office 2007	Microsoft
SPSS V14.0	SPSS Inc.
EndNote	Thomson Research Soft

Tabelle 7: Software

## 3.7 Statistische Auswertung

Die Charakteristika der Studienpopulation wurden zunächst einheitlich in kategoriale Variablen umgewandelt. Für diese wurden dann jeweils die Anzahl n/N und die Prozentzahlen bzgl. der Verteilung der Charakteristika auf Bauern bzw. Nicht-Bauern berechnet und die Unterschiede mittels des Pearson Chi Quadrat-Tests ( $\chi^2$ -Test) bestimmt. Die Zytokinwerte wurden –getrennt nach Stimulans und Zeitpunkt der Messung (24h bzw. 48 h) als stetige Daten ausgewertet und der Median und die 25. und 75. Perzentilen der positiven Zytokinwerte bei Geburt im Vergleich zu den Zytokinen nach 1 Jahr angegeben. Die signifikanten bzw. tendenziell signifikanten Ergebnisse in Bezug auf die Trennung nach Bauern und Nichtbauern wurden zudem als Boxplot-Diagramme dargestellt. Die

Zytokinwerte wurden mit dem Kolmogorov-Smirnoff-Test auf Normalverteilung untersucht. Da keine Normalverteilung vorlag, wurde der nicht-parametrische Test nach Mann-Whitney-*U* für unverbundene Stichproben gewählt. In einem zweiten Schritt wurden die Zytokine in 2 Kategorien eingeteilt: Kategorie 0: Zytokin = 0 und Kategorie 1: Zytokin > 0. Es wurden deskriptiv die Anzahl der Responder zum Zeitpunkt der Geburt und nach 1 Jahr angegeben. In einem nächsten Schritt wurde die Anzahl der Responder nach 1 Jahr in Bezug auf den Responderstatus bei Geburt beschrieben, die p-Werte ergaben sich ebenfalls durch Berechnung nach dem Pearson Chi Quadrat-Test, bzw. dem Exakten Test nach Fisher bei einer erwarteten Häufigkeit < 5. Für die weiteren Berechnungen wurden die Fälle verwendet, bei denen ein Non-Responder-Status bei Geburt und eine Konversion zum Responder nach 1 Jahr vorlagen, abzüglich der Daten mit fehlenden oder zu geringen Non-Responder-Fallzahlen. Auch hier wurde zur Korrelation mit den Fragebogen-Fragen der Chi-Quadrat-Test bzw. der Exakte Test nach Fisher angewandt.

Zur weiteren Untersuchung von Zusammenhängen zwischen der Responderentwicklung im ersten Lebensjahr und möglichen Einflußfaktoren wurde die binäre logistische Regressionsanalyse angewandt. Als potentielle Confounder wurden nur diejenigen Faktoren in das Modell einbezogen, die einen signifikanten Zusammenhang von  $p < 0,013$  (Pearson Chi-Quadrat-Test) bezüglich der Responderentwicklung aufwiesen, da eine noch höhere Anzahl an zu untersuchenden Faktoren zu geringe Probandenfallzahlen ergeben hätten. Die Berechnungen erfolgten im stepwise-forward-Verfahren unter schrittweisem Einschluss der signifikanten Confounder ( $p < 0,013$ ). Es wurden die Odds ratio (OR) und das 95%-Konfidenzintervall (95%-KI) angegeben.

Allen Berechnungen lag ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,013$  in der binären logistischen Regression zugrunde.

Für die elektronische Berechnung wurde SPSS 14.0 (SPSS Inc.) verwendet. Tabellen und Diagramme wurden mithilfe von Microsoft Word 2007 erstellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zusammensetzung der Studienpopulation und Materialgewinnung

Aus dem Raum Südbayern wurden im Rahmen der PASTURE-Studie 1021 Frauen im 3. Schwangerschaftstrimenon kontaktiert (Abbildung 3).

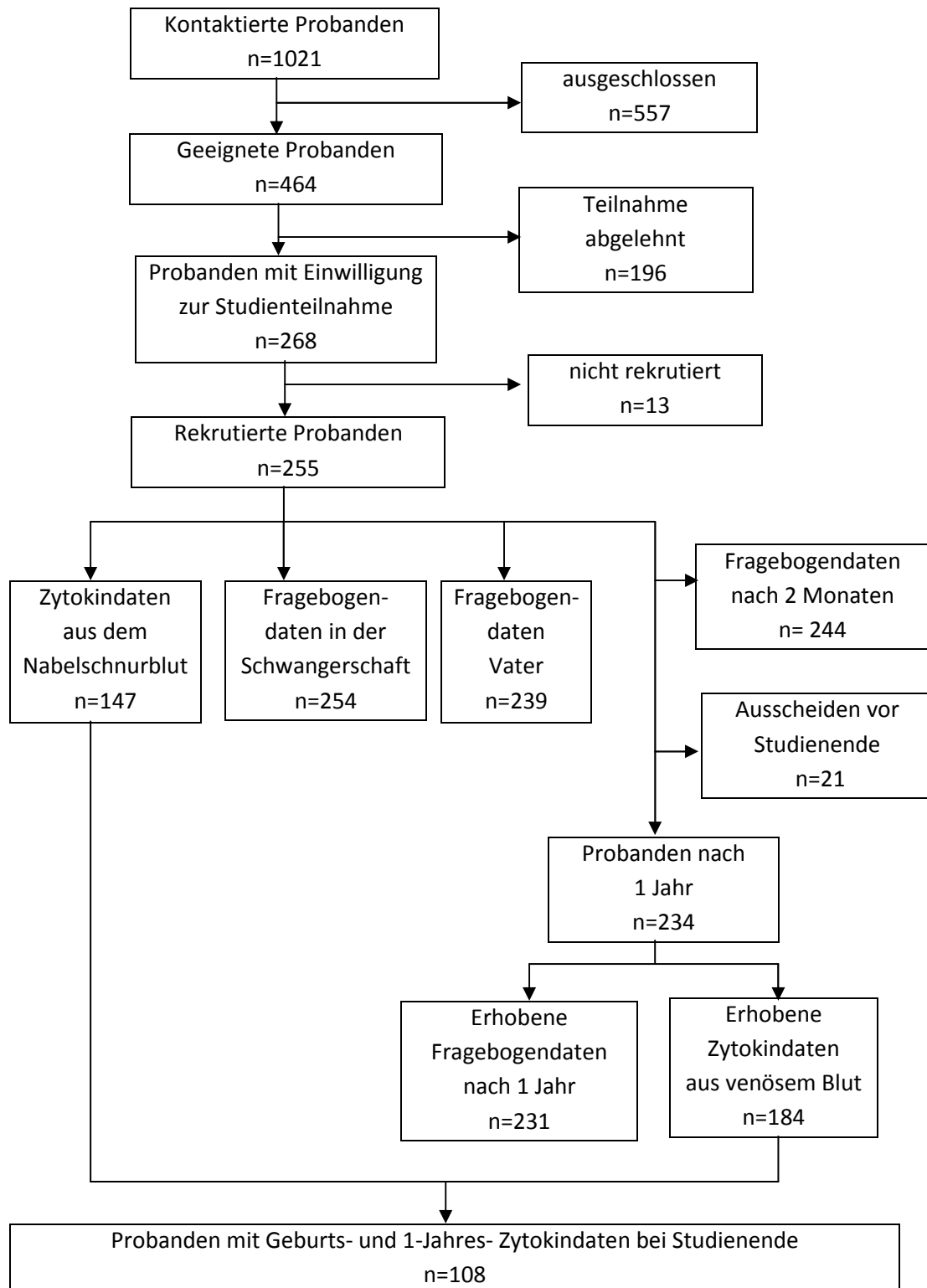


Abbildung 3: Studienpopulation

Zunächst wurden 557 Frauen ausgeschlossen, auf die die Ein- oder Ausschlusskriterien nicht zutrafen oder über die keine ausreichenden Informationen vorlagen. Von den verbleibenden 464 Probanden willigten 268 ein, an der Studie teilzunehmen. Aus dieser Gruppe wurden schließlich 255 Frauen rekrutiert. Im Rahmen eines ersten Besuches während der Schwangerschaft konnten 254 komplett ausgefüllte Fragebögen gewonnen werden. Von den Fragebögen, die die Väter etwa 2 Monate nach der Geburt des Kindes selbstständig ausfüllten, lagen insgesamt 239 komplett ausgefüllte Bögen vor. Bei der Geburt der Kinder konnte in 216 Fällen Nabelschnurblut gewonnen werden. 183 dieser Blutproben eigneten sich zur Stimulation, die restlichen 23 konnten nicht bearbeitet werden, da sie entweder nicht ausreichend Blut für den Stimulationsansatz enthielten oder bereits geronnen waren. Die Zytokinauswertung erfolgte in Marburg, wobei weitere 36 Proben aufgrund verzögerter Stimulation oder unplausibler Leukozytenwerte verworfen wurden. Schließlich lagen die Zytokinwerte aus dem Nabelschnurblut von 147 Kindern vor.

Die 255 rekrutierten Familien wurden im ersten Jahr nach der Geburt weiterbeobachtet. Nach 2 Monaten wurde von 244 Studienteilnehmern ein weiterer Fragebogen im persönlichen Gespräch mit einem Feldarbeiter ausgefüllt. Im Laufe des ersten Jahres schieden insgesamt 21 Familien vorzeitig aus der Studie aus. Gründe hierfür waren neu aufgetretene Ausschlusskriterien (n=7) oder Studienabbruch auf Wunsch der Studienbeteiligten (n=14). Somit lag nach einem Jahr eine Studienpopulation von 234 Probanden vor. Im Rahmen des Klinikbesuchs von Mutter und Kind nach einem Jahr konnten 231 komplett ausgefüllte Fragebögen und venöses Blut für einen erneuten Stimulationsansatz von 184 Kindern gewonnen werden.

Da in dieser Arbeit die Zytokinwerte aus dem Nabelschnurblut mit denen aus dem venösen Blut der Kinder nach 1 Jahr verglichen werden sollen, wurde hierfür eine Studiensubpopulation aus Familien gebildet, bei denen die Zytokinwerte zu beiden Zeitpunkten vorlagen. Dies traf auf 108 Familien zu, von denen auch jeweils komplette Schwangerschafts-, 2-Monats-, Vater- und 1-Jahres-Fragebögen vorlagen.

## **4.2 Allgemeine Charakteristika der Studienpopulation**

Die gesamte Studienpopulation setzte sich zu Beginn aus 254 Familien zusammen, von denen 112 Bauern (44,1%) und 142 Nicht-Bauern (55,9%) waren. Bei Studienende nach 1

Jahr wurden Daten von 231 Familien erhoben, 107 Bauern (46,3%) und 124 Nicht-Bauern (53,7%).

Die Subpopulation der 108 Familien mit Zytokindaten sowohl aus dem Nabelschnurblut, als auch aus dem venösen Blut der Kinder nach 1 Jahr, umfasste 50 Bauern (46,3%) und 58 Nicht-Bauern (53,7%) (Tab 8)

Es wurden nur Fragebogen- und Zytokindaten dieser Subpopulation für die folgenden Berechnungen verwendet.

	<b>Bauern in n (%)</b>	<b>Nicht-Bauern in n (%)</b>
<b>Studienpopulation bei Geburt (N=254)</b>	112 (44,1)	142 (55,9)
<b>Studienpopulation nach 1 Jahr (N=231)</b>	107 (46,3)	124 (53,7)
<b>Studiensubpopulation* (N=108)</b>	50 (46,3)	58 (53,7)

Tabelle 8: Umfang der Studienpopulationen bei Geburt und nach 1 Jahr und der Subpopulation - aufgeteilt nach Bauern und Nicht-Bauern.

\* Subpopulation mit kompletten Zytokindaten sowohl vom Zeitpunkt der Geburt als auch nach 1 Jahr.

Bei der Auswertung der Fragebogendaten konnten einige signifikante Unterschiede zwischen Bauern- und Nicht-Bauern-Familien gefunden werden (Tab. 9-13; Daten der Gesamtpopulation werden nicht gezeigt).

Tabelle 9: Anamnestische Angaben der Mütter der Studiensubpopulation (n=108; Gruppe der Bauern- und Nicht-Bauernkinder mit Zytokinwerten sowohl aus dem Nabelschnurblut als auch aus dem venösen Blut ein Jahr nach der Geburt). Aufteilung der Ergebnisse nach dem Bauernstatus.

<b>Mütter</b>	<b>Nicht-Bauern</b>		<b>Bauern</b>		<b>p-Wert</b>
	<b>n/N</b>	<b>%</b>	<b>n/N</b>	<b>%</b>	
<b>Total</b>	58	53,7	50	46,3	
<b>Alter</b>					
< 25 Jahre	1	1,7	0	0	0,647
25-35 Jahre	31	53,4	27	54	
> 35 Jahre	26	44,8	23	46	
<b>BMI</b>					
< 18	0	0	0	0	0,296
18-25	47	81	34	68	
25-30	9	15,5	13	26	
> 30	2	3,4	3	6	
<b>Höchster Schulabschluss</b>					
kein Schulabschluss	0	0	0	0	<b>0,008</b>
Hauptschule/Volksschule	11	19	18	36	
Realschule/Mittlere Reife	28	48,3	24	48	
Abitur/Fachabitur	6	10,3	7	14	
Hoch-/Fachhochschule	13	22,4	1	2	
<b>Anzahl Geschwister der Mutter</b>					
keine	7	12,1	3	6	<b>0,003</b>
1 Geschwister	22	37,9	7	14	
2 Geschwister	18	31	16	32	
3 Geschwister	10	17,2	16	32	
4 Geschwister und mehr	1	1,7	8	16	
<b>Eigene Kinder</b>					
ja	25	43,1	36	72	<b>0,003</b>
nein	33	56,9	14	28	
<b>Anzahl eigene Kinder</b>	<i>n=25</i>		<i>n=36</i>		
1	17	68	14	38,9	0,063
2	7	28	12	33,3	
3	1	4	8	22,2	
> 3	0	0	2	5,6	
<b>&gt; 5 Schachteln Zigaretten im Leben</b>					
ja	27	46,6	8	16	<b>0,001</b>
nein	31	53,4	42	84	
<b>Mutter raucht im 1. LJ des Kindes</b>					
ja	13	22,4	2	4	<b>0,006</b>
nein	45	77,6	48	96	
<b>Mutter nach Geburt auf Hof tätig</b>					
ja	5	8,6	39	78	<b>0,000</b>
nein	53	91,4	11	22	
<b>Frischmilch in SS getrunken</b>					
ja	11	19	36	72	<b>0,000</b>
nein	47	81	14	28	
<b>Frischmilch abgekocht</b>	<i>n=11</i>		<i>n=36</i>		
ja, im Sommer	0	0	1	2,8	0,285
ja, immer	0	0	6	16,7	
nein	11	100	29	80,6	
<b>Allerg. Schnupfen</b>					
ja	25	43,1	15	30	0,16
nein	33	56,9	35	70	
<b>Arztdiagnose allerg. Schnupfen</b>	<i>n=25</i>		<i>n=15</i>		
ja	24	96	11	73,3	<b>0,036</b>
nein	1	4	4	26,7	



<b>Mütter</b>	<b>Nicht-Bauern</b>		<b>Bauern</b>		<b>p-Wert</b>
	<b>n/N</b>	<b>%</b>	<b>n/N</b>	<b>%</b>	
<b>Arztdiagnose Neurodermitis Mutter</b>					
ja	10	17,2	11	22	0,533
nein	48	82,8	39	78	
<b>Neurodermitis Mutter 1 Jahr nach Geburt</b>	<i>n=10</i>		<i>n=10</i>		
ja	5	50	9	90	0,051
nein	5	50	1	10	
<b>Verzicht auf scharfe Speisen in Stillzeit</b>	<i>n=53</i>		<i>n=45</i>		
ja	23	43,4	29	64,4	<b>0,037</b>
nein	30	56,6	16	35,6	

Beschreibung der Studiensubpopulation mit kompletten Zytokindaten aus dem Nabelschnurblut bei Geburt und im venösen Blut der Kinder nach einem Jahr in Anzahl (n/N) und Prozentwerten (%). Die Berechnung des p-Wertes erfolgte mittels Chi<sup>2</sup>-Tests mit einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$ . In die Auswertung gingen Daten von 108 Müttern, Vätern und Kindern ein. Abweichende Probandenzahlen für die einzelnen Variablen wurden jeweils angegeben.

Tabelle 10: Anamnestische Angaben der Väter der Studiensubpopulation (n=108; Gruppe der Bauern- und Nicht-Bauernkinder mit Zytokinwerten sowohl aus dem Nabelschnurblut als auch aus dem venösen Blut ein Jahr nach der Geburt). Aufteilung der Ergebnisse nach dem Bauernstatus.

Väter	Nicht-Bauern		Bauern		p-Wert
	n/N	%	n/N	%	
<b>Total</b>	58	53,7	50	46,3	
<b>Alter Vater</b>					
< 35 Jahre	19	32,8	11	22	0,461
35-40 Jahre	23	39,6	23	46	
> 40 Jahre	16	27,6	16	32	
<b>BMI Vater</b>					
< 25	28	48,3	14	28	<b>0,019</b>
25-30	25	43,1	26	52	
30-35	3	5,2	10	20	
> 35	2	3,4	0	0	
<b>Höchster Schulabschluss</b>					
kein Schulabschluss	1	1,7	0	0	<b>0,016</b>
Hauptschule/Volksschule	21	36,2	34	68	
Realschule/Mittlere Reife	21	36,2	10	20	
Abitur/Fachabitur	4	6,9	3	6	
Hoch-/Fachhochschule	11	19	3	6	
<b>Anzahl Geschwister des Vaters</b>	<i>n=57</i>				
keine	8	14	1	2	<b>0,003</b>
1 Geschwister	26	45,6	13	26	
2 Geschwister	16	28,1	16	32	
3 Geschwister	5	8,8	11	22	
4 Geschwister und mehr	2	3,5	9	18	
<b>&gt; 5 Schachteln Zigaretten im Leben</b>					
ja	29	50	21	42	0,406
nein	29	50	29	58	
<b>Husten ohne Erkältung im letzten Jahr</b>					
ja	10	17,2	10	20	0,713
nein	48	82,8	40	80	
<b>Husten besser, wenn Vater nicht arbeitet</b>	<i>n=10</i>		<i>n=8</i>		
ja	0	0	3	37,5	<b>0,034</b>
nein	10	100	5	62,5	
<b>Jemals allerg. Schnupfen (Heuschnupfen)</b>					
ja	23	39,7	11	22	<b>0,049</b>
nein	35	60,3	39	78	

Beschreibung der Studiensubpopulation mit kompletten Zytokindaten aus dem Nabelschnurblut bei Geburt und im venösen Blut der Kinder nach einem Jahr in Anzahl (n/N) und Prozentwerten (%). Die Berechnung des p-Wertes erfolgte mittels Chi<sup>2</sup>-Tests mit einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$ . In die Auswertung gingen Daten von 108 Müttern, Vätern und Kindern ein. Abweichende Probandenzahlen für die einzelnen Variablen wurden jeweils angegeben.

Tabelle 11: Anamnestische Angaben der Kinder der Studiensubpopulation (n=108; Gruppe der Bauern- und Nicht-Bauernkinder mit Zytokinwerten sowohl aus dem Nabelschnurblut als auch aus dem venösen Blut ein Jahr nach der Geburt). Aufteilung der Ergebnisse nach dem Bauernstatus.

<b>Kinder</b>	<b>Nicht-Bauern</b>		<b>Bauern</b>		<b>p-Wert</b>
	<b>n/N</b>	<b>%</b>	<b>n/N</b>	<b>%</b>	
<b>Total</b>	58	53,7	50	46,3	
<b>Geschlecht</b>					
Jungen	29	50	28	56	0,533
Mädchen	29	50	22	44	
<b>Geburtsmodus</b>	<i>n=57</i>				
spontan	42	73,7	40	80	0,712
vaginal operativ	1	1,8	1	2	
Sectio	14	24,6	9	18	
<b>Geburtsgewicht aller Kinder</b>					
bis 2500 g	0	0	2	4	<b>0,033</b>
2501-3000 g	5	8,6	0	0	
3001-3500 g	31	53,4	18	36	
3501-4000 g	20	34,5	25	50	
4001-4500 g	2	6,9	4	8	
> 4501 g	0	0	1	2	
<b>Gewicht aller Kinder bei U2</b>	<i>n=57</i>		<i>n=49</i>		
bis 2500 g	0	0	2	4,1	<b>0,024</b>
2501-3000 g	15	26,3	5	10,2	
3001-3500 g	32	56,1	23	46,9	
3501-4000 g	9	15,8	15	30,6	
4001-4500 g	1	1,8	4	8,2	
> 4501 g					
<b>Gewicht Mädchen bei U2</b>	<i>n=28</i>		<i>n=21</i>		
bis 2500 g	0	0	1	4,8	<b>0,024</b>
2501-3000 g	9	32,1	1	4,8	
3001-3500 g	16	57,1	10	47,6	
3501-4000 g	3	10,7	8	38,1	
4001-4500 g	0	0	1	4,8	
> 4501 g	0	0	0	0	
<b>Gewicht aller Kinder bei U3</b>			<i>n=49</i>		
bis 3000 g	0	0	1	2	0,582
3001-3500 g	2	3,4	0	0	
3501-4000 g	11	19	8	16,3	
4001-4500 g	19	32,8	15	30,6	
4501-5000 g	17	29,3	17	34,7	
5001-5500 g	7	12,1	4	8,2	
> 5501 g	2	3,4	4	8,2	
<b>Geburtslänge alle Kinder</b>					
40-46 cm	0	0	0	0	0,123
47-50 cm	14	24,1	8	16	
51-54 cm	43	74,1	37	74	
55-60 cm	1	1,7	5	10	
<b>Anzahl Kinder in der Familie bis 12 J.</b>					
1 Kind	34	58,6	12	24	<b>0,000</b>
2 Kinder	17	29,3	16	32	
3 Kinder	7	12,1	14	28	
4 Kinder und mehr	0	0	8	16	
<b>Anzahl Kinder in der Familie 13 bis 17 J.</b>					
keine	56	96,6	47	94	0,549
1 Kind	2	3,4	2	4	
2 Kinder	0	0	1	2	
3 Kinder und mehr	0	0	0	0	

<b>Kinder</b>	<b>Nicht-Bauern</b>		<b>Bauern</b>		<b>p-Wert</b>
	<b>n/N</b>	<b>%</b>	<b>n/N</b>	<b>%</b>	
<b>Anzahl Erwachsene in der Familie ab 18 J.</b>					
1-2 Erwachsene	57	98,3	32	64	<b>0,000</b>
3-4 Erwachsene	1	1,7	12	24	
5 Erwachsene und mehr	0	0	6	12	
<b>Regelmäßiger Hofaufenthalt Kind bis 2. LM</b>					
ja	13	22,4	25	50	<b>0,003</b>
nein	45	77,6	25	50	
<b>Antibiotikaeinnahme Kind bis 2. LM</b>					
nein	57	98,3	42	84	<b>0,023</b>
ja, aber nur äußerlich	1	1,7	4	8	
ja, als Saft, Spritze oder Infusion	0	0	4	8	
<b>Antibiotikaeinnahme Kind im 1. LJ</b>					
ja	<i>n=57</i>		<i>n=49</i>		0,102
nein	7	12,3	12	24,5	
	50	87,7	37	75,5	
<b>Bewusstes Vermeiden von Nahrungsmitteln beim Kind zur Allergievermeidung</b>					
ja	35	60,3	23	46	0,136
nein	23	39,7	27	54	
<b>Vermeidung von Fisch beim Kind</b>					
ja	<i>n=35</i>		<i>n=22</i>		<b>0,012</b>
nein	26	74,3	9	9	
	9	25,7	13	13	
<b>Kuhmilchkonsum vom Hof ohne Abkochen Kind im 1. LJ</b>					
ja	2	3,4	13	26	<b>0,001</b>
nein	56	96,6	37	74	
<b>Kuhmilchkonsum vom Hof mit Abkochen Kind im 1. LJ</b>					
ja	5	8,6	27	54	<b>0,000</b>
nein	53	91,4	23	46	
<b>Pasteurisierte Frischmilch (Kuhmilch) Kind im 1. LJ</b>					
ja	12	20,7	2	4	<b>0,01</b>
nein	46	79,3	48	96	
<b>H-Milch (Kuhmilch) Kind im 1. LJ</b>					
ja	23	39,7	10	20	<b>0,027</b>
nein	35	60,3	40	80	

Beschreibung der Studiensubpopulation mit kompletten Zytokindaten aus dem Nabelschnurblut bei Geburt und im venösen Blut der Kinder nach einem Jahr in Anzahl (n/N) und Prozentwerten (%). Die Berechnung des p-Wertes erfolgte mittels Chi<sup>2</sup>-Tests mit einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$ . In die Auswertung gingen Daten von 108 Müttern, Vätern und Kindern ein. Abweichende Probandenzahlen für die einzelnen Variablen wurden jeweils angegeben.

Tabelle 12: Anamnestische Angaben zu Haushalt und Umgebung der Studiensubpopulation (n=108; Gruppe der Bauern- und Nicht-Bauernkinder mit Zytokinwerten sowohl aus dem Nabelschnurblut als auch aus dem venösen Blut ein Jahr nach der Geburt). Aufteilung der Ergebnisse nach dem Bauernstatus.

<b>Haushalt und Umgebung</b>	<b>Nicht-Bauern</b>		<b>Bauern</b>		<b>p-Wert</b>
	<b>n/N</b>	<b>%</b>	<b>n/N</b>	<b>%</b>	
<b>Total</b>	58	53,7	50	46,3	
<b>Maßnahmen zur Allergievorbeugung</b>					
ja	17	29,3	7	14	0,056
nein	41	70,7	43	86	
<b>Renovierungsarbeiten/neue Möbel</b>					
ja	35	60,3	30	60	0,971
nein	23	39,7	20	40	
<b>Neuer Bodenbelag im Kinderzimmer</b>	<i>n=35</i>		<i>n=30</i>		
ja	13	37,1	4	13,3	<b>0,029</b>
nein	22	62,9	26	86,7	
<b>Streichen/Lackieren im Kinderzimmer</b>	<i>n=35</i>		<i>n=30</i>		
ja	19	54,3	6	20	<b>0,005</b>
nein	16	45,7	24	80	
<b>Feuchtigkeitsflecken ohne Schimmel</b>					
ja	1	1,7	6	12	<b>0,031</b>
nein	57	98,3	44	88	
<b>Heizen mit Holz oder Kohle</b>					
nein	28	48,3	8	16	<b>0,002</b>
ja, ab und zu	4	6,9	5	10	
ja, regelmäßig	26	44,8	37	74	
<b>Zentralheizung</b>					
ja	49	84,5	35	70	0,071
nein	9	15,5	15	30	
<b>Einzelraumheizung</b>					
ja	24	42,1	31	64,6	<b>0,022</b>
nein	33	57,9	17	35,4	
<b>Misthaufen in Hausnähe</b>					
ja	22	37,9	46	92	<b>0,000</b>
nein	36	62,1	4	8	
<b>Entfernung Misthaufen zum Haus</b>	<i>n=22</i>		<i>n=46</i>		
< 10 m	0	0	16	34,8	<b>0,004</b>
10 bis 50 m	17	77,3	26	56,5	
> 50 m	5	22,7	4	8,7	
<b>Komposthaufen auf Grundstück</b>					
ja	33	56,9	16	32	<b>0,01</b>
nein	25	43,1	34	68	
<b>Entfernung Komposthaufen zum Haus</b>	<i>n=33</i>		<i>n=16</i>		
< 10 m	17	51,5	4	25	0,071
10 bis 50 m	15	45,5	9	56,3	
> 50 m	1	3	3	18,8	

Beschreibung der Studiensubpopulation mit kompletten Zytokindaten aus dem Nabelschnurblut bei Geburt und im venösen Blut der Kinder nach einem Jahr in Anzahl (n/N) und Prozentwerten (%). Die Berechnung des p-Wertes erfolgte mittels Chi<sup>2</sup>-Tests mit einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$ . In die Auswertung gingen Daten von 108 Müttern, Vätern und Kindern ein. Abweichende Probandenzahlen für die einzelnen Variablen wurden jeweils angegeben.

Tabelle 13: Anamnestische Angaben zur Haustierhaltung in der Studiensubpopulation (n=108; Gruppe der Bauern- und Nicht-Bauernkinder mit Zytokinwerten sowohl aus dem Nabelschnurblut als auch aus dem venösen Blut ein Jahr nach der Geburt). Aufteilung der Ergebnisse nach dem Bauernstatus.

Haustiere	Nicht-Bauern		Bauern		p-Wert
	n/N	%	n/N	%	
<b>Total</b>	58	53,7	50	46,3	
<b>Haustiere in der SS</b>					
ja	27	46,6	34	68	<b>0,025</b>
nein	31	53,4	16	32	
<b>Anzahl Katzen in der SS</b>	n=27		n=34		
keine	10	37	4	11,8	<b>0,019</b>
1-2 Katzen	16	59,3	20	58,8	
3-4 Katzen	1	3,7	6	17,6	
5-10 Katzen	0	0	4	11,8	
<b>Anzahl Hunde in der SS</b>	n=27		n=33		
keinen	22	81,5	23	69,7	0,22
1 Hund	4	14,8	10	30,3	
2 Hunde	1	3,7	0	0	
<b>Hund im Haus in der SS</b>	n=5		n=10		
nie	0	0	5	50	<b>0,01</b>
gelegentlich	0	0	1	10	
häufig	0	0	3	30	
meistens	5	100	1	10	
<b>Katzen als Haustier im 1. LJ</b>					
ja	16	27,6	35	70	<b>0,000</b>
nein	42	72,4	15	30	

Beschreibung der Studiensubpopulation mit kompletten Zytokindaten aus dem Nabelschnurblut bei Geburt und im venösen Blut der Kinder nach einem Jahr in Anzahl (n/N) und Prozentwerten (%). Die Berechnung des p-Wertes erfolgte mittels Chi<sup>2</sup>-Tests mit einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$ . In die Auswertung gingen Daten von 108 Müttern, Vätern und Kindern ein. Abweichende Probandenzahlen für die einzelnen Variablen wurden jeweils angegeben.

In der Studiensubpopulation der 108 Familien traten einige signifikante Unterschiede zwischen Bauern und Nicht-Bauern auf, die allerdings ohne Anpassung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni zunächst eher als deskriptive Größen zu verstehen sind.

Während das Alter der Mütter und Väter im Wesentlichen keine besonderen Differenzen aufwies, zeigte sich jedoch sowohl bei den Müttern als auch bei den Vätern ein signifikanter Unterschied in der Art des Schulabschlusses. So war der Anteil an Hochschulabschlüssen bei den Nicht-Bauern-Familien deutlich höher, während man in den Bauern-Familien häufiger einen Hauptschulabschluss fand.

Die Geschwisterzahl der Mütter und Väter aus Nicht-Bauernfamilien lag mit 1-2 Geschwistern deutlich niedriger als die derer aus Bauernfamilien, die häufig mit 3 und mehr Geschwistern aufwuchsen. Die Bauernfamilien hatten zum Zeitpunkt der Studie zudem schon häufiger Kinder als die Nicht-Bauernfamilien und auch die Anzahl der

eigenen Kinder lag bei Bauernfamilien mit bis zu 4 Kindern deutlich höher als bei den Nicht-Bauernfamilien mit 1-2 eigenen Kindern.

Einen signifikanten Unterschied zeigte ebenfalls das Rauchverhalten der Mütter, wobei sowohl der Anteil der Raucherinnen im Allgemeinen als auch der speziell im ersten Lebensjahr des Kindes unter den Nicht-Bäuerinnen deutlich höher lag. Bei den Vätern konnten keine signifikanten Unterschiede im Rauchverhalten nachgewiesen werden.

Deutlich mehr Mütter aus Bauernfamilien arbeiteten nach der Geburt des Kindes auf dem Hof, auch war unter ihnen der Anteil derer größer, die Frischmilch direkt vom Hof tranken, wohingegen kein signifikanter Unterschied im Abkochverhalten bezüglich der Frischmilch zwischen den Bauern- und Nicht-Bauernfamilien festgestellt werden konnte.

Unter den Nicht-Bäuerinnen der Studiensubpopulation wurde vom Arzt häufiger die Diagnose „allergischer Schnupfen“ gestellt, wohingegen die Diagnose „Neurodermitis“ in beiden Gruppen ähnliche Tendenzen aufwies. In der Gesamtpopulation zeigten sich hier in beiden Fällen keine signifikanten Werte. Allerdings konnte 1 Jahr nach der Geburt des Kindes in beiden Populationen ein Persistieren einer Neurodermitis-Erkrankung signifikant häufiger bei den Bäuerinnen gefunden werden. Bei den Vätern gaben mehr Nicht-Bauern an, jemals unter allergischem Schnupfen gelitten zu haben, wobei sich allerdings unter diesen die Zahl ärztlich bestätigter Diagnosen kaum unterschied. Der Anteil der Großmütter väterlicherseits, die an allergischem Schnupfen litten, war bei den Nicht-Bauern signifikant größer als bei den Bauern. Husten ohne Erkältung trat in beiden Väter-Gruppen gleich häufig auf, bei den Bauern konnte eine Besserung bei Arbeitskarenz festgestellt werden, die allerdings bei Betrachtung der Gesamtpopulation nicht mehr signifikant war.

Die Ernährung in der Stillzeit betreffend, konnte bei den Bäuerinnen ein stärkerer Verzicht auf scharfe Speisen beobachtet werden, der allerdings in der Gesamtpopulation nicht nachgewiesen werden konnte.

Bei den Kindern der Studiensubpopulation konnten weder bezüglich des Geschlechts noch des Geburtsmodus signifikante Unterschiede nachgewiesen werden. Allerdings unterschieden sich die Untergruppen hinsichtlich ihres Geburtsgewichtes. Die Bauernkinder wogen bei Geburt häufiger über 3500 g, während bei den Nicht-Bauern-Kindern der Großteil unter 3500 g lag. Diese Tendenz des Gewichtsunterschieds zeigte sich auch bei der U2 der Kinder, hier konnte dies ebenso für die Gruppe der Mädchen alleine gezeigt werden. Erst bei der U3 konnten derartige Gewichtsdifferenzen nicht mehr nachgewiesen werden. In der Gesamtpopulation zeigten sich keine signifikanten

Unterscheide bezüglich des Gewichts der Kinder. In der Geburtslänge unterschieden sich die Bauern- und Nicht-Bauernkinder nicht auffällig voneinander.

Während die Nicht-Bauernkinder meist die einzigen Kinder mit einem Alter von bis zu 12 Jahren in der Familie waren, fanden sich in den Familien der Bauernkinder oft 3-4 Kinder oder auch mehr in dieser Altersgruppe. Ältere Kinder zwischen 13 und 17 Jahren kamen in beiden Familien ähnlich selten vor, allerdings war die Anzahl an Erwachsenen in Bauernfamilien mit 3-4 und mehr deutlich höher als die der Nicht-Bauernfamilien, in denen die Eltern des Kindes meist die einzigen Erwachsenen im Haushalt waren.

Unter den Bauernkindern hielt sich die Hälfte in den ersten beiden Lebensmonaten regelmäßig auf dem Hof auf, während es bei den Nicht-Bauernkindern nur etwa 20 % waren. Die Einnahme von Antibiotika in den ersten beiden Lebensmonaten war unter den Bauernkindern häufiger anzutreffen, auf das gesamte erste Lebensjahr gesehen, zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied mehr zu den Nicht-Bauernkindern.

Vorbeugende Maßnahmen bezüglich Nahrungsmittelallergien zeigten bei der Studiensubpopulation nur in Hinblick auf das Vermeiden von Fisch beim Kind im ersten Lebensjahr ein abweichendes Verhalten beider Gruppen, wobei hier die Nicht-Bauernfamilien ein deutlich stärkeres Vermeidungsverhalten aufwiesen. In der Gesamtpopulation konnte zudem zusätzlich ein stärkeres Vermeidungsverhalten der Nichtbauern-Familien bezüglich Fleisch und Milch in der Ernährung des Kindes beobachtet werden.

In Bezug auf den Milchkonsum der Kinder ließ sich feststellen, dass Kinder aus Bauernfamilien eher Kuhmilch vom Hof tranken – und zwar sowohl abgekochte als auch frische Milch. Kinder aus Nicht-Bauernfamilien dagegen tranken eher pasteurisierte Frischmilch oder H-Milch.

Auch das Lebensumfeld der Familien wies einige signifikante Unterschiede auf. Es ergriffen tendenziell mehr Nicht-Bauernfamilien der Subpopulation Maßnahmen zur Allergievorbeugung, in der Gesamtpopulation konnten hier sogar deutlich signifikante Unterschiede festgestellt werden. In der Gesamtpopulation zeigten sich signifikante Werte für die Durchführung von Renovierungsarbeiten im allgemeinen, die in der Subpopulation nur noch als Tendenz zu erkennen waren, spezielle Aktivitäten wie Streichen und Lackieren im Kinderzimmer wurden in beiden Populationen häufiger von den Nicht-Bauernfamilien durchgeführt. Die Benutzung von Feinstaubfiltern im Staubsauger konnte signifikant häufiger bei Nicht-Bauernfamilien der Gesamtpopulation festgestellt werden, das Verlegen von Teppichböden fand sich dagegen nur bei den Nicht-Bauernfamilien der



Subpopulation signifikant häufiger. Feuchtigkeitsflecken in der Wohnung, die ohne Schimmelbefall einhergingen, ließen sich vor allem bei den Bauernfamilien finden. Die Art der Heizung ließ auch Unterschiede zwischen beiden Gruppen deutlich werden. So überwogen bei den Bauernfamilien das Heizen mit Holz oder Kohle und in der Subpopulation auch die Einzelraumheizung, während bei den Nicht-Bauernfamilien eher eine Tendenz zur Zentralheizung zu erkennen war.

Bei den Bauernfamilien fand sich im Gegensatz zu den Nicht-Bauernfamilien signifikant häufiger ein Misthaufen in Hausnähe, die Entfernung des Misthaufens zum Haus war bei den Bauernfamilien geringer. Dahingegen befand sich bei den Nicht-Bauernfamilien öfter ein Komposthaufen auf dem Grundstück, dessen Entfernung zum Haus in der Subpopulation tendenziell, in der Gesamtpopulation sogar signifikant geringer war als bei den Bauernfamilien.

Haustiere fanden sich in der Subpopulation signifikant häufiger bei Bauernfamilien, dies traf im Besonderen auf Katzen zu. Vor allem die Anzahl der Katzen war hier deutlich höher als bei den Nicht-Bauernfamilien, wohingegen die Anzahl der Hunde keinen signifikanten Unterschied erkennen ließ. In der Gesamtpopulation zeigte die Katzenhaltung ebenfalls signifikante Werte, hier konnten zudem ähnliche Signifikanzen für die Hundehaltung nachgewiesen werden. Im Unterschied zu den Bauernfamilien, deren Haustiere sich überwiegend im Freien aufhielten, fanden sich die Tiere der Nicht-Bauernfamilien meistens im Haus.

### **4.3 Analyse der Zytokinwerte der Subpopulation**

#### **4.3.1 Deskription der Zytokinwerte aus dem Nabelschnurblut und dem peripher-venösen Blut der Kinder nach einem Jahr**

Im Nabelschnurblut und im peripheren Blut der Kinder nach 1 Jahr wurden die Zytokine IL-5, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  gemessen. Die Bestimmung erfolgte 24h und 48h nach Stimulation und die Werte wurden in pg/ml angegeben.

Es wurden zunächst die Mediane und die 25%- und 75%-Perzentilen der einzelnen Zytokine berechnet und getrennt nach den verschiedenen Stimulantien (LPS, SEB und P/I) und nach Bestimmungszeitpunkt (24h und 48h) dargestellt. Die Unterschiede zwischen Geburts- und 1-Jahres-Werten wurden durch die Angabe der p-Werte verdeutlicht, das Signifikanzniveau hierfür wurde mit  $\alpha < 0,05$  angesetzt. Da eine breite Streuung der

Zytokinkonzentrationen mit zahlreichen Null-Werten vorlag, wurden zur besseren Veranschaulichung der Höhe der tatsächlich gemessenen positiven Zytokinkonzentrationen bei der Berechnung der Mediane die Null-Werte nicht berücksichtigt. Die Berechnungen erfolgten zunächst für alle Kinder, danach aufgeteilt in die Gruppe der Bauern- und die der Nicht-Bauernkinder (s. Tabelle 14-16).

Tabelle 14: Darstellung der Mediane, 25.- und 75. Perzentilen der Zytokinkonzentrationen im Nabelschnurblut und im peripher-venösen Blut der Kinder nach 1 Jahr (alle Kinder)

<b>LPS (24h)</b>	<b>Geburt</b>				<b>1-Jahr</b>				<b>p-Wert</b>
	N	Median	25.	75.	N	Median	25.	75.	
<b>IL-5</b>	4	1,52	0,65	11,42	24	0,91	0,56	2,32	0,511/0,547
<b>IL-10</b>	86	19,60	9,90	44,32	92	57,39	28,05	107,99	0,000
<b>IL-12</b>	9	1,38	1,14	3,29	23	1,76	1,14	2,19	0,883/0,902
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	28	23,86	4,28	96,40	24	3,34	1,90	4,93	0,004
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	67	12,64	4,61	45,29	86	23,29	12,13	44,33	0,018

<b>LPS (48h)</b>	<b>Geburt</b>				<b>1-Jahr</b>				<b>p-Wert</b>
	N	Median	25.	75.	N	Median	25.	75.	
<b>IL-5</b>	3	1,24	0,93	5,84	38	1,31	0,64	2,59	0,582/0,618
<b>IL-10</b>	84	11,35	4,31	32,16	92	39,33	14,83	75,41	0,000
<b>IL-12</b>	9	1,25	0,85	1,41	28	1,29	0,92	2,20	0,416/0,433
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	34	50,50	9,26	88,27	36	4,30	2,49	13,52	0,000
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	42	10,21	2,67	41,33	73	11,32	4,94	25,93	0,763

<b>SEB (24h)</b>	<b>Geburt</b>				<b>1-Jahr</b>				<b>p-Wert</b>
	N	Median	25.	75.	N	Median	25.	75.	
<b>IL-5</b>	6	1,34	0,58	8,51	62	2,13	1,20	3,76	0,729/0,744
<b>IL-10</b>	57	3,99	1,34	8,99	85	8,20	4,57	14,07	0,000
<b>IL-12</b>	9	2,52	0,71	3,08	38	1,96	0,83	3,00	0,871/0,884
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	42	28,51	8,49	70,17	67	6,36	3,46	14,66	0,000
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	27	12,20	4,45	21,41	65	9,56	4,78	19,12	0,485

<b>SEB (48h)</b>	<b>Geburt</b>				<b>1-Jahr</b>				<b>p-Wert</b>
	N	Median	25.	75.	N	Median	25.	75.	
<b>IL-5</b>	19	1,77	0,84	3,85	66	3,43	1,68	5,60	0,038
<b>IL-10</b>	66	3,74	1,51	8,23	85	13,51	6,80	22,74	0,000
<b>IL-12</b>	9	1,33	0,82	2,30	18	1,47	0,59	2,53	0,959/0,980
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	56	70,00	25,33	150,63	71	19,60	11,10	100,00	0,007
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	28	19,68	4,45	49,17	57	13,85	5,89	27,44	0,395

PI (24h)	Geburt				1-Jahr				p-Wert
	N	Median	25.	75.	N	Median	25.	75.	
IL-5	53	3,03	1,24	4,79	86	6,59	3,72	11,38	0,000
IL-10	52	2,12	1,10	4,16	86	9,01	3,41	21,99	0,000
IL-12	17	1,52	0,86	2,09	64	2,28	1,31	3,73	0,056
IFN- $\gamma$	70	89,38	28,12	265,77	93	112,35	15,85	604,55	0,285
TNF- $\alpha$	77	59,34	21,65	119,69	91	54,44	24,45	110,85	0,930

PI (48h)	Geburt				1-Jahr				p-Wert
	N	Median	25.	75.	N	Median	25.	75.	
IL-5	58	3,59	1,59	6,12	83	8,41	5,51	14,35	0,000
IL-10	45	1,83	1,09	4,08	80	10,72	3,53	17,56	0,000
IL-12	8	1,13	0,70	1,34	44	1,89	0,96	3,05	0,148/0,155
IFN- $\gamma$	74	83,92	38,35	330,41	85	448,04	48,33	1295,04	0,001
TNF- $\alpha$	68	46,62	18,63	105,81	83	50,90	20,59	88,21	0,899

Darstellung der Mediane, 25.- und 75. Perzentilen der Zytokinkonzentrationen im Nabelschnurblut und im peripher-venösen Blut der Kinder nach 1 Jahr, aufgeteilt nach Stimulantien (LPS, SEB, PI) und Messzeitpunkt (24h, 48h); Angabe der p-Werte für die Geburts-/1Jahres-Mediane mit einem Signifikanzniveau  $\alpha < 0,05$  (Mann-Whitney-U-Test). Unterschiedliche Werte für „N“ ergeben sich durch Weglassen von Probanden mit nicht messbaren Zytokinwerten („Null-Werte“).

Tabelle 15: Darstellung der Mediane, 25.- und 75. Perzentilen der Zytokinkonzentrationen im Nabelschnurblut und im peripher-venösen Blut der Kinder nach 1 Jahr (Bauernkinder)

LPS (24h)	Geburt				1-Jahr				p-Wert
	N	Median	25.	75.	N	Median	25.	75.	
IL-5	2	1,46	0,47	1,73	12	0,78	0,53	2,32	0,855/0,923
IL-10	39	18,93	10,24	25,43	43	56,29	29,28	104,48	0,000
IL-12	3	3,84	1,20	4,51	9	1,48	1,28	1,82	0,518/0,600
IFN- $\gamma$	13	24,32	5,16	67,20	8	2,15	1,33	3,46	0,001
TNF- $\alpha$	30	12,20	2,45	52,15	40	23,29	11,82	50,32	0,148

LPS (48h)	Geburt				1-Jahr				p-Wert
	N	Median	25.	75.	N	Median	25.	75.	
IL-5	2	<b>1,09?</b>	0,70	<b>0,93?</b>	23	1,30	0,72	2,49	0,764/0,807
IL-10	36	9,28	4,52	36,55	44	41,32	22,95	68,71	0,000
IL-12	3	0,79	0,44	1,28	13	1,34	0,93	2,80	0,158/0,189
IFN- $\gamma$	15	17,21	6,98	171,17	17	3,33	2,26	10,31	0,020/0,020
TNF- $\alpha$	19	18,05	4,84	37,81	35	13,12	6,83	28,16	0,964

SEB (24h)	Geburt				1-Jahr				p-Wert
	N	Median	25.	75.	N	Median	25.	75.	
IL-5	3	1,55	1,12	8,43	29	2,60	1,23	4,54	0,974/1,000
IL-10	21	2,48	1,13	7,51	42	8,25	5,34	15,35	0,001
IL-12	3	2,57	2,52	3,93	21	2,05	0,49	3,07	0,275/0,310
IFN- $\gamma$	15	57,56	26,35	159,03	32	5,89	3,12	15,27	0,000
TNF- $\alpha$	12	18,11	6,06	31,17	32	11,09	6,32	19,03	0,580/0,594

<b>SEB (48h)</b>	<b>Geburt</b>				<b>1-Jahr</b>				<b>p-Wert</b>
	N	Median	25.	75.	N	Median	25.	75.	
<b>IL-5</b>	7	3,19	1,13	5,43	34	3,49	1,49	5,87	0,678/0,697
<b>IL-10</b>	28	2,38	1,44	5,64	41	16,68	8,87	27,04	0,000
<b>IL-12</b>	3	1,33	0,58	2,78	9	1,91	1,45	4,83	0,405/0,482
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	22	81,07	21,49	144,02	34	20,19	12,23	110,05	0,164
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	12	20,66	7,61	37,89	31	13,75	5,97	28,96	0,432/0,446

<b>PI (24h)</b>	<b>Geburt</b>				<b>1-Jahr</b>				<b>p-Wert</b>
	N	Median	25.	75.	N	Median	25.	75.	
<b>IL-5</b>	19	2,68	1,67	4,56	43	6,36	4,24	11,11	0,001
<b>IL-10</b>	17	1,95	0,99	3,20	40	8,37	4,16	17,30	0,000
<b>IL-12</b>	9	1,71	1,31	2,36	28	2,17	1,18	3,78	0,620/0,638
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	31	90,41	27,44	237,84	45	112,35	33,31	409,05	0,389
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	33	45,50	13,43	95,18	43	51,31	25,62	76,43	0,399

<b>PI (48h)</b>	<b>Geburt</b>				<b>1-Jahr</b>				<b>p-Wert</b>
	N	Median	25.	75.	N	Median	25.	75.	
<b>IL-5</b>	25	3,14	1,50	5,76	43	9,52	6,08	14,81	0,000
<b>IL-10</b>	15	1,82	0,68	3,58	41	9,10	3,60	14,60	0,000
<b>IL-12</b>	4	0,93	0,40	1,33	23	1,96	0,92	3,32	0,065/0,069
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	32	142,52	49,71	396,95	42	429,66	91,85	861,86	0,036
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	32	40,82	18,48	166,71	39	49,90	23,46	88,21	0,729

Darstellung der Mediane, 25.- und 75. Perzentilen der Zytokinkonzentrationen im Nabelschnurblut und im peripher-venösen Blut der Kinder nach 1 Jahr, aufgeteilt nach Stimulantien (LPS, SEB, PI) und Messzeitpunkt (24h, 48h); Angabe der p-Werte für die Geburts-/1Jahres-Mediane mit einem Signifikanzniveau  $\alpha < 0,05$  (Mann-Whitney-U-Test). Unterschiedliche Werte für „N“ ergeben sich durch Weglassen von Probanden mit nicht messbaren Zytokinwerten („Null-Werte“).

Tabelle 16: Darstellung der Mediane, 25.- und 75. Perzentilen der Zytokinkonzentrationen im Nabelschnurblut und im peripher-venösen Blut der Kinder nach 1 Jahr (Nicht-Bauernkinder)

<b>LPS (24h)</b>	<b>Geburt</b>				<b>1-Jahr</b>				<b>p-Wert</b>
	N	Median	25.	75.	N	Median	25.	75.	
<b>IL-5</b>	2	7,59	0,55	10,84	12	1,04	0,65	2,73	0,584/0,659
<b>IL-10</b>	47	20,38	9,83	51,69	49	61,85	26,42	122,95	0,001
<b>IL-12</b>	6	1,29	0,95	2,04	14	1,81	0,98	3,18	0,409/0,444
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	15	23,40	3,31	131,55	16	4,26	2,13	17,66	0,167/0,175
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	37	12,64	7,09	36,36	46	22,38	12,32	40,52	0,058

<b>LPS (48h)</b>	<b>Geburt</b>				<b>1-Jahr</b>				<b>p-Wert</b>
	N	Median	25.	75.	N	Median	25.	75.	
<b>IL-5</b>	1	nicht genug Daten			15	1,32	0,50	2,90	0,233/0,375
<b>IL-10</b>	48	14,34	3,86	38,01	48	38,01	12,20	81,89	0,001
<b>IL-12</b>	6	1,28	0,93	1,25	15	1,25	0,88	2,08	0,938/0,970
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	19	51,72	13,00	4,82	19	4,82	2,62	14,04	0,002/0,001
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	23	5,66	2,22	8,32	38	8,32	4,12	24,47	0,562

SEB (24h)	Geburt				1-Jahr				p-Wert
	N	Median	25.	75.	N	Median	25.	75.	
IL-5	3	0,60	0,51	8,77	33	1,98	1,08	3,24	0,710/0,746
IL-10	36	5,30	1,36	9,84	43	7,10	4,19	11,74	0,049
IL-12	6	0,91	0,65	2,94	17	1,93	1,54	2,84	0,327/0,354
IFN- $\gamma$	27	17,11	5,73	57,64	35	6,81	3,47	10,25	0,004
TNF- $\alpha$	15	10,59	4,30	21,41	33	7,48	3,80	20,54	0,443

SEB (48h)	Geburt				1-Jahr				p-Wert
	N	Median	25.	75.	N	Median	25.	75.	
IL-5	12	1,47	0,81	3,30	32	3,26	1,94	5,28	0,019
IL-10	38	6,55	1,57	10,59	44	11,08	5,86	19,91	0,003
IL-12	6	1,49	0,94	5,34	9	1,10	0,40	1,97	0,346/0,388
IFN- $\gamma$	34	66,23	29,37	190,05	37	18,92	10,13	69,01	0,019
TNF- $\alpha$	16	10,14	3,42	64,28	26	13,97	5,60	23,88	0,717

PI (24h)	Geburt				1-Jahr				p-Wert
	N	Median	25.	75.	N	Median	25.	75.	
IL-5	34	3,13	1,21	5,03	43	7,05	2,89	12,36	0,000
IL-10	35	2,31	1,46	4,82	46	11,54	2,46	26,34	0,000
IL-12	8	1,02	0,68	1,93	36	2,40	1,50	3,71	0,045/0,045
IFN- $\gamma$	39	88,36	28,35	315,90	48	119,82	8,77	945,95	0,442
TNF- $\alpha$	44	75,47	22,99	168,74	48	59,95	17,70	137,30	0,563

PI (48h)	Geburt				1-Jahr				p-Wert
	N	Median	25.	75.	N	Median	25.	75.	
IL-5	33	3,71	1,92	6,77	40	8,35	2,59	13,85	0,004
IL-10	30	2,21	1,09	4,20	39	11,40	3,35	19,53	0,000
IL-12	4	1,14	0,95	2,65	21	1,36	0,97	2,90	0,767/0,803
IFN- $\gamma$	42	64,60	30,71	248,34	43	538,86	28,19	1546,39	0,024
TNF- $\alpha$	36	49,39	19,37	102,42	44	51,74	10,01	92,05	0,685

Darstellung der Mediane, 25.- und 75. Perzentilen der Zytokinkonzentrationen im Nabelschnurblut und im peripher-venösen Blut der Kinder nach 1 Jahr, aufgeteilt nach Stimulantien (LPS, SEB, PI) und Messzeitpunkt (24h, 48h); Angabe der p-Werte für die Geburts-/1Jahres-Mediane mit einem Signifikanzniveau  $\alpha < 0,05$  (Mann-Whitney-U-Test). Unterschiedliche Werte für „N“ ergeben sich durch Weglassen von Probanden mit nicht messbaren Zytokinwerten („Null-Werte“).

Ein Blick auf die Anzahl N der gemessenen positiven Zytokinkonzentrationen zeigt, dass vor allem bei den Messungen von IL-5 und IL-12 im Überstand des Nabelschnurblutes nach Stimulation mit allen drei Stimulantien (LPS, SEB, PI) viele Null-Werte vorlagen und somit nur wenige positive Werte in die Berechnung der jeweiligen Mediane einfließen konnten.

Bei Betrachtung der Entwicklung der Zytokinwerte von 24h bis 48h nach Stimulation konnte man einige Unterschiede bezüglich der verschiedenen Stimulantien und Zytokine feststellen. Während IL-5 und IL-12 sowohl zum Zeitpunkt der Geburt als auch nach

einem Jahr kaum Unterschiede in den 24h- und 48h-Medianwerten aufwiesen, zeigte sich für IFN- $\gamma$  nach Stimulation des Nabelschnurblutes mit LPS und SEB ein deutlicher Anstieg des 48h-Medians im Vergleich zum 24h-Wert, ebenso nach Stimulation des 1-Jahres-Blutes mit PI und SEB. Bei TNF- $\alpha$  stiegen die Medianwerte (24h auf 48h) sowohl bei Geburt als auch nach 1 Jahr nach Stimulation mit SEB an. Bei IL-10 zeigte sich eine Erhöhung des Medianwertes nach Stimulation mit SEB für die 1-Jahres-Daten, dagegen eine Erniedrigung nach Stimulation mit LPS sowohl für die Geburts- als auch für die 1-Jahres-Daten.

Auch ein Vergleich der Höhe der 24h- und 48h-Mediane der Zytokine zum Zeitpunkt der Geburt und am Ende des 1. Lebensjahrs machten einige Unterschiede deutlich. So zeigte sich für IL-10 im 1-Jahres-Blut im Vergleich zum Nabelschnurblut sowohl für die 24h- als auch für die 48h-Mediane ein deutlicher Anstieg nach Stimulation mit LPS und ein geringer Anstieg nach Stimulation mit SEB und PI. Auch IL-5 zeigte nach dem 1. Lebensjahr einen solchen Anstieg nach Stimulation mit PI, während bei IL-12 keine großen Veränderungen der Medianwerte festgestellt werden konnten.

Für IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  fiel die Veränderung der Höhe der Mediane sehr unterschiedlich aus: während die IFN- $\gamma$ -Mediane bei Stimulation mit LPS und SEB nach 1 Jahr deutlich niedriger waren, stiegen sie nach Stimulation mit PI (48h) eher an. Bei TNF- $\alpha$  fand man einen signifikanten Anstieg der 24h-Mediane nach Stimulation mit LPS in der Gruppe aller Kinder, der sich nach Aufteilung in Bauern- und Nicht-Bauernkinder allerdings als nicht mehr signifikant erwies.

Im Vergleich der Bauern- bzw. Nicht-Bauern-Untergruppen zeigen folgende Geburts-Zytokine nach jeweiliger Stimulation signifikante Unterschiede bzw. Trends in ihren Medianen: die Medianwerte liegen für TNF- $\alpha$  bei Stimulation mit PI (24h-Wert;  $p=0,097$ ; MWU) und für IL-10 nach Stimulation mit SEB (48h-Wert;  $p=0,033$ ; MWU) bei den Nicht-Bauern höher als bei den Bauern. Für IFN- $\gamma$  (Stimulation mit SEB, 24h-Wert,  $p=0,015$ , MWU; Stimulation mit PI, 48h-Wert;  $p=0,091$ ; MWU), IL-5 (Stimulation mit SEB, 48h-Wert;  $p=0,091$ ; MWU) und IL-12 (Stimulation mit SEB, 24h-Wert;  $p=0,086$ ; MWU) zeigt die Gruppe der Bauern höhere Medianwerte als die der Nicht-Bauern (siehe Abb. 4).

Bei den Zytokinen nach 1 Jahr können keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Bauernstatus festgestellt werden.

**Abb. 4:** Darstellung der Boxplots zu signifikanten und tendenziell signifikanten Unterschieden der Mediane der Zytokine bei Geburt in Abhängigkeit vom Bauernstatus

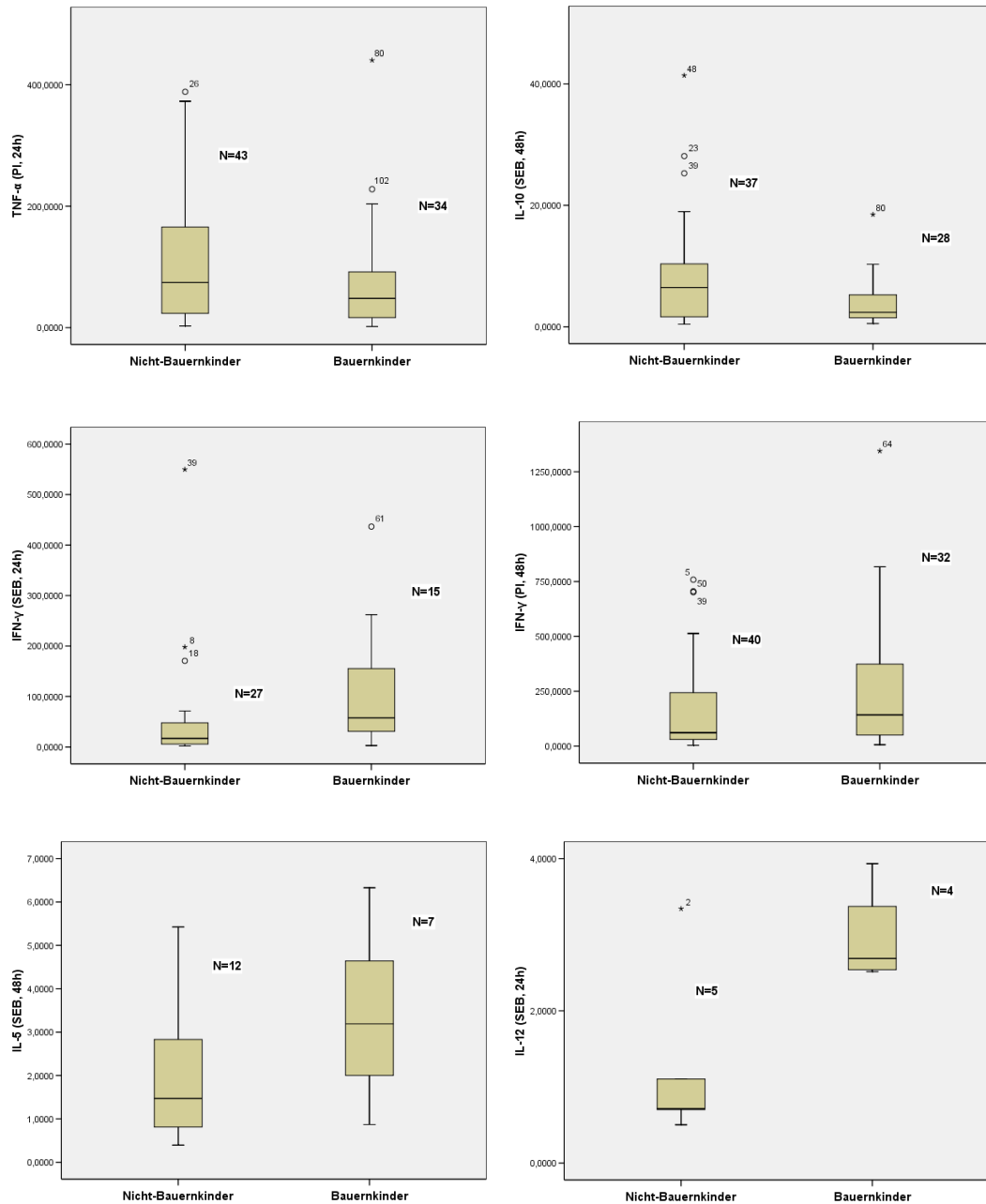


Abb. 4: Höhe der Mediane (in pg/ml) der Zytokine bei Geburt, die signifikante Unterschiede bzw. Trends bezüglich des Bauern-Status aufweisen.

Die Daten liegen als Boxplots vor (Strich: Median, Boxen: IQR (Interquartilabstand), T-bars: range, \* und °: Ausreißer). Die Unterschiede beider Gruppen wurden mittels MWU-Test berechnet.

Für IFN-γ, Stimulation mit PI, 48h-Wert, und für IL-10, Stimulation mit SEB, 48h-Wert, wurden der Anschaulichkeit halber die jeweils obersten Ausreißer in der Graphik nicht berücksichtigt. Graphik mit Ausreißer s. Anhang.

### **4.3.2 Responderraten in n/N im Nabelschnurblut und im venösen Blut nach einem Jahr**

Zunächst wurden die Responder und Nicht-Responder definiert. Zu den Respondern auf ein bestimmtes Stimulans zählten diejenigen Probanden, bei denen mindestens einer der 24h- und 48h-Zytokin-Messwerte positiv ausfiel. Waren beide Werte negativ, wurde der Proband für dieses Stimulans zu den Non-Respondern gezählt. Bei Probanden mit fehlenden Werten wurde folgendermaßen vorgegangen: fehlten beide Werte, wurde der Proband aus der Auswertung für dieses Stimulans und Zytokin ausgeschlossen, fehlte ein Wert und der andere fiel positiv aus, galt der Proband als Responder nach der oben genannten Definition. Fiel der andere dagegen negativ aus, wurde auch dieser Proband aus der jeweiligen Auswertung genommen. So ergaben sich unterschiedliche Gesamtprobandenzahlen N. In einem ersten Schritt wurde die Anzahl der Responder auf die Stimulantien LPS, SEB und PI bezüglich der Zytokine IL-5, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  zum Zeitpunkt der Geburt und nach 1 Jahr angegeben. Hierbei ergaben sich folgende Unterschiede des Responderverhaltens: Es zeigten sich tendenziell niedrigere Responderzahlen bei Geburt für TNF- $\alpha$  nach Stimulation mit PI und für IL-10 nach Stimulation mit LPS, kein Unterschied ergab sich für IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit LPS. Alle anderen Zytokin-Stimulans-Kombinationen wiesen signifikant niedrigere Responderzahlen bei Geburt im Vergleich zu den 1-Jahres-Werten auf (siehe Tabelle 17). Bei Betrachtung der Responderantworten bezogen auf den Bauernstatus konnte nur in 2 Fällen ein signifikanter bzw. tendenziell signifikanter Unterschied zwischen Bauern und Nicht-Bauern festgestellt werden: Auf Stimulation des Nabelschnurblutes mit PI fielen von 42 Bauern 20 Responder auf IL-10 auf, von 53 Nicht-Bauern dagegen 38 Responder. Der Unterschied zeigt sich mit  $p=0,017$  signifikant. Nach Stimulation des 1-Jahres-Blutes mit LPS zeigte sich bei 24 von 46 Bauern und bei 17 von 51 Nicht-Bauern mit einer tendenziellen Signifikanz von  $p=0,061$  ein positiver Responderstatus bezüglich IL-5. (Der Datensatz zum Responderstatus bei Geburt und nach 1 Jahr getrennt nach Bauern und Nicht-Bauern findet sich im Anhang, Tabelle A.8 und A.9).



Zytokin	Stimulans	Responder bei Geburt in n/N (%)	Responder nach 1 Jahr in n/N (%)	p-Wert
IL-5	LPS	7/101 (6,9)	41/97 (42,3)	<0.0001
	SEB	23/103 (22,3)	75/97 (77,3)	<0.0001
	PI	66/104 (63,5)	94/101 (93,1)	<0.0001
IL-10	LPS	91/100 (91,0)	97/100 (97,0)	0.0740
	SEB	78/98 (79,6)	93/98 (94,9)	0.0013
	PI	58/95 (61,1)	92/99 (92,9)	<.0001
IL-12	LPS	13/101 (12,9)	35/98 (35,7)	0.0002
	SEB	15/100 (15,0)	42/94 (44,7)	<.0001
	PI	21/100 (21,0)	69/97 (71,1)	<.0001
IFN- $\gamma$	LPS	43/100 (43,0)	42/102 (41,2)	0.7930
	SEB	65/102 (63,7)	85/100 (85,0)	0.0005
	PI	85/103 (82,5)	97/101 (96,0)	0.0019
TNF- $\alpha$	LPS	73/99 (73,7)	90/101 (89,1)	0.0051
	SEB	41/99 (41,4)	74/99 (74,7)	<.0001
	PI	85/100 (85,0)	94/101 (93,1)	0.0669

Tab. 17: Responderraten in n/N im Nabelschnurblut und peripher-venösen Blut der Kinder nach 1 Jahr, getrennt nach Zytokinen und Stimulantien, p-Werte nach Chi<sup>2</sup>-Test – **alle Kinder**

### 4.3.3 Entwicklung des Geburts-Responderstatus im ersten Lebensjahr

Hierbei galten die oben genannten Definitionen für Responder bzw. Non-Responder. Die unterschiedlichen Werte für N ergaben sich aus dem Ausschluß der Probanden mit fehlenden Zytokindaten für die jeweiligen Zytokine und Stimulantien zum Zeitpunkt der Geburt oder nach 1 Jahr. Es zeigten sich kaum Unterschiede bezüglich des Responderstatus nach 1 Jahr, je nachdem, ob zum Zeitpunkt der Geburt ein Responder- oder Non-Responderstatus vorlag, lediglich nach Stimulation mit PI fiel bezüglich der IL-5-Produktion auf, dass alle Responder bei Geburt auch nach 1 Jahr noch Responder waren, während von den Non-Respondern bei Geburt nur 80,6 % zu Respondern wurden. Hierbei zeigte sich eine Signifikanz von  $p=0,001$  nach dem Exakten Test von Fisher. Nach Stimulation mit SEB zeigte sich im Antwortverhalten des IL-12 bei Geburt und nach 1 Jahr

ein tendenziell signifikanter Unterschied ( $p=0,06$ ,  $\chi^2$ -Test), wobei 69,2% der Responder bei Geburt und 41,1% der Non-Responder bei Geburt nach einem Jahr Responder waren. (Siehe Tabelle 18).

Zytokin	Stimulans	R nach 1 Jahr (n) von den R bei Geburt (N) in n/N und (%)	R nach 1 Jahr (n) von den NR bei Geburt (N) in n/N und (%)	p-Wert
<b>IL-5</b>	<b>LPS</b>	3/6 (50,0)	33/84 (39,3)	0,68*
	<b>SEB</b>	15/21 (71,4)	56/71 (78,9)	0,556*
	<b>PI</b>	61/61 (100,0)	29/36 (80,6)	<b>0,001*</b>
<b>IL-10</b>	<b>LPS</b>	81/84 (96,4)	8/8 (100,0)	1,00*
	<b>SEB</b>	68/72 (94,4)	16/16 (100,0)	1,00*
	<b>PI</b>	47/51 (92,2)	33/35 (94,3)	1,00*
<b>IL-12</b>	<b>LPS</b>	5/11 (45,5)	28/80 (35,0)	0,519*
	<b>SEB</b>	9/13 (69,2)	30/73 (41,1)	<b>0,06</b>
	<b>PI</b>	12/18 (66,7)	53/71 (74,6)	0,556*
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>LPS</b>	21/42 (50,0)	19/52 (36,5)	0,189
	<b>SEB</b>	54/61 (88,5)	27/33 (81,8)	0,369*
	<b>PI</b>	76/80 (95,0)	16/16 (100,0)	1,00*
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>LPS</b>	65/71 (91,5)	20/22 (90,9)	1,00*
	<b>SEB</b>	32/40 (80,0)	38/51 (74,5)	0,621*
	<b>PI</b>	77/80 (96,3)	13/14 (92,9)	0,481*

Tab. 18: Entwicklung des Geburts-Responderstatus nach 1 Jahr, getrennt nach Zytokinen und Stimulantien; (es gingen nur Probanden mit jeweils komplettem Zytokindatensatz zu Geburt UND 1 Jahr in Bezug auf Zytokin und Stimulans ein) P-Werte nach  $\chi^2$ -Test, \*: Exakter Test nach Fisher für eine erwartete Häufigkeit  $<5$ ; R: Responder, NR: Non-Responder – **alle Kinder**

#### 4.3.4 Untersuchung möglicher Einflussfaktoren auf die Entwicklung des Responderstatus der Non-Responder bei Geburt

Für die weiteren Berechnungen wurde die Gruppe der Non-Responder bei Geburt ausgewählt, um die Einflußfaktoren von Umwelt, Ernährung und Gesundheit der Kinder und ihrer Familien auf die Entwicklung des Responderstatus nach 1 Jahr zu untersuchen. Aufgrund geringer oder fehlender Fallzahlen der Non-Responder nach 1 Jahr wurden die

Daten für IL-10 (nach Stimulation mit SEB, LPS, PI), IFN- $\gamma$  (nach Stimulation mit PI) und TNF- $\alpha$  (nach Stimulation mit PI, LPS) aus den Berechnungen herausgenommen, so dass sich für die weiteren Auswertungen der Datensatz wie in Tab. 19 abgebildet ergab.

Zytokin	Stimulans	R nach 1 Jahr (n) von NR bei Geburt (N) (in %)
IL-5	LPS	33/84 (39,3)
	SEB	56/71 (78,9)
	PI	29/36 (80,6)
IL-12	LPS	28/80 (35,0)
	SEB	30/73 (41,1)
	PI	53/71 (74,6)
IFN- $\gamma$	LPS	19/52 (36,5)
	SEB	27/33 (81,8)
TNF- $\alpha$	SEB	38/51 (74,1)

Tab. 19: Entwicklung der Studienpopulation (N'=108) vom Geburts-Non-Responder zum Responder nach einem Jahr, getrennt nach Zytokinen und Stimulantien; abweichendes N ergibt sich durch Ausklammerung der Probanden mit fehlenden Daten bei Geburt oder 1 Jahr; R: Responder, NR: Non-Responder

Es wurden Angaben aus allen vier Fragebögen (Mutter, Vater, 2-Monate, 1-Jahr) mit folgenden Fällen korreliert: Non-Responder bei Geburt und Entwicklung zum Responder nach einem Jahr bezüglich der in Tab. 19 genannten Zytokine auf Stimulation mit SEB, LPS bzw. PI. Dabei wurden hinsichtlich der Fragen aus den Fragebögen Themenkomplexe gebildet, die nachfolgend veranschaulicht werden sollen:

**a) Mutter:**

- Allgemeine Daten (Kindheit auf dem Bauernhof, höchster Schulabschluss, erste Schwangerschaft)
- Familienanamnese (Ekzem des Großvaters mütterlicherseits)
- Medizinische Vorgeschichte (Beeinflussung der Möblierung/Tierhaltung durch Allergien in der Familie der Mutter, spastische oder obstruktive Bronchitis in Kindheit, Neurodermitis)
- Hoftätigkeiten (Überwachung von Vieh, Verabreichung von Medikamenten an Vieh)
- Ernährung, Infektionen und Medikamenteneinnahme der Mutter in der SS (Antibiotikaeinnahme, Allergien (außer atopischen Erkrankungen), Infektionen (außer Erkältung und Angina), Konsum von Frischmilch vom Bauernhof, vaginale Pilzinfektion)

- Ernährung, Infektionen und Medikamenteneinnahme der Mutter in der Stillzeit (Verzicht auf saure Speisen und Getränke, scharfe Gewürze, koffeinhaltige Getränke)

**b) Kind:**

- Erkrankungen (Hautausschlag in der 1. Lebenswoche, pfeifende/keuchende Atemgeräusche oder Neugeborenenexanthem bis zum 2. Lebensmonat, Antibiotika ab dem 2. Lebensmonat)
- Ernährung (Vermeidung von Fisch oder Zitrusfrüchten im 1. Lebensjahr, H-Milch-Konsum im 1. Lebensjahr)
- Kontakt zu Umweltfaktoren (Wochenbettzeit im Zimmer der Mutter, Durchschnittliche Stallaufenthaltszeit im 2. Lebensmonat, Ort des Schlafplatzes des Kindes ab dem 2. Lebensmonat)
- Kontakt zu Geschwistern und anderen Kindern (Im Haus lebende Kinder von 0-12 Jahren)

**c) Umgebung:**

- Bauernhofeigenschaften (Sägemehl als Einstreu bis zum 2. Lebensmonat, Stroh als Tierfutter und langes Stroh als Einstreu im 1. Lebensjahr,)
- Wohnumgebung (Misthaufen in Wohnungsnähe, geodelte Felder < 300m vom Haus entfernt, Traktorenverkehr)
- Heizart (Heizen mit Holz oder Kohle, Einzelraumheizung, Zentralheizung)
- Haustiere (Katze in der SS und im 1. Lebensjahr des Kindes, Katze in der Wohnung im 1. Lebensjahr des Kindes)

Die Ergebnisse der Korrelation zwischen Responderverhalten und möglichen Einflußfaktoren zeigen die Tab. 20-22, hierfür wurden die Ergebnisse zunächst nach Themen sortiert und danach jeweils die Daten zu den einzelnen Zytokinen dargestellt. Es wurden lediglich Daten mit signifikanten Ergebnissen in die Arbeit aufgenommen. Weitere Daten mit tendenziell signifikanten Ergebnissen finden sich im Anhang (siehe Tabellen A.7–A.9).

**Tabelle 20: Mutter**

Mutter		LPS		SEB		PI		
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	
<b>Allgemeine Daten</b>								
<b>Bauernstatus</b>								
	Ja	<b>IL-5</b>	50,0% (19/38)	0,068	77,1% (27/35)	0,725	88,2% (15/17)	0,408
	Nein		30,4% (14/46)		80,6% (29/36)		73,7% (14/19)	
	Ja	<b>IL-12</b>	36,8% (14/38)	0,742	51,5% (17/33)	0,1	74,2% (23/31)	0,938
	Nein		33,3% (14/42)		32,5% (13/40)		75,0% (30/40)	
	Ja	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	31,8% (7/22)	0,545	83,3% (15/18)	1,0	-	-
	Nein		40,0% (12/30)		80,0% (12/15)		-	
	Ja	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	-	-	75,0% (18/24)	0,94	-	-
	Nein		-		74,1% (20/27)		-	
<b>Höchster Schulabschluss</b>								
	Volks-/Hauptschule	<b>IL-5</b>	-	-	75,0% (12/16)	0,016	100,0% (10/10)	0,022
	Realschule/Mittlere Reife		-		87,5% (35/40)		92,3% (12/13)	
	Abitur/Fachabitur		-		85,7% (6/7)		57,1% (4/7)	
	Fach-/Hochschule		-		37,5% (3/8)		50,0% (3/6)	
<b>Bereits eigene Kinder</b>								
	Ja	<b>IL-12</b>	46,8% (22/47)	0,008	52,4% (22/42)	0,023	-	-
	Nein		18,2% (6/33)		25,8% (8/31)		-	
	Ja	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	20,7% (6/29)	0,008	-	-	-	-
	Nein		56,5% (13/23)		-		-	

		<b>LPS</b>		<b>SEB</b>		<b>PI</b>	
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert
<b>Eigene Kindheit auf Bauernhof</b>							
Ja	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	-	-	62,5% (10/16)	0,007*	-	-
Nein		-		100,0% (17/17)		-	
Ja	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	-	-	88,0% (22/25)	0,03	-	-
Nein		-	-	61,5% (16/26)			

## Medizinische Vorgeschichte

### Beeinflussung der Möblierung/Tierhaltung durch Allergien in der Familie der Mutter

Ja	<b>IL-5</b>	15,8% (3/19)	0,017	-	-	-	-
Nein		46,2% (30/65)		-		-	

### Ekzem des eigenen Vaters

Ja	<b>IL-5</b>	10,0% (1/10)	0,044*	-	-	-	-
Nein		44,4 (32/72)		-		-	

### Wiederholt spastische oder obstruktive Bronchitis in der Kindheit

Ja	<b>IL-12</b>	-	-	83,3% (5/6)	0,033*	-	-
Nein		-		35,5% (22/62)		-	

### Neurodermitis in der Vorgeschichte

Ja	<b>IL-12</b>	7,7% (1/13)	0,022*	-	-	-	-
Nein		50,0% (10/20)					

		<b>LPS</b>		<b>SEB</b>		<b>PI</b>	
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert
<b>Ernährung, Infektionen und Medikamenteneinnahme in der SS</b>							
<b>Frischmilchkonsum direkt vom Bauernhof</b>							
Ja	<b>IL-12</b>	-	-	-	-	57,7% (15/26)	0,013
Nein		-		-		84,4% (38/45)	
<b>Allergien (außer atopischen Erkrankungen)</b>							
Ja	<b>IL-5</b>	-	-	-	-	55,6% (5/9)	0,05*
Nein		-		-		88,9% (24/27)	
<b>Infektionen (außer Erkältung und Angina)</b>							
Ja	<b>IL-12</b>	47,8% (22/46)	0,005	-	-	-	-
Nein		17,6% (6/34)		-		-	
<b>Vaginale Pilzinfektion</b>							
Ja	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	9,1% (1/11)	0,037	-	-	-	-
Nein		45,0% (18/40)		-		-	
<b>Antibiotikaeinnahme</b>							
Ja	<b>IL-5</b>	-	-	-	-	40,0% (2/5)	0,04*
Nein		-		-		87,1% (27/31)	

		<b>LPS</b>		<b>SEB</b>		<b>PI</b>	
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert
<b>Ernährung der Mutter in der Stillzeit</b>							
<b>Verzicht auf saure Speisen/Getränke</b>							
Ja	<b>IL-5</b>	51,4% (18/35)	0,034	-	-	-	-
Nein		27,9% (12/43)		-		-	
<b>Verzicht auf scharfe Gewürze</b>							
Ja	<b>IL-12</b>	47,5% (19/40)	0,033	-	-	-	-
Nein		23,5% (8/34)		-		-	
<b>Verzicht auf koffeinhaltige Getränke</b>							
Ja	<b>IL-12</b>	51,4% (19/37)	0,01	-	-	-	-
Nein		22,2% (8/36)		-		-	
Ja	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	-		62,5% (15/24)	0,046	-	-
Nein		-		87,5% (21/24)		-	
<b>Hoftätigkeiten</b>							
<b>Viehüberwachung und -medikamentengabe</b>							
Ja	<b>IL-12</b>	14,3% (3/21)	0,002*	-	-	-	-
Nein		69,2% (9/13)		-		-	



**Tabelle 21: Kind**

Kind		LPS		SEB		PI	
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert
<b>Erkrankungen</b>							
<b>Hautausschlag des Kindes in der</b>							
	<b>1. LW</b>						
	Ja	<b>IL-5</b>	70,0% (7/10)	0,044*	-	-	-
	Nein		35,1% (26/74)		-	-	
<b>Antibiotika ab dem 2.LM</b>							
	Ja	<b>IL-5</b>	-	-	50,0% (5/10)	0,031*	40,0% (2/5)
	Nein		-		83,3% (50/60)		87,1% (27/31)
<b>Pfeifende/keuchende</b>							
<b>Atemgeräusche bis zum 2.LM</b>							
	Ja	<b>IL-12</b>	71,4% (5/7)	0,048*	-	-	-
	Nein		31,5% (23/73)		-	-	
<b>Neugeborenenexanthem bis zum</b>							
	<b>2. LM</b>						
	Ja	<b>IL-12</b>	40,0% (24/60)	0,023	-	-	-
	Nein		11,1% (2/18)		-	-	

		<b>LPS</b>		<b>SEB</b>		<b>PI</b>	
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert
<b>Ernährung</b>							
<b>Fisch vermieden im 1. LJ</b>							
Ja	<b>IL-12</b>	-	-	33,3% (9/27)	0,028	-	-
Nein		-		66,7% (12/18)		-	
<b>H-Milch getrunken im 1. LJ</b>							
Ja	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	61,5% (8/13)	0,047*	-	-	-	-
Nein		28,2% (11/39)		-		-	
<b>Zitrusfrüchte vermieden im 1. LJ</b>							
Ja	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	-	-	100,0% (11/11)	0,012*	-	-
Nein		-		50,0% (5/10)		-	
<b>Umweltkontakte</b>							
<b>Stallaufenthaltszeit im 2. LM</b>							
0 Tage/Woche	<b>IL-5</b>	-	-	83,3% (15/18)	0,026	-	-
Bis 3 Tage/Woche		-		44,4% (4/9)		-	
Über 3 Tage/Woche		-		100,0% (6/6)		-	
<b>Wochenbettzeit bei Mutter</b>							
Bis 16 Std./Tag	<b>IL-12</b>	60,0% (9/15)	0,028*	-	-	-	-
Mehr als 16 Std./Tag		25,9% (15/58)		-		-	
<b>Schlafplatz seit dem 2. LM</b>							
Im eigenen Bett	<b>IL-12</b>	-	-	30,5% (18/59)	0,001	-	-
Im Elternbett		-		75,0% (6/8)		-	
Im eigenen und im Elternbett		-		100,0% (5/5)		-	

**Tabelle 22: Umgebung**

Umgebung		LPS		SEB		PI	
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert
<b>Bauernhof-Eigenschaften</b>							
<b>Stroh als Tierfutter im 1. LJ</b>							
	Ja	<b>IL-5</b>	76,9% (10/13)	0,006	-	-	-
	Nein		28,6% (6/21)		-	-	-
	Ja	<b>IL-12</b>	61,5% (8/13)	0,046	-	-	-
	Nein		27,3% (6/22)		-	-	-
<b>Langes Stroh als Einstreu im 1. LJ</b>							
	Ja	<b>IL-12</b>	52,4% (11/21)	0,049	77,8% (14/18)	0,001	-
	Nein		20,0% (3/15)		15,4% (2/13)		-
<b>Sägemehl als Einstreu bis zum 2. LM</b>							
	Ja	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	0,0% (0/8)	0,045*	25,0% (1/4)	0,018*	-
	Nein		45,5% (5/11)		100,0% (8/8)		-

		<b>LPS</b>		<b>SEB</b>		<b>PI</b>	
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert
<b>Wohnumgebung</b>							
<b>Misthaufen in Wohnungsnähe</b>							
Ja	<b>IL-5</b>	49,0% (25/51)	0,023	-	-	-	-
Nein		24,2% (8/33)		-		-	
<b>Traktorenverkehr in der Straße</b>							
< 5x/Tag	<b>IL-5</b>	-	-	87,5% (21/24)	0,018	-	-
5-25x/Tag		-		79,1% (34/43)		-	
> 25x/Tag		-		25,0% (1/4)		-	
<b>Geodelte Felder &lt; 300 m vom Haus entfernt</b>							
Ja	<b>IL-12</b>					81,4% (48/59)	0,008*
Nein						41,7% (5/12)	
<b>Entfernung des Misthaufens</b>							
< 10 m	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	-	-	100,0% (12/12)	0,017	-	-
10-50 m		-		52,6% (10/19)		-	
> 50 m		-		75,0% (3/4)		-	
<b>Haustiere</b>							
<b>Katze als Haustier bis zum 2. LM</b>							
Ja	<b>IL-12</b>	19,4% (7/36)	0,008	-	-	-	-
Nein		47,7% (21/44)		-		-	

		<b>LPS</b>		<b>SEB</b>		<b>PI</b>	
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert
<b>Kontakt zu Geschwistern</b>							
<b>Im Haus lebende Kinder von 0-12 Jahren</b>							
1 Kind	<b>IL-12</b>	21,2% (7/33)	0,009	-	-	-	-
2 Kinder		57,1% (16/28)		-		-	
3 Kinder und mehr		26,3% (5/19)		-		-	
<b>Heizart</b>							
<b>Heizen mit Holz oder Kohle</b>							
Ja	<b>IL-5</b>	-	-	-	-	69,6% (16/23)	0,034*
Nein		-		-		100,0% (13/13)	
<b>Einzelraumheizung</b>							
Ja	<b>IL-5</b>	-	-	-	-	64,3% (9/14)	0,028*
Nein		-		-		95,2% (20/21)	
Ja	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	-	-	63,3% (19/30)	0,016*	-	-
Nein		-		95,0% (19/20)		-	
<b>Zentralheizung</b>							
Ja	<b>IL-5</b>	-	-	-	-	89,3% (25/28)	0,03*
Nein		-		-		50,0% (4/8)	

Tabellen 20-22: Gruppe der Non-Responder bei Geburt (NR), die nach 1 Jahr Responder (R) sind - Aufteilung nach verschiedenen Charakteristika und Ermittlung der p-Werte durch Chi<sup>2</sup>-Test ( $\chi^2$ ) mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ . Bei einer erwarteten Häufigkeit von  $< 5$  wurde der Exakte Test nach Fisher angewendet.

Für jedes der Zytokine (IL-5, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) wurden die oben aufgeführten Kategorien einzeln betrachtet, wobei sich folgende Einflußfaktoren signifikant zeigten:

Es fielen einige Faktoren auf, die das Verhalten oder Eigenschaften der Mutter betrafen. Je höher zum Beispiel der Schulabschluß der Mutter war, desto weniger Non-Responder bezüglich IL-5 zeigten nach einem Jahr einen Responderstatus auf Stimulation mit SEB und PI ( $p=0,016$  bzw.  $p=0,022$ ). Bei den Müttern, die als Kinder selbst auf einem Bauernhof gelebt hatten, zeigten etwa 62,5% der Kinder nach einem Jahr einen positiven Responderstatus nach Stimulation mit SEB bezüglich IFN- $\gamma$ , während alle Kinder der Mütter, die außerhalb eines Hofes aufwuchsen, nach 1 Jahr Responder waren ( $p=0,007$ ). In Bezug auf die Responderentwicklung bei TNF- $\alpha$  zeigte sich hierbei ein gegenteiliger Effekt ( $p=0,03$ ). Bei Müttern, die auf dem Hof in der Viehüberwachung und Medikamentenverabreichung der Tiere tätig waren, zeigten nach Stimulation mit LPS signifikant weniger Kinder eine Konversion in einen positiven Responderstatus bezüglich IL-12 ( $p=0,002$ ). Hatte die Mutter in der Vorgeschichte eine Neurodermitis, wurde der Responderstatus für IL-12 nach Stimulation mit LPS bei nur 7,7% der Kinder positiv (versus 50% der Kinder bei fehlender Neurodermitis der Mutter,  $p=0,022$ ), bei obstruktiver Bronchitis der Mutter zeigte sich nach Stimulation mit SEB ein gegensätzliches Verhalten: 83,3% der Kinder hatten bei mütterlicher Erkrankung einen positiven Responderstatus für IL-12, versus 35,5% der Kinder bei Fehlen der Erkrankung auf Seiten der Mutter ( $p=0,033$ ). Auch anamnestische Hinweise auf das Vorliegen allergischer Erkrankungen in der Familie der Mutter (Ekzem des Großvaters, Beeinflussung der Möblierung und Tierhaltung aufgrund von Allergien) zeigten eine geringere Konversionsrate der Kinder in einen positiven Status für IL-5 nach Stimulation mit LPS.

Des Weiteren konnten Einflußfaktoren im Bereich Ernährung, Infektionen und Antibiotikaeinnahme der Mutter Schwangerschaft und Stillzeit beobachtet werden. Vaginale Pilzinfektionen während dieser Zeit (Stimulation mit LPS) und Einnahme von Antibiotika (Stimulation mit PI) zeigten bei den Kindern geringere Konversionsraten in einen positiven Responderstatus bezüglich IL-5 und IL-12 bei Antibiotikaeinnahme (jeweils  $p=0,04$ ), und IFN- $\gamma$  bei vaginalen Pilzinfektionen ( $p=0,037$ ) im Vergleich zu Kindern, deren Mütter hiervon nicht betroffen waren. Bei anderen Infektionen der Mutter in der Schwangerschaft fand sich ein gegensätzliches Ergebnis für IL-12 nach Stimulation mit LPS ( $p=0,005$ ). Kinder von Müttern, die in der Schwangerschaft Frischmilch direkt vom Hof getrunken hatten, zeigten eine geringere Konversionsrate in einen positiven Responderstatus bezüglich IL-12

nach Stimulation mit PI als die Gegengruppe ( $p=0,013$ ). Bei Verzicht der Mutter auf saure Nahrungsmittel bzw. scharfe Gewürze in der Stillzeit, fiel bei den Kindern ein höherer Anteil derer auf, die nach Stimulation mit LPS einen positiven Responderstatus aufwiesen ( $p=0,034$  bzw.  $p=0,033$ ). Bei Verzicht der Mutter auf koffeinhaltige Getränke fiel bei den Kindern nach Stimulation mit LPS ein erhöhter Anstieg der Responderrate für IL-12 ( $p=0,01$ ), nach Stimulation mit SEB eine niedrigere Responderrate für TNF- $\alpha$  im Vergleich zur Gegengruppe auf ( $p=0,046$ ). Handelte es sich um die erste Schwangerschaft der Mutter, zeigten die Kinder nach Stimulation mit LPS verstärkt eine positive Responderentwicklung für IFN- $\gamma$  ( $p=0,005$ ). Bei Müttern, die bereits eigene Kinder hatten, zeigte sich ebenso eine deutlich höhere Anzahl an positiver Responderkonversion für IL-12 nach Stimulation mit LPS und SEB ( $p=0,008$  bzw.  $p=0,023$ ), wohingegen die Rate der positiven Konversion für IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit LPS für Mütter ohne vorher geborene eigene Kinder größer war ( $p=0,008$ ).

Einflussmerkmale, die die Kinder direkt betrafen, fanden sich im Bereich Ernährung, Erkrankungen im ersten Lebensjahr und Kontakt mit anderen Kindern und Umweltfaktoren wie Stallaufenthalt oder Art der Schlafstätte. Bei der Entwicklung eines positiven Responderstatus für IL-12 zeigte sich nach Stimulation mit SEB bei Kindern, die Fisch zu sich nahmen, eine höhere Konversionsrate als bei Kindern, die diesen mieden ( $p=0,028$ ). Die Entwicklung bezüglich IFN- $\gamma$  zeigte eine 100%ige Responderentwicklung nach Stimulation mit SEB für Kinder, die Zitrusfrüchte vermieden, im Gegensatz zu denen, die sie aßen (50%) ( $p=0,012$ ). Kinder, die im ersten Lebensjahr H-Milch tranken wiesen nach Stimulation mit LPS ebenso höhere Responderraten für IFN- $\gamma$  auf, als solche, die diese mieden ( $p=0,047$ ).

Kinder, die nach dem 2. Lebensmonat Antibiotika einnahmen, wiesen eine nur halb so hohe Konversionsrate in einen positiven Responderstatus für IL-5 auf (Stimulation mit SEB:  $p=0,031$ ; Stimulation mit PI:  $p=0,04$ ). Dahingegen zeigten Kinder mit Erkrankungen wie Hautausschlag in der ersten Lebenswoche (Beobachtung von IL-5) und Neugeborenenexanthem oder pfeifenden Atemgeräuschen in den ersten beiden Lebensmonaten (Beobachtung von IL-12) nach Stimulation mit LPS mindestens doppelt so hohe Konversionsraten wie gesunde Kinder.

Bezüglich der im Haushalt lebenden Kinder bis 12 Jahre zeigte sich ein erhöhtes positives Responderverhalten für Kinder mit einem Geschwisterkind im Vergleich zu Kindern mit keinem oder mindestens zwei Geschwistern. Dies zeigte sich für die Entwicklung von IL-12 nach Stimulation mit LPS ( $p=0,009$ ).

Kinder, die sich im zweiten Lebensmonat bis zu 3 Tagen pro Woche im Stall aufhielten wiesen geringere Responderraten für IL-5 auf, als solche, die keine Zeit im Stall verbrachten oder sich mehr als 3 Tage wöchentlich dort aufhielten (Stimulation mit SEB,  $p=0,026$ ).

Bezüglich der Entwicklung von IL-12 nach Stimulation mit SEB zeigten Kinder, die im Elternbett oder sogar im eigenen und im Elternbett schliefen wesentlich höhere Responderraten (75% bzw. 100%) als diejenigen, die ausschließlich das eigene Bett benutzten (30,5%) ( $p=0,001$ ). Kinder, die in der Wochenbettzeit mehr als 16 Stunden täglich im Zimmer der Mutter verbrachten, wiesen deutlich geringere positive Responderkonversionen auf (25,9%), als solche, die weniger als 16 Stunden dort verbrachten (60%) ( $p=0,028$ ).

Auch das Wohnumfeld zeigte einige Einflussfaktoren auf die Responderentwicklung im ersten Lebensjahr der Kinder. So erhöhte ein Misthaufen in der Nähe der Wohnung die Rate an positiven Respondern auf IL-5 deutlich (Stimulation mit LPS,  $p=0,023$ ), dieser Effekt zeigte sich zudem bei Stimulation mit SEB in Bezug auf den Responderstatus für TNF- $\alpha$ , und zwar umso stärker, je näher sich der Misthaufen in Hausnähe befand ( $p=0,017$ ). Auch geodelte Felder in Wohnungsnähe zeigten bei Stimulation mit PI stark erhöhte Responderkonversionsraten für IL-12 ( $p=0,008$ ). Bei ansteigender Häufigkeit von Traktorenverkehr in unmittelbarer Wohnungsnähe fiel eine abnehmende Rate an Responderkonversion für IL-5 auf (Stimulation mit SEB,  $p=0,018$ ).

Wurde im ersten Lebensjahr der Kinder Stroh als Tierfutter auf dem Hof verwendet, stiegen die Responderraten sowohl für IL-5 als auch für IL-12 nach Stimulation mit LPS deutlich an ( $p=0,006$  bzw.  $p=0,046$ ). Ebenso verhielt es sich bei Benutzung von langem Stroh als Einstreu in Bezug auf die Responderentwicklung für IL-12 nach Stimulation mit LPS ( $p=0,049$ ) und SEB ( $p=0,001$ ). Wurde dagegen Sägemehl als Einstreu verwendet, fiel die Zahl der Responderkonversionen für IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit LPS bzw. SEB deutlich ab ( $p=0,045$  bzw.  $p=0,018$ ).

Die Art der Raumheizung machte ebenfalls einige signifikante Unterschiede im Responderverhalten deutlich. So stieg bei Benutzung eines Holz- oder Kohleofens die Zahl der Responderkonversionen für IL-5 nach Stimulation mit PI deutlich an ( $p=0,034$ ). Ebenso verhielt es sich mit der Responderentwicklung für IL-5 nach Stimulation mit PI und derer von TNF- $\alpha$  nach Stimulation mit SEB bei Benutzung von Einzelraumheizungen ( $p=0,028$  bzw.  $p=0,016$ ), wohingegen die Kinder in Wohnungen mit Zentralheizungen eine geringere Rate an Responderkonversionen für IL-5 zeigten (Stimulation mit PI,  $p=0,03$ ).



Befand sich während der Schwangerschaft der Mutter eine Katze im Haushalt, zeigten die Kinder am Ende des ersten Lebensjahres sowohl nach Stimulation mit LPS, als auch nach Stimulation mit SEB eine geringere positive Responderrate für IL-12 ( $p=0,006$  bzw.  $p=0,028$ ). Je weniger sich die Katze im Haus aufhielt, desto höher wurde die Rate der Responderkonversionen für IL-12 (Stimulation mit LPS,  $p=0,049$ ).

#### **4.3.5 Binäre logistische Regressionsanalyse: Abhängigkeit des Responder-Entwicklungsstatus von verschiedenen Einflussfaktoren**

Um den Zusammenhang zwischen der Responderentwicklung im ersten Lebensjahr und den in den Tabellen 14-16 aufgezeigten signifikanten Einflüssen weiter zu untersuchen wurde eine binäre logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Da die Fallzahlen insgesamt sehr gering ausfielen, wurden nur Einflußfaktoren mit einem stark signifikanten p-Wert bis 0,01 in die Analysen aufgenommen, um eine noch verwertbare Anzahl einschließbarer Fälle zu erhalten. Dabei ergaben sich für die einzelnen Zytokine folgende Confounder, von denen allerdings nur die jeweils Fettgedruckten letztlich in die schrittweise Analyse gingen (Tab. 21):

IFN- $\gamma$ (LPS):	<b>Mutter hat bereits eigene Kinder</b>
IFN- $\gamma$ (SEB):	Mutter hat Kindheit auf Bauernhof verbracht Kind hat Zitrusfrüchte vermieden im 1. Lebensjahr
IL-12 (LPS):	<b>Mutter ist in Viehüberwachung und –medikamentengabe tätig</b> Mutter hat bereits eigene Kinder Mutter hatte Infektion in Schwangerschaft (außer Erkältung/Angina) Verzicht der Mutter auf koffeinhaltige Getränke in der Stillzeit Katze als Haustier bis zum 2. Lebensmonat Im Haus lebende Kinder von 0-12 Jahren
IL-12 (SEB):	<b>Langes Stroh als Einstreu im 1.Lebensjahr</b> Schlafplatz des Kindes seit dem 2.Lebensmonat
IL-12 (PI):	<b>Geodelte Felder &lt; 300 m vom Haus entfernt (Schritt 1)</b> <b>Frischmilchkonsum in der Schwangerschaft direkt vom Bauernhof (Schritt 2)</b>
IL-5 (LPS):	<b>Stroh als Tierfutter im 1. Lebensjahr</b>

	<b>Confounder</b>	<b>OR</b>	<b>95%-KI</b>	<b>p-Wert</b>	<b>N</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math> (LPS)</b>	„Eigene Kinder“	0,201	0,059 – 0,679	0,007	52
<b>IL-12 (LPS)</b>	„Viehüberwachung und – medikamentengabe“	0,094	0,017 – 0,524	0,004	31
<b>IL-12 (SEB)</b>	„Langes Stroh“	19,25	2,961 – 125,161	0,000	31
<b>IL-12 (PI)</b>	„Geodelte Felder“1)	6,109	1,630 – 22,903	0,007	71
	„Frischmilchkomsum“2)	0,224	0,066 – 0,759	0,001	
	„Geodelte Felder“2)	6,947	1,664 – 28,992		
<b>IL-5 (LPS)</b>	„Stroh als Tierfutter“	8,333	1,682 – 41,288	0,006	34

Tab. 23: Berechnung der Odds Ratio (OR), des 95% Konfidenzintervalls (95% KI) und des p-Werts mit binärer logistischer Regression. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,01$  gewählt. N= Anzahl der in die Berechnung eingegangenen Fälle. Eine negative Korrelation liegt bei  $OR < 1$ , eine positive Korrelation bei  $OR > 1$  vor. 1) Schritt 1 der stepwise-Analyse, 2) Schritt 2 der stepwise-Analyse.

Wie in Tab.23 ersichtlich, wurde in den schrittweisen Analysen meist nur ein einziger Confounder aufgenommen, bei IL-12 (PI) nur zwei von sechs möglichen, da die restlichen Confounder im stepwise-Modell keine Signifikanz von  $p < 0,01$  erreichten. Für IFN- $\gamma$  (SEB) konnte gar keine Variable in das Modell aufgenommen werden.

Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass das Vorhandensein weiterer eigener Kinder negativ mit der Entwicklung eines Responderstatus für IFN- $\gamma$  (nach Stimulation mit LPS) im ersten Lebensjahr korrelierte, ebenso zeigten sich negative Korrelationen in Bezug auf die IL-12-Konversion für die mütterliche Tätigkeit in der Viehüberwachung und – medikamentengabe (LPS) und für den Frischmilchkonsum der Mutter in der Schwangerschaft (PI). Ein positiver Zusammenhang fand sich für IL-12 (PI) und dem Vorkommen geodelter Felder in Hausnähe und für die Verwendung von Stroh als Tierfutter in Bezug auf die IL-5-Konversion (LPS). Ebenso fällt eine deutliche positive Korrelation für die Verwendung von langem Stroh als Einstreu und der IL-12-Responderkonversion (SEB) auf. Diese Ergebnisse decken sich mit den in Kapitel 3.3.4 beschriebenen signifikanten Zusammenhängen der hier im Regressionsmodell untersuchten Einflußfaktoren auf die jeweiligen Zytokin-Responderentwicklungen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Studie

Bei der PASTURE-Studie handelt es sich um eine prospektive longitudinale Studie, die im Vergleich zu Querschnittsstudien [88, 89] nicht nur eine Momentaufnahme der Probandenkohorte aufzeigt, sondern diese über einen längeren Zeitraum, hier ein Jahr, beobachtet. Dies ist allerdings mit einem höheren Zeit- und Kostenaufwand verbunden, und auch der Kohortenverlust über die Dauer von einem Jahr muss bedacht werden [92]. So reduzierte sich die Größe der Subpopulation, die vollständige Datensätze für die Zytokine sowohl bei Geburt als auch nach 1 Jahr aufwies und dieser Arbeit zugrunde lag, auf 42,5 % der anfänglichen Populationsgröße bei Geburt. Dadurch war eine weitere Aufteilung in die Kategorien Bauern - Nicht-Bauern teilweise nicht mehr möglich.

Zur Bestimmung der notwendigen Fallzahlgröße wurden im Vorfeld der Studie Powerkalkulationen durchgeführt ( $\alpha=0,05$ , Power 80%), um auch nach Abzug der Drop-out-Rate noch eine ausreichende Probandenzahl zu erhalten. Hierbei ergab sich die Notwendigkeit des Einschlusses von 400 Probanden pro Studienarm.

Im deutschen Arm der Studie, die unter dem Namen LUKAS geführt wurde, fand zunächst eine Pilotstudie statt, um die geeigneten Studienorte zu ermitteln. Hierbei wurden sich ähnelnde Regionen und Kleinstädte in Südbayern hinsichtlich der Mitarbeit der Hebammen in den Krankenhäusern und in Bezug auf den Anteil der Bäuerinnen unter den Gebärenden beurteilt. Dadurch sollten regionalspezifische Unterschiede der Rekrutierungsorte minimiert werden [92].

Auch die Reduzierung möglicher systematischer Fehler ist in Studien von großer Bedeutung [92]. Dies wurde zum einen dadurch erreicht, dass die schwangeren Probandinnen einheitlich über Hebammen in den Krankenhäusern oder in Geburtsvorbereitungskursen rekrutiert wurden. Zudem wurde eine ähnliche Anzahl an Bäuerinnen und Nicht-Bäuerinnen eingeschlossen (44,1 % Bauern vs. 55,9% Nicht-Bauern in der Gesamtpopulation; 46,3% Bauern vs. 53,7% Nicht-Bauern in der Subpopulation). Die Ein- und Ausschlußkriterien für die Studienteilnahme galten für beide Gruppen gleichermaßen. Orte und Zeitpunkte der Interviews und Blutentnahmen waren zwar im Studienprotokoll festgelegt, aber doch so flexibel, dass eine Wahrnehmung der Termine für fast alle teilnehmenden Familien möglich war und die drop-out-Rate diesbezüglich gering gehalten werden konnte. Auch hier galten gleiche Bedingungen für Bauern wie für Nicht-Bauern [92].

Grundlage der Interviews bildeten standardisierte Fragebögen, die bereits in verschiedenen anderen Studien validiert wurden [88-91]. Das Fragenspektrum war sehr breit gewählt, um möglichst ausführliche Informationen über Lebens- und Ernährungsgewohnheiten, sowie Erkrankungen von Mutter, Vater und Kind zu erhalten. Ebenso wurden zahlreiche Fragen zur Umgebung, bzw. zu den Hofeigenschaften der Bauernfamilien gestellt. Auch mögliche Störgrößen wie Schulbildung, Rauchverhalten der Eltern, Familienanamnese, etc. fanden Eingang in die Fragebögen.

Zwischen der Gruppe der Bauern und der Nicht-Bauern gab es jedoch in der dieser Arbeit zugrunde liegenden Subpopulation neben bauernspezifischen Faktoren wie Hoftätigkeit, Frischmilchkonsum, Art der Heizung, Anzahl der Haustiere und der Nähe von Mist- und Komposthaufen, auch personenbezogene signifikante Unterschiede. Diese betrafen den Schulabschluss und die Geschwisterzahl der Eltern, ebenso das Rauchverhalten der Mütter und den BMI der Väter. Bezüglich des Alters der Eltern, des BMI der Mütter und des Rauchverhaltens der Väter zeigte sich kein signifikanter Unterschied in beiden Gruppen. Bei den Kindern fand sich in beiden Gruppen ein ähnliches Verhältnis von Geschlecht und Geburtsmodus, jedoch ein signifikanter Unterschied in Bezug auf das Gewicht der Kinder. Auch hier zeigte sich ein unterschiedliches Verhalten bezüglich Frischmilchkonsum, Hofaufenthalt und Geschwisteranzahl.

Um reproduzierbare Ergebnisse für eine Studie zu erhalten, muss eine ausreichende Qualitätskontrolle gewährleistet sein. Hierfür wurden detaillierte Arbeitsanleitungen sowohl für die Probengewinnung und Durchführung der Interviews durch die Feldarbeiter, als auch für die Arbeiten im Labor entworfen. Trotzdem kann es zu lokalen Unterschieden zwischen den einzelnen teilnehmenden Ländern kommen, v.a. durch verschiedene Arten der Hofhaltung oder länderspezifische Unterschiede der Labore. Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich Daten des deutschen Studienarms verwendet, die dadurch in sich homogener sind, auch wenn dies zwangsläufig mit geringeren Fallzahlen einhergeht.

Das Studiendesign wurde in allen beteiligten Ländern von den lokalen Ethikkomitees für Studien am Menschen gebilligt.

## **5.2 Methoden**

Für Stimulationsansätze zur Bestimmung der Zytokinproduktion stehen als Material grundsätzlich Vollblut und isolierte periphere mononukleäre Zellen (PBMC) zur Verfügung.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Vollblut das geeignetere Milieu für in vitro-Versuche darstellt, da PBMCs aus ihrer natürlichen Umgebung entfernt sind und daher wichtige regulierende Faktoren der Zytokinproduktion fehlen [93, 94]. Zudem zeigten sich in Vollblut etwas geringere interindividuelle Schwankungen in den Zytokinantworten [93, 95], und eine insgesamt höhere Produktion von Zytokinen wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , die unter anderem in dieser Arbeit gemessen wurden [93]. Es zeigte sich außerdem, dass das Zellüberleben abhängig von der Plasmakonzentration und darin enthaltener Elemente ist, was wiederum für die Verwendung von Vollblut im Gegensatz zu PBMCs spricht [94]. Bei Vorliegen großer Probenzahlen stellt die Verwendung von Vollblut außerdem eine schnelle und kostengünstige Methode dar [96]. Da es sich bei Vollblut um ein Probenvolumen mit unbekannter Anzahl an zytokinproduzierenden Zellen handelt, wurde in dieser Studie von jeder Probe ein Differentialblutbild angefertigt und die gemessene Zytokinkonzentration auf die Leukozytenzahl bezogen, um die interindividuellen Unterschiede aufgrund der Leukozytenzahl zu minimieren [95].

Zur Detektion von Zytokinen hat sich die vorherige Zellstimulation bewährt. Hierfür kommen verschiedene Stimulantien in Frage, die je nach Art und Stimulationsdauer verschieden hohe Zytokinkonzentrationen hervorrufen können [97]. Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Stimulantien verwendet: Staphylokokkenenterotoxin B (SEB), Lipopolysaccharid (LPS), und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat/Ionomycin (PI). Dabei stellt SEB ein Modellstimulans für grampositive Bakterien [98, 99] und LPS für gramnegative Bakterien [93, 100] dar - einer physiologischen Stimulation entsprechend. Zu Bedenken ist allerdings die Endotoxin-Toleranz, eine verminderte Stimulierbarkeit von Monozyten und Makrophagen bis zu 24 h nach Kontakt mit Endotoxin (wie LPS), was zu einer verminderten Zytokinproduktion führen kann [101].

PI stellt einen nicht natürlichen Stimulus dar, der jedoch schon in zahlreichen Studien Anwendung fand. Ionomycin erhöht die intrazelluläre Calciumkonzentration, was zusammen mit der durch PMA hervorgerufenen Aktivierung der Proteinkinase C wie eine extrazelluläre Antigenstimulation wirkt und zur vermehrten Genexpression und somit Proteinsynthese in T-Zellen führt. Die gemessenen Zytokinkonzentrationen müssen allerdings kritisch beurteilt werden, da PI keinen T-Zell-spezifischen Stimulus darstellt, sondern auch die Zytokinproduktion in Monozyten, dendritischen Zellen und NK-Zellen induziert, was zu falsch hohen Zytokinwerten führen kann [102-104].

Alle in dieser Studie verwendeten Stimulantien wurden zentral im Marburger Labor hergestellt, auf die Endkonzentration verdünnt und aliquotiert, um durch ein standardisiertes Herstellungsverfahren laborspezifische Schwankungen in den einzelnen Studienzentren zu vermeiden. Bezüglich der Dosierung der Stimulation mit LPS konnte auf Endotoxindaten der ALEX-Studie zurückgegriffen werden [105].

Auch hinsichtlich des Stimulationsansatzes wurde nach einem festen Schema vorgegangen. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, um durch Bildung der Mittelwerte möglichst genaue Daten zu erhalten. Die 24-well-Platten wurden in den Randspalten mit PBS und Medium befüllt, um für die inliegenden Spalten gleiche Umgebungsbedingungen zu schaffen. Die Stimulation verlief nach einem standardisierten Schema: zuerst wurden die Reihen 2 und 3 befüllt, und zwar in der Reihenfolge Medium – LPS – SEB – und PI. Wenn genug Lithium-Heparin-Blut vorhanden war, wurden die Reihen 1 und 4 (für die Doppelbestimmungen) nach dem gleichen Schema befüllt. Die Zytokinmessungen aus den gewonnenen Überständen wurden wiederum zentral in Marburg durchgeführt, um eine standardisierte Messung zu gewährleisten.

Die jeweilige Zytokinkonzentration ist abhängig von der Stimulationsdauer [97]. Ideal wäre die Messung zum Zeitpunkt der höchsten Zytokinkonzentration, welcher sich allerdings zwischen den einzelnen Zytokinen und je nach verwendetem Stimulans unterscheidet. So konnte zum Beispiel in Studien gezeigt werden, dass IFN- $\gamma$  und IL-5 (nach Stimulation mit SEB) die höchsten Konzentrationen nach 48 h aufweisen [96], im Vergleich zu Bestimmungen nach 24h und 72 h. Durch verschiedene Versuche im Vorfeld dieser Studie, konnte gezeigt werden, dass für alle hier untersuchten Zytokine eine ausreichende Synthese nach 24 h und 48 h vorliegt.

Bei der Auswahl der zu messenden Zytokine wurde auf eine Repräsentation der verschiedenen zu untersuchenden Immunantwortwege und auf eine gute Detektierbarkeit im Vollblut Wert gelegt. So fiel die Wahl auf IL-5 (Th2-Antwort), IL-12 und IFN- $\gamma$  (Th1-Antwort), IL-10 (Zytokin der regulatorischen T-Zellen) und TNF- $\alpha$  (Zytokin inflammatorischer Reaktionen).

Für die Messung der Zytokinwerte sind prinzipiell zwei verschiedene Wege möglich. Zum einen die Bestimmung der Zytokine durch Verwendung mono- oder polyklonaler Antikörper, wie es bei ELISA, Durchflußzytometrie oder Fluoreszenzimmunoassay der Fall ist, oder aber die Quantifizierung der mRNA-Transkripte. Letztere ist zwar sensitiver und daher ohne vorherige Stimulation möglich, jedoch durch ihren wesentlich größeren Zeit- und

Kostenaufwand gerade für große Probenzahlen wie in der vorliegenden Studie eher nachteilig [106]. Die hier verwendete Methode der Enzyme-linked-immunosorbent-assays (ELISA) stellt eine gut etablierte und viel angewendete Methode in der Zytokinbestimmung dar, die zudem zeitsparend, kostengünstig und daher für große Probenvolumen bestens geeignet ist [107-110], wenngleich die Bestimmung mittels Durchflußzytometrie den Vorteil der gleichzeitigen Messung verschiedener Zytokine und ihre Zuordnung zum sezernierenden Zelltyp geboten hätte.

Obwohl für TNF- $\alpha$  eine teils schlechte Nachweisbarkeit mittels ELISA beschrieben wurde [111], lag bei Überprüfung unserer Daten die Anzahl der nicht detektierbaren Meßwerte für TNF- $\alpha$  ähnlich hoch wie bei den anderen gemessenen Zytokinen, so dass hier kein Nachteil bezüglich der Entscheidung für ELISA als Meßmethode zu erkennen war.

## **5.3 Ergebnisse**

### **5.3.1 Zytokindaten bei Geburt und nach einem Jahr in Bezug zum Bauernstatus**

Auf Stimulation der NBMC und PBMC nach einem Jahr mit den Stimulantien LPS, SEB und PI ergaben sich für alle Zytokine zahlreiche Nullwerte mittels ELISA-Messung. Dies konnte auch in anderen Studien beobachtet werden. So gelang van der Velden et al weder nach Stimulation mit Mitogenen, noch mit Allergenen der Nachweis von IL-5 mittels ELISA [112]. Bei von Yaqoob et al lagen ebenso zahlreiche Zytokinwerte unterhalb der Nachweisgrenze [95].

Andererseits zeigten Studien von Rowe und Sharp sogar eine erhöhte IL-5-Produktion in NBMC nach Stimulation mit Mitogenen und mikrobiellen Antigenen [113, 114].

Es gilt zu bedenken, dass Zytokinwerte interindividuellen Schwankungen unterliegen, die unabhängig von den verwendeten Stimulantien oder den Stimulationszeiten sind [95, 115, 116]. Als Erklärung hierfür kann das Vorhandensein möglicher Polymorphismen in den für die Regulierung der Zytokinsekretion zuständigen Genen dienen [95].

In einer Studie von Sullivan Dillie et al konnte eine Jahreszeitenabhängigkeit der IL-5-Konzentration beobachtet werden [117]. In dieser Studie wurde ebenfalls PI als Stimulans verwendet, zudem noch SAC und PHA. Die Zytokinkonzentrationen von unter anderem IFN-

$\gamma$ , IL-10 und IL-5 wurden mittels ELISA gemessen. Dabei lagen die PHA-induzierten IL-5-Antworten im Frühling und Sommer um 50% höher als im Herbst und Winter [117], was eventuell mit einer gesteigerten Pollenbelastung oder anderen Umweltfaktoren während einer Schwangerschaft in der ersten Jahreshälfte erklärt werden kann [118-121]. Die hier vorliegenden Daten wurden das ganze Jahr über gesammelt, so dass sich Jahreszeitenunterschiede insgesamt ausgleichen sollten. Eine Beeinflussung dadurch kann allerdings nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden.

Zudem konnten Sullivan Dillie et al zeigen, dass Klumpenbildung in den Nabelschnurblutproben und eine Zeitdauer von mehr als 12 h bis zur Weiterverarbeitung der Proben niedrigere Medianwerte für IL-5 (Stimulation mit PHA) und erhöhte für IL-10 (Stimulation mit SAC) ergaben [117]. Trotz sorgfältiger Abnahme- und Versandtechniken der in unserer Studie gewonnenen Blutproben, kann auch ein Einfluss diesbezüglich nicht letztlich ausgeschlossen werden, da zwischen Gewinnung der Proben und Weiterverarbeitung aufgrund der teilweise weiten Entfernungen der untersuchten Studienregionen und aufgrund mangelnder Versandmöglichkeiten nach Geburten in der Nacht unterschiedlich lange Zeiträume lagen, allerdings galt für alle Proben ein maximales Weiterverarbeitungs-Zeitfenster von 24 Stunden, das streng eingehalten wurde.

Zum Zeitpunkt der Geburt lagen im Nabelschnurblut für alle Stimulantien mehr Zytokinwerte im nicht-detektierbaren Bereich als dies im peripheren Blut nach einem Jahr der Fall war. Besonders wenige positive Werte fanden sich für IL-5 und IL-12 bei Geburt. Eine Ausnahme bildete IL-5 auf Stimulation mit PI (24 h und 48 h), für das sowohl bei Geburt, als auch nach einem Jahr deutlich mehr detektierbare Werte vorlagen als nach Stimulation mit SEB oder LPS. Die Schwankungen in der IL-5-Produktionskapazität könnten - wie oben bereits beschrieben - stimulantienabhängig [112-114], die insgesamt niedrigere Zytokin-Produktionskapazität zum Zeitpunkt der Geburt in der Unreife des kindlichen Immunsystems begründet sein [122].

Bei Betrachtung der Zytokin-Mediane in Hinblick auf den Bauernstatus zeigten sich keine Unterschiede in der Anzahl der nicht-detektierbaren Werte zwischen Bauern- und Nicht-Bauernkindern. Auch die deutlich höhere Anzahl detektierbarer IL-5-Werte bei Geburt auf Stimulation mit PI (im Gegensatz zu SEB oder LPS) – mit Steigerung nach einem Jahr - konnte in beiden Gruppen gesehen werden.



Die weiteren Berechnungen wurden nur noch mit den positiven Zytokin-Messwerten durchgeführt, da sonst sehr viele Mediane mit Null-Werten vorgelegen und damit gegebenenfalls zu unzureichend interpretierbaren Ergebnissen geführt hätten.

Bei Betrachtung der Höhe der einzelnen Zytokin-Mediane in Abhängigkeit vom jeweiligen Stimulans, fielen einige signifikante Unterschiede zwischen den Geburts- und den 1-Jahres-Daten auf. Insgesamt ließ sich feststellen, dass es im Laufe des ersten Lebensjahres zu einem Anstieg fast aller Zytokinmediane kam, mit Ausnahme von IFN- $\gamma$  (LPS und SEB) und TNF- $\alpha$  (SEB).

Auch Kawamoto et al konnten bereits eine positive Korrelation des Zytokinprofils (sowohl Th1-, als auch Th2-Zytokine) mit dem Alter aufzeigen. Ebenso konnten sie keine Unterschiede in der Th2-Gewichtung zum Zeitpunkt der Geburt in Abhängigkeit von der späteren Allergieentstehung feststellen. Die höheren Werte der Th2-gewichteten Zytokine bei Allergieprädisposition stellten sich erst nach der Geburt heraus [123]. Dies würde in Einklang mit den hier präsentierten Daten stehen.

### **5.3.1.1 TNF- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  zeigte bei Geburt eine vergleichbar hohe Anzahl positiver Werte wie IFN- $\gamma$ , nach Stimulation mit LPS sogar eine höhere als diese.

Die Höhe der gemessenen TNF- $\alpha$ -Medianwerte zeigte sich zum Zeitpunkt der Geburt und nach einem Jahr eher hoch, mit den höchsten Werten nach Stimulation mit PI. Nach Stimulation mit LPS (24h) stiegen die Mediane im ersten Lebensjahr sogar signifikant an. Insgesamt befanden sich die TNF- $\alpha$ -Mediane zum Zeitpunkt der Geburt unter denen von IFN- $\gamma$ . Nach einem Jahr galt dies jedoch nur noch nach Stimulation mit LPS (24 und 48 h) und SEB (24h), während nach Stimulation mit SEB (48h) und PI (24 und 48h) TNF- $\alpha$  höhere Werte erreichte.

Die aktuelle Studienlage zeigt, dass TNF- $\alpha$  ganz unterschiedliche Funktionen hat und sowohl allergieprotektiv, als auch allergiefördernd wirken kann: So kann TNF- $\alpha$  eine Induktion der IL-12-Produktion Dendritischer Zellen (Th1-Gewichtung) und eine Steigerung der Phagozytose- und Zytotoxizitätsfähigkeit von Neutrophilen und Makrophagen bewirken [124, 125], andererseits kann es Gewebeschäden durch chronische Entzündungen, wie sie bei allergischen Erkrankungen wie Asthma vorliegen, noch verstärken [125, 126].

In der Literatur wird zudem eine toxische Wirkung des TNF- $\alpha$  auf die Plazenta beschrieben [127]. Niedrige Konzentrationen bei Geburt könnten daher auch als Voraussetzung für eine erfolgreiche Schwangerschaft gesehen werden [128]. Hohe TNF- $\alpha$ -Konzentrationen, wie sie in dieser Arbeit gesehen wurden, zeigten sich allerdings auch in einigen anderen Untersuchungen [129, 130]. Hier wurde der vaginale Geburtsmodus als eine Form der Inflammation angesehen, die eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Produktion des mütterlichen und kindlichen Immunsystems erklären kann [129].

### **5.3.1.2 IL-10**

IL-10, ein Th2-Zytokin mit TH1-hemmender Wirkung gehört einerseits zu den allergiefördernden Zytokinen [131], andererseits stellt es aber auch ein von Treg-Zellen produziertes Zytokin dar [18, 132], das durch Herunterregulierung der monozytären Antigenpräsentation [133] und Hemmung der Antigen-induzierten Proliferation und Zytokinproduktion von Makrophagen, Th1- und Th2-Zellen [134] ausgleichend auf das Th1/Th2-Gleichgewicht wirkt.

Für den Zeitraum der Schwangerschaft sind hohe IL-10-Spiegel - durch Produktion in placentaren Trophoblasten- und Deziduazellen - als Schwangerschafts-protectiv beschrieben worden. Diese These wird auch durch den Nachweis einer verminderten IL-10-Produktion bei späten Aborten untermauert [4, 135, 136].

Im vorliegenden Datensatz lagen die IL-10-Werte bei Geburt nach Stimulation mit SEB und PI eher im niedrigen, nach Stimulation mit LPS im mittleren Bereich und stiegen sämtlich signifikant im ersten Lebensjahr an. Da auch Zellen des angeborenen Immunsystems wie z.B. Makrophagen durch LPS stimuliert werden, könnte - wenn man von der These der Unreife des erworbenen Immunsystems bei Geburt ausgeht [122] - die erhöhte IL-10-Produktion nach Stimulation mit LPS auch auf die Produktion in Zellen des angeborenen Immunsystems zurückzuführen sein [137]. Diese unterschiedlichen IL-10-Produktionswege könnten so die inkonsistente Studienlage bezüglich einer vermehrten [138] bzw. verminderten [139-141] IL-10-Produktion bei Geburt erklären.

### **5.3.1.3 IL-12**

Die Werte für IL-12 fielen allesamt sehr niedrig aus, es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der Zytokine bei Geburt und nach einem Jahr gezeigt werden.

Bezüglich der IL-12-Produktion durch die NSBC zeigte sich bei Gabrielsson et al eine deutlich niedrigere Produktionsrate nach Mitogen-Stimulation als nach Stimulation mit Allergenen [142], wie sie auch in der vorliegenden Arbeit nach Stimulation mit mikrobiellen Stoffen beobachtet werden konnte. IL-12 gehört zu den Th1-Zytokinen. Es unterdrückt eine überschießende IgE-Produktion und allergische Entzündungsreaktionen durch Induktion der Th1-Zelldifferenzierung und -Zytokinproduktion und Unterdrückung einer Th2-Zellantwort [143]. Die bei Prescott et al beschriebene positive Korrelation zwischen IL-12- und IFN $\gamma$ -Antwort [128] konnte in dieser Arbeit nicht gesehen werden.

### **5.3.1.4 IL-5 und IFN- $\gamma$**

Die IL-5-Werte bei Geburt und nach einem Jahr fielen erstaunlich niedrig aus – vereinbar mit Ergebnissen von Prescott et al [144] - allerdings mit einer signifikanten Steigerung im ersten Lebensjahr nach Stimulation mit SEB (48h) und PI (24 und 48h). Diese Steigerung könnte durch die zunehmende Reife des erworbenen Immunsystems im ersten Lebensjahr erklärt werden, das auf Stimulation mit SEB und PI nun effektiver reagieren kann als noch bei Geburt [122, 137]. Die Reifung erfolgt unter anderem durch die postnatale Exposition mit vielfältigen inhalativen und nutritiven Allergenen und mikrobiellen Stoffen der Umwelt [30, 95, 119, 145].

Bei generell hohen Geburtswerten für IFN- $\gamma$  fielen nach Stimulation mit PI nochmals höhere IFN- $\gamma$ -Werte nach einem Jahr auf (signifikant nur für 48h). Nach Stimulation mit LPS und SEB dagegen lagen die 1-Jahres-Werte alle signifikant niedriger. Möglicherweise erklären sich die höheren Werte nach Stimulation mit PI durch eine gleichzeitige Aktivierung von Monozyten durch dieses Stimulans [146] und eine daraus resultierende vermehrte monozytäre IFN- $\gamma$ -Produktion.

Bei Betrachtung der Ergebnisse für IFN- $\gamma$  und IL-5 verwundert zunächst die Verteilung und Höhe der Th1- und Th2-gewichteten Zytokine, da in zahlreichen anderen Studien nach

Stimulation von NBMC vermehrt Th2-Zytokine (wie IL-5) bei verminderter Produktion von TH1-Zytokinen (wie IFN- $\gamma$ ) gemessen wurden [25, 147, 148], während in dieser Arbeit die Mediane der positiven IL-5-Werte unter denen der IFN- $\gamma$ -Werte lagen – noch dazu bei einer sehr geringen absoluten Anzahl positiver IL-5-Werte nach Stimulation mit SEB und LPS. Die Th2-gewichtete Immunitätslage bei Geburt [149], die einige Autoren durch den Einfluss einer Allergenexposition in utero mit nachfolgender Th2-Polarisierung erklärten [147, 149], konnte hier nicht beobachtet werden. Ebenso wenig bestätigte sich die These, dass eine Th2-Polarisierung der uteroplazentaren Einheit und des Fetus physiologisch sei und den Erhalt der Schwangerschaft garantiere [150], indem sie durch Unterdrückung einer Th1-Antwort die mütterliche Plazenta vor toxischen Einflüssen des IFN- $\gamma$  schütze [22, 151].

Möglicherweise erklärt sich die in Studien beobachtete unterschiedlich hohe IFN- $\gamma$ -Produktionskapazität der NBMC durch die verschiedenen verwendeten Stimulantien. So fiel in Stimulationsansätzen von Kondo et al [152] und Warner et al [153] eine verminderte IFN- $\gamma$ -Produktion nur bei Verwendung von Nahrungsmittelallergenen, nicht aber bei anderen Allergenen auf. Die hier verwendeten polyklonalen Stimulantien aktivieren sowohl die angeborene (SEB, LPS) als auch die erworbene (SEB, PI) Immunabwehr. IFN- $\gamma$  wird hauptsächlich von Th1-Zellen der erworbenen Abwehr gebildet. Wenn man von einer gewissen Unreife des kindlichen Immunsystems bei Geburt ausgeht [122], würde man allerdings eine erniedrigte Expression nach Stimulation mit PI erwarten [25, 147, 148, 154, 155]. In vorliegender Arbeit ist sie aber deutlich höher als nach Stimulation mit Aktivatoren der angeborenen Abwehr wie LPS und SEB. Zudem konnte im ersten Lebensjahr ebenfalls nach Stimulation mit PI ein IFN- $\gamma$ -Anstieg beobachtet werden – wie auch schon in zahlreichen anderen Arbeiten zuvor [154, 156, 157] -, so dass sich die Frage stellt, ob PI an sich möglicherweise ein potenterer Stimulator ist und ob es als reines in vitro-Stimulans eventuell nur eine eingeschränkte Aussagekraft besitzt.

Für die insgesamt unerwartet hohen IFN- $\gamma$ -Werte bei Geburt - mit Abfall nach einem Jahr nach Stimulation mit SEB und LPS-, könnte auch als Erklärung dienen, dass zum Zeitpunkt der Messungen im Nabelschnurblut noch größere Mengen an durch die Trophoblasten der Plazenta produziertem IFN- $\gamma$  vorlagen, die gar nicht die kindliche Produktionskapazität darstellten [21, 158]. Zudem kommt es wohl bei vaginaler Entbindung (die bei über 75% der hier untersuchten Kinder vorlag) zu einer vermehrten Produktion inflammatorischer Zytokine, unter anderem IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  [129], die bis zu vier Tagen nach der Entbindung erhöht bleiben können [129, 130]. Möglicherweise stellen erhöhte IFN- $\gamma$ -Werte unter der Geburt

auch einen Schutz von Mutter und Kind vor Viren und mikrobiellen Stoffen dar [159, 160], allerdings zeigten nicht alle Studien erhöhte Werte in diesem Zusammenhang [161, 162].

### **5.3.1.5 Einfluss des Bauernstatus**

In Studien konnten hohe Konzentrationen von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  im Nabelschnurblut mit einer späteren geringeren Allergieentwicklung assoziiert werden [21]. Solche Assoziationen wurden bevorzugt im Bauernmilieu bzw. beim Leben in ländlicher Umgebung beobachtet, die eine hohe Exposition mit mikrobiellen Stoffen wie z.B. Endotoxin bieten [163-165]. So wiesen auch Gereda et al eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Konzentration im peripheren Blut von Bauernkindern im 9. bis 24. Lebensmonat nach sowie eine Assoziation zu erhöhter Endotoxinexposition [166]. Diese Beobachtungen könnten auch auf die der Arbeit zugrundeliegende Studienpopulation zutreffen, die sämtlich aus ländlichen Regionen, zur Hälfte sogar von Bauernhöfen stammt. Bei Betrachtung der IFN- $\gamma$ -Werte in Abhängigkeit vom Bauernstatus, fielen bei den Bauern zum Zeitpunkt der Geburt signifikant (für SEB, 24h) höhere Medianwerte als bei den Nicht-Bauern auf, mit weiterer Erhöhung auf allerdings ähnlich hohe Werte für Bauern und Nicht-Bauern im ersten Lebensjahr (v.a. nach Stimulation mit PI). Die bei Geburt signifikant erhöhten IFN- $\gamma$ -Werte (SEB, 24h) der Bauernkinder könnten einen allergieprotektiven Charakter haben [30, 112, 152, 153, 167-169] und möglicherweise auf eine erhöhte Endotoxinkonzentration im Lebensumfeld der schwangeren Mütter zurückzuführen sein [12, 163], sowie auf andere Einflußfaktoren im Bauernumfeld wie Frischmilchkonsum [170, 171], Halten von Haustieren [56, 172, 173] oder regelmäßigen Umgang mit Stalltieren [89].

Die im NSB der Bauern im Vergleich zu Nicht-Bauern gemessenen tendenziell signifikant höheren Werte für IFN- $\gamma$  (P/I 48h), IL-5 (SEB 48h) und IL-12 (SEB 24h) deuten eine überwiegende Th1-Dominanz der Bauernkinder an (IFN- $\gamma$ , IL-12) und weisen zudem auf eine insgesamt höhere Zytokinproduktionskapazität (Th1- und Th2-Zytokine wie IL-5) hin, wie sie schon bei Rojonen et al für Bauernkinder beschrieben wurde [173].

Die geringere Exposition der Nicht-Bauern-Kinder gegenüber oben genannten Umwelt- und v.a. Bauernhoffaktoren [171] könnten die hier beobachteten signifikant höheren IL-10-Werte (SEB, 48h) und die tendenziell erhöhten TNF- $\alpha$ -Werte (P/I 24h) im Gegensatz zu den Bauernkindern erklären. Eine Assoziation diesbezüglich konnte in mehreren Studien gezeigt

werden [113, 114, 174, 175]. Allerdings sind hohe TNF- $\alpha$ -Werte nicht zwangsläufig mit einem erhöhten allergischen Risiko verbunden, so finden sich auch Studien, die einen protektiven Effekt von TNF- $\alpha$  auf atopische Erkrankungen zeigten [21, 176, 177]. Interessanterweise trat keiner der (tendenziell) signifikanten Unterschiede bezüglich des Bauernstatus nach Stimulation mit LPS auf, sondern hauptsächlich nach Stimulation mit SEB und PI.

Für die 1-Jahres-Zytokindaten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in beiden Gruppen, was verwundert, wenn man von einer niedrigeren Allergieprädisposition bei den Bauernkindern mit Verschiebung des Zytokinprofils in Richtung einer verstärkten Th1-Antwort ausgehen würde, wie es vielfach beschrieben wurde [178-181]. Bei Betrachtung der Zytokinmessungen der ALEX-Studie [164] – deren Probanden mit 6-12 Jahren allerdings weitaus älter waren - wurden bei den Bauernkindern im Vergleich zu den Nicht-Bauernkindern zwar ähnlich hohe Werte für IL-10 und IL-12, allerdings signifikant niedrigere Werte für IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  gemessen. Zudem wurden nach Stimulation mit SEB (72h) in beiden Gruppen TNF- $\alpha$ -Werte nahe Null gemessen, in unserer Studie dagegen waren diese nach 48h deutlich positiv und in beiden Gruppen gleich hoch. Ähnliche Ergebnisse beider Studien zeigten sich daher nur für IL-10, mit höheren Zytokinwerten nach Stimulation mit LPS (24h) als nach SEB (72 h ALEX, 48 h PASTURE) und gleich hohen Werten für IL-12.

Beim Zusammenfassen der 24h- und 48h-Zytokinwerte galten diejenigen Probanden als Responder, bei denen zu wenigstens einem Zeitpunkt (24h und/oder 48h) ein detektierbarer Zytokinwert vorlag. Es wurde die Anzahl der Responder sowohl zum Zeitpunkt der Geburt als auch nach einem Jahr angegeben, wobei auffiel, dass auch nach Zusammenfassen der 24h- und 48h-Werte die Anzahl der positiven Zytokinwerte bei Geburt allesamt signifikant bzw. tendenziell signifikant (mit Ausnahme von IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit LPS) unter denen der 1-Jahres-Werte lagen, was wiederum die Theorie der Unreife des kindlichen Immunsystems untermauern könnte [122]. Bei Betrachtung in Hinsicht auf den Bauernstatus war lediglich der nun um 50% höher liegende IL-10-Responderanteil der Nicht-Bauernkinder im Vergleich zu den Bauernkindern auffallend.

### 5.3.2 Entwicklung vom Non-Responder- zum Responderstatus im ersten Lebensjahr

Für die weiteren Berechnungen wurde die Entwicklung des Geburts-Responderstatus im ersten Lebensjahr dargestellt. Hierbei muss bedacht werden, dass die Gesamtfallzahlen etwas geringer sind als bei getrennter Betrachtung der Geburts- und 1-Jahresdaten, da nur Probanden verwendet werden konnten, für die zu beiden Messzeitpunkten Daten vorlagen. Die Anzahl der Responder bei Geburt verringerte sich so im Schnitt um 8%, die der Non-Responder um 11 %.

Von den Respondern bei Geburt waren nach einem Jahr nur für IL-5 (PI) alle Probanden immer noch Responder. Zu mehr als 90% Responder blieben sie für IL-10 (alle Stimuli), IFN- $\gamma$  (PI) und TNF- $\alpha$  (LPS und PI). Auffallend weniger Responder nach einem Jahr zeigten sich für IL-5 (LPS), allerdings lag hier die Fallzahl nur bei n=6. Ebenso lag die 1-Jahres-Responderrate für die Geburtsresponder von IL-12 (LPS) nur bei 45,5%, wohingegen sie nach Stimulation mit SEB und PI knapp 70% betrug. Auch für IFN- $\gamma$  fanden sich nach Stimulation mit LPS nach einem Jahr nur noch 50% bestehende Responder, während es nach Stimulation mit SEB und PI 88,5% bzw. 95% waren. Interessanterweise zeigten sich insgesamt gesehen die höchsten Responderraten nach Stimulation mit PI und SEB, während diese auf Stimulation mit LPS deutlich schlechter ausfielen.

Auch Betrachtungen der Entwicklung der Geburts-Non-Responder zu Respondern im ersten Lebensjahr zeigten weitestgehend diese Tendenz: Nach Stimulation mit LPS zeigten sich nur geringe Konversionsraten für IL-5 (39,3%), IL-12 (35%) und IFN- $\gamma$  (36,5%). Eine 100%ige Konversionsrate fiel für IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit PI, sowie für IL-10 nach Stimulation mit SEB, aber auch mit LPS auf. Über 90% der Probanden konvertierten bezüglich IL-10 nach PI- und TNF- $\alpha$  nach LPS- und PI-Stimulation.

Die insgesamt eher niedrigeren 1-Jahres-Responderzahlen auf LPS könnten eventuell mit der schon in anderen Studien beschriebenen Endotoxin-Toleranz zusammenhängen [101], die nach Prästimulation mit Endotoxin bzw. LPS (prä- oder postnatal) eintritt und zu einer verminderten Aktivierbarkeit der Zytokinproduktion von v.a. TNF- $\alpha$ , aber auch IL-10 und IL-12 führt [182]. So zeigte auch die ALEX-Studie diese inverse Korrelation der Zytokinproduktion mit steigenden Endotoxinwerten im Matratzenstaub von Kinderbetten [164].

### 5.3.3 Einflussfaktoren der Responderentwicklung im ersten Lebensjahr

Für die folgende Betrachtung möglicher Einflußfaktoren auf die Entwicklung des Zytokinsekretionsmusters im ersten Lebensjahr wurde lediglich die Gruppe der Non-Responder bei Geburt untersucht, die im ersten Lebensjahr zum Responder konvertierte. Aufgrund der sich daraus ergebenden geringen Fallzahlen war eine weitere Unterteilung in Bauern und Nicht-Bauern nicht mehr sinnvoll. Nach Vorliegen der PASTURE-Datensätze aus allen Ländern könnte dies am daraus resultierenden größeren Probandenkollektiv untersucht werden. Ebenso konnten wegen zu geringer Responder- bzw. Non-Responderzahlen nach einem Jahr folgende Zytokine für die weiteren Berechnungen nicht berücksichtigt werden: IL-10 (alle Stimulantien), IFN- $\gamma$  (PI) und TNF- $\alpha$  (PI und LPS).

Für die verbleibenden Zytokine wurde die Konversionsrate vom Non-Responder bei Geburt zum Responder nach einem Jahr in Bezug auf Ernährungs- und Gesundheitseinflüsse des Kindes im ersten Lebensjahr und der Mutter in Schwangerschaft und Stillzeit, aber auch bezüglich zahlreicher Umwelteinflüsse in diesen Zeiträumen betrachtet.

Ein signifikanter Zusammenhang wurde für  $p < 0,05$  festgelegt. Hierfür fanden sich zahlreiche signifikante Ergebnisse, wobei generell zu bedenken gilt, dass bei einer hohen Testzahl wie in der vorliegenden Arbeit die Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  von 5% relevant werden kann.

Trotzdem wurde bewusst auf Berechnungen für Multitestung verzichtet, da auch schwache Assoziationen zwischen den einzelnen Einflußfaktoren und der Responderkonversion im ersten Lebensjahr zunächst nicht übersehen werden sollten. In einem nächsten Schritt und mit den größeren Fallzahlen der gesamten PASTURE-Studienpopulation aus allen beteiligten Ländern könnten solche Berechnungen durchgeführt werden. Das gleiche gilt für die Adjustierung auf potentielle Confounder bezüglich der in dieser Arbeit dargestellten signifikanten Assoziationen zwischen den verschiedenen Einflußfaktoren und der Responderkonversion im ersten Lebensjahr. Die Ergebnisse diesbezüglich sind aufgrund der sehr geringen Fallzahlen nur mit eingeschränkter Aussagekraft zu verwerten und sollten ebenfalls im größeren Probandenkollektiv nochmals untersucht werden.

Die Betrachtung der Korrelationen zwischen den verschiedenen Einflußfaktoren und einer Responderkonversion im ersten Lebensjahr soll im Folgenden thematisch geordnet diskutiert werden.

Schon in zahlreichen Studien wurde der Einfluss äußerer Faktoren auf die Zytokinproduktion untersucht [95, 119]. Das sensible Fenster für diese Einflüsse wurde zunächst für die frühe Kindheit beschrieben, in der auch bevorzugt die T-Zell-Sensibilisierung auf Umweltallergene



stattfindet [30, 145]. In weiteren Studien fiel eine schon in utero bestehende deutliche T-Zellprägung des Fetus auf [106, 149, 183-186], die nachfolgend das Augenmerk auf Einflüsse der Mutter in der Schwangerschaft richtete. Besonders im Zeitraum um die 22.

Schwangerschaftswoche scheinen die fetalen Zellen auf Umweltallergene reagieren zu können [147]. So konnten Mariani et al erhöhte IgG-Antikörper-Antworten gegen viele inhalative Antigene im Nabelschnurblut nachweisen [187]. Szepfalusi et al konnten in einem menschlichen Perfusionsmodell den Transfer nutritiver und inhalativer Allergene durch die Plazenta aufzeigen [188]. Dies könnte den in einigen Studien beschriebenen protektiven Effekt einer Probiotika- [83] und  $\omega$ -3-Fettsäuren-Supplementation [189] in der Schwangerschaft auf die spätere Allergieentstehung des Kindes erklären [190]. Allerdings finden sich auch Studien, die keine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen einer Allergen-Exposition in der Schwangerschaft und der Reaktivität der NBMC zeigten [191], was durch den Nachweis einer Antigen-Kumulation in der Plazenta erklärt werden könnte [192]. Vielmehr schien in der Studie von Szepfalusi die geringe Menge an Antigenen, die die Plazentaschranke letztlich überschritten, für die Ausbildung einer Th2-polarisierten Immunantwort verantwortlich zu sein [193], die wiederum einen hemmenden Effekt auf die Bildung von Th1-Zytokinen hatte.

### **5.3.3.1 Schulbildung der Eltern**

Unter den IL-5-Non-Respondern bei Geburt fanden sich wesentlich mehr Kinder, deren Eltern einen Haupt- oder Realschulabschluss hatten, nur wenige Eltern hatten Abitur oder sogar einen Hochschulabschluss. Die Kinder von Letzteren wiesen signifikant niedrigere Responderraten für IL-5 nach einem Jahr auf. Diese Ergebnisse verwundern insofern, da ein höherer sozioökonomischer Status eine verstärkte Th2-Dominanz und damit erhöhte IL-5-Werte erwarten lassen würde [194]. Die Populationsbeschreibung dieser Studie zeigt, dass niedrigere Schulabschlüsse signifikant häufiger bei den Bauern als bei den Nicht-Bauern vorliegen. Das Leben der Bauern wiederum ist geprägt durch einen meist naturbezogeneren Lebensstil mit Verzehr hofeigener Produkte und Aufenthalt in Ställen und in der Nähe von Tieren, was im Allgemeinen mit einer erhöhten Allergenexposition einhergeht [163, 165, 195, 196]. Es könnte aber eventuell auch die bei Duramad et al. gezeigte schwache Assoziation zwischen erhöhten IL-5-Werten und dem Vorkommen von Nagetieren im Haus - die bei einem naturbezogeneren Leben mit Tierhaltung vermutlich vermehrt vorkommen - eine

mögliche Erklärung für den in dieser Studie gezeigten Zusammenhang zwischen niedrigem Schulabschluss und erhöhter IL-5-Produktionskapazität darstellen [197].

### **5.3.3.2 Ernährung von Mutter und Kind**

Die Exposition mit verschiedenen Allergenen führt zu einer Stimulation des Immunsystems und kann so im Falle einer erhöhten Th2-Zell-Antwort zur Entstehung allergischer Erkrankungen beitragen [1, 198-201].

Allerdings kommt auch noch anderen Einflußfaktoren hierbei eine Bedeutung zu. So wird die genetische Prädisposition von einigen immer noch als der Hauptrisikofaktor für die Entstehung allergischer Erkrankungen gesehen, die zusammen mit Umwelteinflüssen im Sinne einer multifaktoriellen Genese zur Krankheitsentstehung beiträgt [202, 203].

Individuelle Unterschiede in der T-Zell-Antwort auf das gleiche Allergen (bzw. seine Epitope) sind somit vom HLA-Typ des Individuums abhängig und den daraus resultierenden verschiedenen Möglichkeiten, die HLA-Bindungsproteine der Epitope zu erkennen [204].

Aber auch der Zeitpunkt der Allergenexposition spielt wohl eine Rolle. So zeigten einige Studien einen pränatalen Einfluss von durch die Mutter aufgenommenen Nahrungsmittelallergenen auf die postnatale Allergieentstehung des Kindes [185, 205, 206], andere wiederum sahen keinen Einfluss [118, 185, 207, 208] oder sahen einen Zusammenhang mit der aufgenommenen Allergenmenge [209]. Der Einfluss der Höhe der Allergenexposition auf die Ausbildung des Zytokinmusters konnte auch bei Friedmann et al gesehen werden [210]. Untersuchungen im Mausmodell zeigten sogar den Einfluss der Höhe co-stimulierender Faktoren wie z.B. LPS auf die Immunantwort mit Ausbildung eines Th1-gewichteten Zytokinprofils bei Stimulation mit hochdosiertem LPS und Th2-Gewichtung bei niedrigdosiertem Stimulans [211].

Auch der Einfluss der durch die Mutter in der Stillzeit aufgenommenen Allergene auf die Entstehung allergischer Erkrankungen beim Kind wurde vielfach untersucht. Hier konnten Zeiger et al eine Assoziation von Nahrungsmittelrestriktion der Mutter in der Stillzeit und einem geringeren Auftreten von atopischer Dermatitis und Nahrungsmittelallergien beim Kind nachweisen [212], eine andere Studie dagegen zeigte keinen allergiepräventiven Effekt durch Allergenvermeidung der Mutter in der Stillzeit [208].

In der Isle-of-Weight-Studie, die den Einfluss einer Nahrungsmittelallergenvermeidung von Kindern im ersten Lebensjahr untersuchte, wurde zwar eine erhöhte transiente

Sensibilisierung auf die gemiedenen Allergene gesehen, Langzeitbeobachtungen über 8 Jahre ergaben jedoch ein geringeres Auftreten permanenter allergischer Manifestationen [213]. Auch Marini et al konnten erst nach 3 Jahren einen Einfluss der Allergenvermeidung auf die Entstehung allergischer Erkrankungen sehen [214], so dass das erste Lebensjahr für die Untersuchung der Effekte einer Allergenvermeidung durch die Mutter in Schwangerschaft und Stillzeit bzw. durch das Kind im ersten Lebensjahr wahrscheinlich ein zu kurzes Beobachtungszeitfenster bezüglich der Langzeiteffekte darstellt.

Schließlich gilt auch zu bedenken, dass die Exposition mit unterschiedlichen Nahrungsmittelallergenen über den Gastrointestinaltrakt (postnatal) oder systemisch (pränatal) eine parallele Entwicklung verschiedener Th-Subtypen hervorrufen kann, die in der Summe eher Th2- oder aber auch Th1-gewichtet sein können [215, 216], und daher keine eindeutige Aussage über einen allergieprotektiven oder –begünstigenden Charakter der einzelnen Allergene möglich ist.

Diese - zum Teil kontroverse - Studienlage spiegelt sich auch in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wieder. An ernährungsspezifischen Einflußfaktoren zeigten sich signifikante Ergebnisse für die Aufnahme saurer Speisen und Getränke, scharfer Gewürze und Koffein durch die Mutter in der Stillzeit, den Konsum von Fisch und Zitrusfrüchten durch das Kind im ersten Lebensjahr und den Genuss von H-Milch durch das Kind und von Farmmilch durch die schwangere Mutter.

Hierbei ging der Verzicht auf saure Speisen und Getränke durch die Mutter in der Stillzeit mit einer signifikant höheren Konversionsrate zum Responder für IL-5 nach einem Jahr einher, die Responderkonversion für IL-12 dagegen erhöhte sich signifikant bei Verzicht auf scharfe Gewürze und Koffein, wobei die Einnahme von letzterem auch zu einer signifikant höheren TNF- $\alpha$ -Konversion führte. In Studien an erwachsenen Arbeitern in Gewürzfabriken in Südafrika konnte eine Sensibilisierung auf bestimmte (v.a. scharfe) Gewürze gezeigt werden [217]. Eine Vermeidung dieser potentiellen Allergene könnte so einen Schutz vor Sensibilisierung darstellen und das Zytokin-Sekretionsprofil eher in eine Th1-Richtung lenken, in diesem Fall durch eine erhöhte IL-12-Produktion. Die erhöhte Konversionsrate von IL-5 bei Verzicht auf saure Speisen und Getränke lässt einen protektiven Effekt dieser Nahrungsmittel vermuten, bei deren Fehlen ein möglicherweise atopische Erkrankungen begünstigendes Th2-Zytokinmilieu entsteht. Die Gruppe saurer Lebensmittel ist jedoch sehr groß und es fehlen Angaben zu Art und aufgenommener Menge der betreffenden Lebensmittel, so dass diesbezüglich weitere Beobachtungen angestellt werden sollten. In

Hinsicht auf den Koffeinkonsum der stillenden Mütter zeigte sich in der vorliegenden Studie einerseits eine erhöhte Konversion zum Th1-Zytokin IL-12 bei Verzicht auf dieses, andererseits aber auch eine erhöhte Konversion des inflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  bei vermehrtem Konsum. Letzteres geht einher mit Ergebnissen eines japanischen Mausmodells, in dem Kaffee eine inflammatorische Antwort ausgelöst hat [218], gegen ersteres sprechen jedoch Untersuchungsergebnisse aus einem Mausmodell, in dem Kaffee eine Th1-Antwort hervorgerufen hat [219]. Allerdings sind auch hier die genetische Prädisposition der Kinder, mögliche weitere Einflußfaktoren und die Höhe des Kaffeekonsums der Mütter nicht näher betrachtet worden, was zu der inkonsistenten Datenlage beitragen könnte und genauerer Studien bedarf.

Das Vermeiden von Fisch in der kindlichen Ernährung geht in dieser Studie mit einer erniedrigten IL-12-Konversionsrate nach 1 Jahr einher, was die Vermutung nahelegt, dass Fischkonsum durch eine Th1-Zytokin-Gewichtung protektive Eigenschaften besitzen könnte. Die Studienlage hierzu weist unterschiedliche Ergebnisse auf: einerseits konnte der Konsum von öligem Fisch mit einer verminderten Produktion proinflammatorischer Zytokine und einer erniedrigten Prävalenz an kindlichem Asthma in Verbindung gebracht werden, was unter anderem durch den Gehalt an Omega-3-Fettsäuren erklärt wurde [220]. Andererseits zeigte sich Fisch in verschiedenen Studien als Nahrungsmittelallergen, das mit einer erhöhten Rate an allergischen Erkrankungen assoziiert wurde [213]. Das allergisierende Potential wurde unter anderem auf das Vorkommen vielfach ungesättigter Fettsäuren wie Linolsäure zurückgeführt [221].

Auch schon pränatal bestehende Einflüsse durch mütterlichen Fischkonsum in der Schwangerschaft (Daten hierzu wurden in der vorliegenden Studie nicht erhoben) sollten bedacht werden. In der Literatur finden sich hierfür sowohl Daten zum Vorliegen eines erhöhten Allergierisikos durch mütterlichen Fischkonsum [222], als auch Daten, die keinen Einfluss diesbezüglich zeigten [223, 224]. Zur genaueren Interpretation der vorliegenden Ergebnisse wären auch Angaben zu Art und Menge des konsumierten Fisches hilfreich, da z.B. der Linolsäuregehalt je nach Fischart stark schwankt und auch die Menge des aufgenommenen Allergens auf die Ausbildung des Zytokinsekretionsmusters Einfluss nimmt [210].

Der Verzicht des Kindes auf Zitrusfrüchte war mit einer erhöhten Konversion für IFN- $\gamma$  assoziiert. Diese Ergebnisse verwundern zunächst, ging doch in einer britischen Studie der Verzehr von Obst und Gemüse mit einer niedrigeren Prävalenz an Asthma einher, was auf

deren antioxidative Eigenschaften zurückgeführt wurde [225, 226]. Allerdings ergaben Beobachtungen an Frauen, die in der Schwangerschaft Zitrusfrüchte zu sich nahmen, eine positive Assoziation zur Entstehung allergischer Sensibilisierungen [222, 227], so dass in Hinblick auf die Ergebnisse dieser Studie der kindliche Konsum von Zitrusfrüchten ebenfalls als Risikofaktor für eine allergische Sensibilisierung mit geringerer Ausbildung eines Th1-Zytokinprofils gesehen werden könnte.

Bei Betrachtung des Milchkonsums von Mutter und Kind fiel eine verminderte IL-12-Konversionsrate unter den Müttern auf, die in der Schwangerschaft Frischmilch direkt vom Bauernhof tranken, und eine vermehrte IFN- $\gamma$ -Konversion unter den Kindern, die im ersten Lebensjahr H-Milch konsumierten, bei tendentiell signifikant verminderter IL-5- und IFN- $\gamma$ -Konversion bei kindlichem Kuhmilchkonsum direkt vom Bauernhof (Daten s. Anhang Tab. A.8). Diese Ergebnisse verwundern zunächst, da in der Literatur ein allergieprotektiver Effekt für den Konsum von Frischmilch von der Farm beschrieben wurde [88, 228-230], der eher eine Th1-Gewichtung erwarten lassen würde. Als Grund hierfür wird der höhere Gehalt an gramnegativen Bakterien und daher LPS [231] im Vergleich zu pasteurisierter Milch gesehen [232]. Diese mikrobiellen Umweltfaktoren können Antigen-präsentierende Zellen aktivieren und eine TH1-Zell-Polarisation durch die Produktion von unter anderem IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-12 bewirken [233-236]. Andere Erklärungsmodelle für den protektiven Effekt von Milch im Allgemeinen sehen den hohen Gehalt an Milchfetten [237-239] und polyungesättigten Fettsäuren [240], aber auch an trans-Fettsäuren [241] als ursächlich an, die Zytokinproduktion [242] und die Entwicklung allergischer Atemwegserkrankungen zu beeinflussen [243, 244]. Wiederum andere Studien sahen in Milchprodukten jedoch potentielle Nahrungsmittelallergene [245], deren Vermeidung mit einer geringeren Anzahl permanenter allergischer Erkrankungen assoziiert war – allerdings bei erhöhtem Auftreten transienter Erkrankungen [213]. Diese Effekte konnten allerdings nicht in allen Studien bestätigt werden [223, 224]. Die bei Ege et al beschriebene Assoziation von mütterlichem Farmmilchkonsum in der Schwangerschaft und erhöhten spezifischen IgE-Spiegeln gegen Kuhmilchprotein beim Kind lässt dagegen eher eine Th2-Gewichtung des Zytokinsekretionsprofils der Kinder erwarten, was wiederum mit den Ergebnissen unserer Studie einhergehen würde.

Gegensätzliches zeigte sich wiederum in einer Studie von Perkin et al, in der der Verzehr unpasteurisierter Milch – sogar unabhängig vom Farmerstatus – mit einer geringeren Prävalenz an Ekzemen und Atopien, sowie niedrigeren IgE-Leveln und erhöhten IFN- $\gamma$ -Spiegeln einherging [229]. Allerdings gilt es auch hier zu bedenken, dass die Menge des

aufgenommenen Allergens einen Einfluss auf die Ausbildung des Zytokinprofils hat [246] und dass gleichzeitig vorkommende andere Faktoren additive oder gegensätzliche Effekte hervorrufen können.

### **5.3.3.3 Genetische Prädisposition und allergische und infektiöse Erkrankungen von Mutter und Kind**

#### **5.3.3.3.1 Allergische Vorerkrankungen in der Familie**

Das Vorliegen atopischer Erkrankungen in der Familie konnte in mehreren Studien als Risikofaktor für die Entstehung atopischer Erkrankungen beim Kind gesehen werden [118, 202, 203, 247-250], wobei der mütterliche Einfluss als dem väterlichen überlegen gilt [142, 251]. So scheinen Kinder atopischer Mütter ein eher Th2-gewichtetes Zytokinprofil zu exprimieren [137], dessen anhaltende Dominanz im ersten Lebensjahr der Kinder eine Assoziation zu vermehrter Allergieentstehung zeigte, während nicht-allergische Kinder ab dem 6. Lebensmonat eher eine stärkere Th1-Antwort aufwiesen [30].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit fallen bezüglich der genetischen Prädisposition allerdings uneinheitlich aus. Während eine Neurodermitis in der Vorgeschichte der Mutter mit einer niedrigeren Konversionsrate für IL-12 nach einem Jahr bei den Kindern assoziiert war, was mit den oben genannten Studienergebnissen einhergehen würde, zeigten die wenigen Non-Responder für IL-5 bei Geburt, deren Großväter mütterlicherseits an einer ekzematösen Hauterkrankung litten, signifikant geringere Konversionsraten zum Responder nach einem Jahr als die Kinder mit gesunden Großvätern. Ähnliche Ergebnisse zeigten Kinder aus genetisch vorbelasteten Familien mütterlicherseits, die aufgrund von allergischen Erkrankungen in der Familie Vorkehrungen in Bezug auf Haustiere oder die Art der Möblierung trafen. Auch hier konvertierten nach einem Jahr weniger Kinder aus den allergisch vorbelasteten Familien zum IL-5 Responder. Inwieweit eine innerhäusliche Allergenvermeidung auf die Entstehung von Allergien Einfluss nimmt, bleibt aber auch nach mehrfachen Untersuchungen unklar. Es konnten sowohl protektive Effekte der Allergenvermeidung auf die Entwicklung atopischer Erkrankungen gesehen werden [214, 252-255], als auch ein gehäuftes Auftreten von Atemwegssymptomen und bronchialer Hyperreagibilität in Haushalten mit hoher Allergenexposition [252, 256, 257], in einer

anderen Studie wiederum konnte jedoch keine direkte Beziehung zwischen Allergenexposition und Asthmaentstehung gesehen werden [258]. Eine weitere Studie zeigte sogar eine erhöhte Sensibilisierung auf ein gemiedenes Allergen [259].

Die signifikant höhere Konversionsrate für IL-12 bei den Kindern, deren Mütter in der Kindheit an spastischer oder obstruktiver Bronchitis litten, im Vergleich zu Kindern von Müttern ohne kindliche Bronchitis mag zunächst verwundern. Allerdings muss bedacht werden, dass obstruktive Atemwegserkrankungen nicht immer atopischer Genese sein müssen, sondern häufig auch nicht-atopischen Asthmaformen entsprechen können [260] oder Ausdruck infektiöser Erkrankungen sind, die auf lange Sicht gesehen sogar allergieprotektiv wirken können, wie dies schon für die häufigeren Atemwegsinfekte von Kindern angenommen wurde, die mit mehreren Geschwistern oder in Tageskrippen aufwuchsen [37]. Daher wäre es für die Beurteilung des kindlichen Zytokinstatus sicher auch interessant gewesen zu wissen, wie viele der oben genannten Mütter mit kindlicher Bronchitis selbst im späteren Leben an einer manifesten atopischen Erkrankung litten, oder ob es sich vorwiegend um transiente Formen handelte.

Einen interessanten Punkt stellte auch die Frage dar, ob ein Einfluss auf die kindliche Zytokinentwicklung im ersten Lebensjahr besteht, wenn die Mutter selbst auf einem Hof aufgewachsen war. Das Leben auf einer Farm zeigt eine hohe positive Assoziation zur Menge an mikrobiellen Bestandteilen in der direkten Umgebung [164], von denen unter anderem die Höhe der Endotoxinlevel in mehreren Studien untersucht und bei Farmkindern mit einer erniedrigten Asthma- und Atopierate in Verbindung gebracht wurde [163, 164]. In einer holländischen Studie zeigte sich zwar eine positive Assoziation der Endotoxinexposition erwachsener Farmer mit Asthma-ähnlichen Symptomen, aber eine negative Assoziation mit Heuschnupfen, und zwar vor allem bei Erwachsenen, die als Kind auf einer Farm aufgewachsen waren [261]. Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass das Leben auf einem Hof durch die Endotoxinexposition, aber auch durch die Anzahl verschiedener Vieharten präventiv gegen atopisches Asthma wirkte, nicht-atopische Formen dagegen ausgelöst werden konnten [260]. Bei Müttern, die auf einer Farm aufgewachsen sind, würde man daher wohl am ehesten ein Th1-gewichtetes Zytokinprofil erwarten. In der Annahme, dass die im finnischen Arm der PASTURE-Studie gezeigte Mutter-Kind-Korrelation der Zytokin-Produktionskapazität mit einem Jahr auch auf die deutschen Kinder zutrifft, würde man auch bei diesen eine vermehrte Th1-Gewichtung erwarten. Daher verwundern die inhomogenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit erniedrigter Konversion für IFN- $\gamma$  und

erhöhter für TNF- $\alpha$  für die Kinder, deren Mütter auf einer Farm aufwuchsen. Dabei gilt zu bedenken, dass in die Berechnungen für die Konversionsrate von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  nicht dieselben Kinder eingingen, so dass kein einheitliches Kollektiv bestand, das direkt miteinander verglichen werden konnte. Die in einigen Studien gezeigte negative Assoziation von TNF- $\alpha$  und dem Risiko für die Entstehung atopischer Erkrankungen würde die vorliegenden Ergebnisse untermauern [21, 176, 177], wohingegen die erniedrigte IFN- $\gamma$ -Rate unerklärt bleibt. Möglicherweise spielen Faktoren wie Viehart und -anzahl, Art der landwirtschaftlichen Nutzung oder Einsatz von Pestiziden auf der mütterlichen Farm in der Kindheit eine Rolle, die in der Summe doch eher eine Th2-Gewichtung bei der Mutter hervorgerufen haben könnten.

### **5.3.3.3.2 Erkrankungen der Mutter in der Schwangerschaft**

Es konnte schon mehrfach gezeigt werden, dass pränatale Einflüsse einen Effekt auf die postnatale Entstehung atopischer Krankheiten haben [205]. Solche Einflüsse stellen Umwelt- und Nahrungsmittelallergene dar, die zu einer pränatalen Sensibilisierung führen können [206, 262], aber auch fieberhafte und virale Infektionen und Atemwegserkrankungen der Mutter in der Schwangerschaft [263, 264].

So können Mütter in der Schwangerschaft als Reaktion auf eine Umwelt-Antigen-Exposition mit einer Hochregulation von Th2-Zytokinen reagieren, die wiederum über die Plazenta zum Fetus gelangen und dort eine fetale Immunantwort hervorrufen können [149, 265]. Bei Th1-polarisierten Müttern konnte dagegen kein entsprechender Effekt auf die kindliche Zytokinproduktion nachgewiesen werden [266]. Dabei gilt in einigen Arbeiten die von der Mutter aufgenommene Allergenmenge als ausschlaggebend [209], während andere wiederum den Einfluss in utero als bedeutend geringer einschätzten als den postnatalen Kontakt zu Allergenen im ersten Lebensjahr durch das Kind selbst [267, 268] oder aber auch gar keinen Einfluss einer Allergenexposition in utero sahen [118, 185, 207, 208]. Auch ein protektiver Effekt konnte gezeigt werden: so kann es durch Exposition der Mutter mit einem Antigen in der Schwangerschaft zur Produktion von IgE kommen, das über die Plazenta in den fetalen Kreislauf übertritt und ihn so vor einer Sensibilisierung gegen das betreffende Antigen bei Kontakt in der frühen Kindheit schützt, was letztlich zur Toleranz gegenüber diesem Allergen führt [188, 269-271]. In der vorliegenden Arbeit konvertierten die Kinder der wenigen Mütter, die während der Schwangerschaft unter einer Allergie, aber nicht unter einer atopischen



Erkrankung litten, signifikant weniger zum Responder für IL-5, was für einen eher protektiven Effekt der mütterlichen Allergie in der Schwangerschaft sprechen würde. Bei Betrachtung infektiöser Schwangerschaftseinflüsse fiel eine höhere Konversionsrate zum Responder für IL-12 bei allgemein durchgemachter Infektion der Mutter in der Schwangerschaft auf, eine vaginale Pilzinfektion der Mutter im Speziellen schien sich dagegen negativ auf die Konversionsrate von IFN- $\gamma$  auszuwirken. Bei Antibiotikaeinnahme der Mutter war die Konversionsrate sowohl bezüglich IL-12 als auch IL-5 reduziert. Letzteres steht nur zum Teil im Einklang mit den bei McKeever et al beschriebenen Beobachtungen, dass eine Antibiotikaeinnahme der Mutter in der Schwangerschaft zu einer Zunahme atopischer Erkrankungen beim Kind führte [264, 272], die wiederum mit einer vermehrten Produktion von Th2-Zytokinen in Verbindung gebracht wurden [273, 274]. Die Zytokin-Sekretionsmuster von allergischen Personen folgen jedoch nicht immer streng der Th2-Definition, sondern können, je nach Einwirkung anderer Einflüsse auch ein gemischtes Zytokinprofil unterschiedlicher Th-Subtypen aufweisen [215, 216]. Eine positive Assoziation von Infektionen der schwangeren Mutter und späterer Entwicklung allergischer Erkrankungen beim Kind konnte ebenfalls bei McKeever et al gesehen werden [264], was die erhöhte Konversionsrate des Th1-Zytokins IL-12 der entsprechenden Kinder in der vorliegenden Arbeit dagegen eher nicht erwarten lassen würde.

### **5.3.3.3 Erkrankungen des Kindes im ersten Lebensjahr**

Schon Strachan et al vermuteten einen Zusammenhang zwischen dem gehäuften Auftreten von Infektionen in der Kindheit durch vermehrten Kontakt mit Geschwisterkindern und einer niedrigeren Prävalenz atopischer Erkrankungen [37]. Auch in schwedischen Kinderkrippen konnte ein gehäuftes Auftreten von Otitis media und Atemwegsinfektionen gesehen werden [275-277]. Die Schleimhautexposition mit Allergenen in Lunge und auch Gastrointestinaltrakt gilt als wichtiger Faktor für die frühe Immunprogrammierung [73, 278]. Dabei ist eine erhöhte Th2-Zellantwort auf Allergene der Hauptmechanismus bei der Entstehung von allergischen Erkrankungen [1], wobei der Einfluss der individuellen genetischen Prädisposition nicht außer Acht gelassen werden darf [118, 203, 247-250, 279]. So konnten einige Studien zeigen, dass orofäkal erworbene Infektionen vor Asthma und Allergien schützen konnten, insbesondere traf dies für Infektionen mit *Toxoplasma gondii*, *Helicobacter pylori* und Hepatitis A zu [280-284]. Eine andere Studie wiederum konnte keine Reduktion

der Inzidenz allergischer Erkrankungen durch kindliche Infektionen sehen [272], für Atemwegsinfektionen mit dem RSV-Virus konnte sogar eine positive Assoziation zur späteren Entwicklung asthmatischer Erkrankungen beobachtet werden [285].

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in Hinblick auf frühkindliche Infektionen lediglich für das Auftreten von pfeifenden Atemgeräuschen in den ersten beiden Lebensmonaten ein signifikantes Ergebnis. Hierbei konvertierten die betreffenden Kinder nach einem Jahr häufiger zum Responder für IL-12, als Kinder ohne pfeifende Atemgeräusche. Diese Ergebnisse gehen einher mit Studiendaten einer polnischen Untersuchung, in der bei Kindern mit keuchenden Atemgeräuschen bis zum zweiten Lebensjahr erhöhte IL-12-Level gemessen werden konnten. Dabei korrelierten die Zytokinwerte positiv mit der Anzahl der Episoden erschwerten Atmens [286]. Die Asthmaentstehung in späterer Kindheit wurde in dieser Studie allerdings nicht berücksichtigt, auch konnte die Differenz der IL-12-Spiegel im 2-Jahres-Follow-Up nicht mehr gesehen werden [286].

In einer spanischen Studie fiel desweiteren auf, dass Kinder, die später eine Bronchiolitis durch eine RSV-Infektion entwickelten, im Vergleich zu gesunden Kindern zwar niedrigere IL-12-Spiegel bei Geburt hatten, während der Bronchiolitis-Episode jedoch hohe Werte für IL-12 zeigten [287].

Inwiefern diese frühkindlichen Atemwegsbeschwerden einen Einfluss auf die langfristige Entstehung atopischer Erkrankungen haben, bleibt jedoch unklar, auch wenn eine Erhöhung des Th1-Zytokins IL-12 eher als protektiv dahingehend gesehen wird [288-291]. Vermutlich spielt auch der Auslöser der Atemwegsbeschwerden eine Rolle bei einer möglichen Allergieentwicklung. Den in ländlicher Umgebung und insbesondere auf Farmen vorkommenden hohen Konzentrationen an Endotoxin, aber auch Pilzsporen und anderen mikrobiellen Stoffen [164] konnte ein präventiver Effekt bezüglich der Entstehung atopischer Asthmaformen zugeschrieben werden, wohingegen sie die nicht-atopischen Formen auslösen konnten [260]. So zeigte sich in der PARSIFAL-Studie eine inverse Korrelation zur Entstehung pfeifender Atemgeräusche für die Exposition mit Endotoxin, aber auch mit Glucan und EPS, während keine Korrelation für die Asthmaentstehung gesehen werden konnte [89].

Andere Studien wiederum zeigten einen Zusammenhang zwischen Allergenexposition und dem Auftreten einer nicht-spezifischen bronchialen Hyperreagibilität [252, 256] - zum Teil bis zu einem Alter von 13 Jahren [257] - aber auch eine positive Assoziation zur Asthmaentstehung [253-255, 267, 268]. Eine deutsche Studie von Lau et al dagegen konnte

dagegen keine direkte Beziehung zwischen Allergenexposition und Asthmaentstehung sehen [258].

Bezüglich der kindlichen Zytokinproduktion zeigten bei Machura et al Kinder mit keuchenden Atemgeräuschen, bei denen auch ein Hautausschlag bis zum 2. Lebensjahr auftrat, signifikant niedrigere IL-12-Werte im Vergleich zu Kindern ohne Hautausschlag [286]. In der vorliegenden Studie konvertierten die Non-Responder für IL-5, bei denen in der ersten Lebenswoche ein Hautausschlag vorlag, nach einem Jahr doppelt so häufig zum Responder wie Kinder ohne Ausschlag. Dies würde auch Studienergebnisse von Kawamoto et al. [123] stützen, die zeigen konnten, dass sich zwar das Th2-Profil im Nabelschnurblut von Kindern, die später an allergischen Erkrankungen litten, nicht von dem nicht-allergischer Kinder unterschied, aber ein Anstieg der Th2-gewichteten Zytokine mit zunehmendem Alter erfolgte. Ähnliche Ergebnisse finden sich auch bei Duramad et al [197]. Möglicherweise ist ein Hautausschlag in der ersten Lebenswoche ein erstes Anzeichen einer atopischen Prädisposition mit nachfolgender, verstärkter Konversion der allergisch prädisponierten Kinder zum Responder für das Th2-Zytokin IL-5. Auch Prescott et al fanden in Studien eine Th2-Persistenz in den ersten beiden Lebensjahren bei Kindern mit atopischen Erkrankungen [30], was die hier gezeigte Entwicklung ebenfalls untermauern würde.

Bei weiterer Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit zeigte sich, dass bei den Kindern aus der Non-Responder-Gruppe für IL-12, die ein Neugeborenenexanthem hatten, die Konversionsrate bei insgesamt eher niedrigen Werten höher ausfiel als bei den Kindern ohne Exanthem. Diese Exanthemform tritt häufig vorübergehend bei Neugeborenen in den ersten 48 Lebensstunden auf und scheint Ausdruck einer Reaktion des angeborenen Immunsystems auf die plötzliche Belastung der Haut mit Umweltkeimen zu sein [292, 293]. Sie darf nicht mit einer atopischen Dermatitis verwechselt werden, die sich gehäuft bei allergisch prädisponierten Kindern findet, die später im Leben vermehrt asthmatische Erkrankungen zeigen [294], und mit erniedrigten IL-12-Werten assoziiert sind [288-291]. Im Sinne einer Infektion scheint das Neugeborenenexanthem hier vielmehr eine vermehrte Th1-Antwort hervorzurufen, die möglicherweise sogar eine allergieprotektive Wirkung haben könnte. Dieser Zusammenhang müsste allerdings anhand eines längeren Beobachtungszeitraums untersucht werden, der hier mit einem Jahr nicht gegeben ist.

Ein interessantes Ergebnis stellte auch die um etwa 50% niedrigere IL-5-Konversionsrate bei den Kindern dar, die ab dem zweiten Lebensmonat Antibiotika eingenommen hatten - im Vergleich zu Kindern ohne Antibiotikaeinnahme.

In Tierversuchen hatte sich gezeigt, dass Darmbakterien für die Ausreifung des Immunsystems eine wichtige Rolle zu spielen scheinen [295]. Gab man neugeborenen Mäusen Antibiotika, führte das zu einer Änderung der intestinalen Keimbesiedelung und beeinträchtigte die Th1-Antwort [296]. Es scheint daher möglich, dass auch beim Menschen oral aufgenommene Antibiotika in der frühen Kindheit die intestinale Mikroflora verändern und zu einer Th2-Polarisation führen können. Auf diese Weise könnte die Einnahme von Antibiotika in früher Kindheit zur Atopie prädisponieren [297, 298]. Auch Björkstén et al konnten schon Unterschiede in der Darmflora von atopischen und nicht-atopischen Säuglingen zeigen [69].

Hinweise auf eine erhöhte Atopierate durch Antibiotikaeinnahme in früher Kindheit finden sich in der Literatur in mehreren Studien [272, 297, 299, 300], wobei dosisabhängige Effekte [272, 298] und eine Assoziation zur genetischen Prädisposition für atopische Erkrankungen [300] beobachtet wurden. Andere Studien wiederum konnten keinen Zusammenhang zwischen Antibiotikaeinnahme im ersten Lebensjahr und einer Zunahme der Atopierate erkennen [301], nicht einmal bei Kindern atopischer Eltern [302]. Eine Querschnittsstudie an 5- bis 10-jährigen Kindern einer Rudolf-Steiner –Schule in Neuseeland wiederum konnte eine Antibiotikaeinnahme im ersten Lebensjahr zwar mit einem erhöhten Risiko für Asthmaerkrankungen und pfeifenden Atemgeräuschen in Zusammenhang bringen, nicht jedoch mit Heuschnupfen oder atopischem Ekzem [303].

Auch die Daten der vorliegenden Arbeit mit niedrigeren IL-5-Werten nach Antibiotikaeinnahme lassen eher keine positive Assoziation zu einer sich später entwickelnden atopischen Erkrankung erwarten, Langzeitbeobachtungen wären jedoch nötig, um diese These zu überprüfen. Auch sollte bedacht werden, dass keine Daten zu Einnahmehäufigkeit und –gründen erhoben wurden, die aber als mögliche confounder in Betracht gezogen werden sollten.

#### **5.3.3.4 Haustiere**

Interessanterweise lag die Konversionsrate der Non-Responder für IL-12, deren Familien bis zum 2. Lebensmonat des Kindes keine Katze als Haustier besaßen, nach einem Jahr deutlich höher als die der Katzenbesitzer. Zudem konvertierten bei den Familien mit Katzenhaltung tendenziell signifikant mehr Kinder zu Respondern für IL-12, bei denen sich die Katze während der Schwangerschaft nicht oder möglichst wenig im Haus aufhielt, während sich

wiederum tendenziell signifikant höhere Konversionsraten für TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  bei häufigem Aufenthalt der Katzen im Haus bzw. Kinderschlafzimmer im Laufe des ersten Lebensjahres fanden (s. Tab. A.9 im Anhang).

Letztere Beobachtung geht einher mit Daten einer finnischen Studie, in der gezeigt werden konnte, dass bei Kindern mit einer Katze als Haustier - und daher höheren Endotoxin-Konzentrationen im Matratzenstaub des mütterlichen Bettes - eine Erhöhung der Zytokin-Produktionskapazität in den ersten drei Lebensmonaten auffiel, insbesondere in Bezug auf die IFN- $\gamma$ -Spiegel [173].

Insgesamt gesehen zeigten sich jedoch sehr inhomogene Studienergebnisse in Bezug auf die Katzenhaltung. In einigen Studien erwies sie sich als eher allergieprotektiv, unter anderem dadurch begründet, dass Katzen als Endotoxinträger zu höheren Endotoxin-Spiegeln im Haus beitragen, die eine Assoziation zu erhöhten Th1-Spiegeln bei im Haushalt lebenden Kindern zeigten [52, 55-58, 171-173, 196, 304-314]. Dieser Endotoxin-Effekt konnte allerdings nicht in allen Studien als ursächlich gesehen werden [56, 173, 315, 316].

Eine mögliche weitere Erklärung für eine geringere Ausbildung allergischer Erkrankungen durch Katzenkontakt könnte man darin sehen, dass Katzenallergene als Säugetierantigene vollmethylierte DNA enthalten und daher menschlichen Proteinen ähneln und somit hohe Dosen notwendig wären, um überhaupt eine Immunantwort auszulösen [317, 318].

Aber auch ein eher allergiefördernder Effekt der Katzenhaltung [62-64, 304, 305, 319, 320] oder aber auch gar kein Effekt [258] konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden.

Möglicherweise ist auch der bei Bauernkindern gezeigte Haustiereffekt eher durch den gleichzeitig vermehrten Aufenthalt in Tierställen erklärt, wie es in der Studie von Waser et al diskutiert wird [65]. Auch andere Einflußfaktoren im Bereich des ländlichen Lebens müssen kritisch auf ihren möglichen Einfluss auf den Haustiereffekt betrachtet werden.

Ebenso von Bedeutung sind wohl auch der Zeitpunkt und die Menge des aufgenommenen Allergens [267, 268]. Durch den Nachweis von Katzenallergenen im fetalen Kreislauf und in der Amnionflüssigkeit scheint der Einfluss wohl schon pränatal zu beginnen [206], wobei die Menge des plazentar übertragenen Allergens möglicherweise eher gering ausfällt [192] und nicht sicher zu einer Sensibilisierung zum Zeitpunkt der Geburt führt [321]. Eine hochdosierte Allergenexposition in der frühen Kindheit dagegen konnte in einigen Studien als Risikofaktor für die Entstehung eines allergen-induzierten Asthmas gesehen werden [267, 268] und würde ein eher Th2-gewichtetes Zytokinprofil erwarten lassen. Dazu passend wären die

Beobachtungen der vorliegenden Studie mit höheren Konversionsraten für das Th1-Zytokin IL-12 bei Kindern ohne Katze im Haushalt.

Interessant ist allerdings auch die in einigen Studien gezeigte modifizierte Th2-Antwort auf Exposition mit Katzenallergenen wie Fel d1, die zu einer Produktion von IgE und IgG4-Antikörpern führte, allerdings nicht mit einer atopischen Sensibilisierung oder erhöhtem Asthmarisiko einherging [65, 311]. Diese modifizierte Th2-Antwort fand sich auch bei College-Studenten in Virginia und war hier ebenfalls negativ mit dem Auftreten atopischer Erkrankungen assoziiert. Als Ursache hierfür wurde diskutiert, dass hohe Dosen an Katzenallergenen in früher Kindheit möglicherweise durch die Induktion von regulatorischen T-Zellen und konsekutiver Verlängerung der IL-10-Produktion zur Unterdrückung von Th2-Antworten auf andere Allergene führten und somit das geringere Vorkommen von Atopien in dieser Gruppe erklärten. Allerdings schien eine permanent hohe Allergenexposition notwendig zu sein, um die Level an regulatorischen T-Zellen und die dadurch entstandene modifizierte Th2-Antwort zu erhalten [204, 311, 315, 322]. So könnte der allergieprotektive Effekt, der in einigen Studien für die Katzenhaltung gezeigt wurde, trotzdem mit einem Th2-gewichteten Zytokinprofil einhergehen, was möglicherweise zu Erklärungsversuchen der inkonsistenten Studienlage beiträgt.

### **5.3.3.5 Geschwister**

Das Vorhandensein älterer Geschwister wurde erstmals von Strachan im Rahmen der Hygienehypothese als protektiver Faktor für die Entstehung von Asthma und anderen allergischen Erkrankungen gesehen und von ihm auf die häufigeren Infektionen im Kindesalter bei Kontakt mit anderen Kindern zurückgeführt [37]. Auch zahlreiche weitere Studien konnten diesen protektiven Effekt des Aufwachsens mit Geschwisterkindern oder in Tageskrippen auf die Entstehung allergischer Erkrankungen im späteren Leben sehen – vor allem bei Exposition im ersten Lebensjahr [40, 323, 324]. Da der Hauptmechanismus bei der Entstehung allergischer Erkrankungen in einer erhöhten Th2-Zell-Antwort auf Allergene und der konsekutiven Induktion der Produktion von Gesamt- und spezifischem IgE gesehen werden kann [1, 5], würde das Vorhandensein älterer Geschwister eher ein Th1-gewichtetes Zytokinprofil der betroffenen Kinder erwarten lassen. Bei Betrachtung der vorliegenden Studiendaten zeigte sich für die Non-Responder für IL-12, die ältere Geschwister hatten, nach einem Jahr auch tatsächlich eine mehr als doppelt so hohe Konversionsrate zum Responder

als für Einzelkinder. Bei Korrelation der Anzahl der im Haushalt lebenden Kinder bis einschließlich 12 Jahren mit der Konversionsrate der Non-Responder für IL-12 fiel ebenfalls auf, dass Einzelkinder nach einem Jahr signifikant weniger konvertierten als solche mit einem Geschwisterkind. Erstaunlicherweise zeigte sich dieser Effekt aber nicht, wenn zwei oder mehr Geschwister im Haushalt lebten, obwohl gerade für die zunehmende Anzahl an Geschwisterkindern auch ein zunehmender protektiver Effekt beschrieben wurde [313, 325, 326].

Ebenso verwundert, dass sich für Kinder ohne ältere Geschwister eine positive Assoziation zur Konversionsrate für IFN- $\gamma$  nach einem Jahr im Vergleich zu Kindern mit älteren Geschwistern zeigte, obwohl in Auswertungen der Daten aller an der PASTURE-Studie beteiligten Länder die Kinder mit den älteren Geschwistern höhere IFN- $\gamma$ -Werte zeigten, was wiederum eher mit der oben diskutierten Studienlage übereinstimmt und die Frage aufwirft, ob die hier beobachtete Subpopulation eventuell ein zu kleines Kollektiv darstellt, um verwertbare Aussagen machen zu können.

Allerdings wurde in Studien durchaus auch ein vermehrtes Auftreten von Asthma und Atemwegssymptomen in Kinderkrippen beobachtet [277, 326, 327], wobei nicht klar ist, ob es sich hierbei wirklich um manifeste Formen atopischer Erkrankungen handelte oder nicht vielmehr um transiente frühkindliche Infektionen [275-277], die auf längere Sicht wiederum einen protektiven Effekt auf die Entstehung andauernder atopischer Erkrankungen haben könnten. Es wurden aber auch einige Faktoren in Kinderkrippen - wie z.B. Schimmel oder Staub in Vorhängen oder offenen Bücherregalen, sowie Rauch von Holzheizungen - beschrieben, die einen Einfluss auf die Entstehung allergischer Erkrankungen haben könnten und somit eventuell den Effekt des Kontaktes mit anderen Kindern negativ beeinflussen [324]. Letztlich entscheidet wahrscheinlich die Summe aller Faktoren, ob ein Milieu protektiv wirkt oder nicht. Diese These konnte in der PARSIFAL-Studie generiert werden, in der das Vorliegen von vier bis fünf als allergieprotektiv geltenden Faktoren mit einer signifikant geringeren Prävalenz an Asthma und atopischer Sensibilisierung als bei Vorliegen von einem oder keinem protektiven Faktor assoziiert war [89].

### 5.3.3.6 Art der Heizung

In den Familien der Non-Responder für IL-5 wurde zu einem großen Teil mit Holz oder Kohle geheizt, was eine negative Assoziation zum Konversionsverhalten aufwies. So wurden alle Kinder der Familien ohne Holz- oder Kohleheizung nach einem Jahr zum Responder, während dies nur für etwa 70% der Kinder mit einem solchen Heizverhalten im Haus zutraf. Dieselbe Assoziation zeigte sich für die Nutzung von Einzelraumheizungen, während bei Benutzung einer Zentralheizung mit etwa 90% fast doppelt so hohe Konversionsraten der Non-Responder für IL-5 vorlagen wie in der Gruppe ohne Nutzung einer solchen.

Des Weiteren fiel eine negative Assoziation zwischen der Nutzung von Einzelraumheizungen und der Konversionsrate für TNF- $\alpha$  nach einem Jahr auf.

Die in dieser Studie gemessenen niedrigeren Konversionsraten für IL-5 und TNF- $\alpha$  bei Gebrauch von Holz- oder Kohleöfen und Einzelraumheizungen im Vergleich zur Nutzung einer Zentralheizung würde ein niedrigeres Vorkommen an Th2-assoziierten atopischen Erkrankungen in dieser Gruppe vermuten lassen, was mit Ergebnissen der ALEX-Studie einhergeht, in der die Nutzung einer Holz- oder Kohleheizung mit niedrigeren Raten an Heuschnupfen, allergischer Sensibilisierung und bronchialer Hyperreagibilität bei Kindern in diesen Haushalten assoziiert war [328]. Möglicherweise kommen derartige Heizungen aber auch nur häufiger in Haushalten mit einem traditionelleren Lebensstil - wie es bei Bauernfamilien [170] oder anthroposophischen Familien [165] der Fall ist - vor, so dass möglicherweise noch weitere Faktoren aus diesem Milieu einen Einfluss auf die Zytokinentwicklung und Entstehung atopischer Erkrankungen haben, deren Summe letztlich ausschlaggebend sein könnte [89].

Die bei Duramad et al gezeigte Assoziation von vermehrter NO<sub>2</sub>-Emission mit erhöhter Th2-gewichteter Zytokinproduktion [197] würde dagegen eher eine erhöhte IL-5-Konversionsrate unter den Kindern dieser Studie erwarten lassen, in deren Umfeld durch eine Holz- oder Kohleheizung vermutlich höhere NO<sub>2</sub>-Emissionen in der Umgebung entstanden sind. Auch in anderen Studien konnte eine Beziehung zwischen erhöhten NO<sub>2</sub>-Werten und dem Auftreten und Schweregrad von Asthma gesehen werden [329-336], ebenso wie die Feinstaub- und Rußbelastung, die durch Gebrauch von Holzöfen erhöht werden dürfte, zu gehäuftem Auftreten von Asthmaerkrankungen bei Kindern führen kann [326, 330, 337]. Dahingegen zeigte sich in der PEACE-Studie, die in 28 europäischen Ländern durchgeführt wurde, kein negativer Einfluss von Feinstaub, Ruß oder NO<sub>2</sub> auf die Lungenfunktion oder



Atemwegssyndrome, allerdings fand die Untersuchung an 6-12 jährigen Kindern statt und Langzeitbeobachtungen fehlten [338].

### **5.3.3.7 Einflussfaktoren der ländlichen Umgebung**

#### **5.3.3.7.1 Stallaufenthalt**

Die meisten Geburts-Non-Responder für IL-5 hielten sich in den ersten zwei Lebensmonaten nicht im Stall auf. Von den Kindern mit Stallexposition betrug diese bei 60% maximal drei Tage in der Woche, nur wenige Kinder waren häufiger im Stall. Die Konversionsrate der Kinder ohne Stallexposition war doppelt so hoch wie die der Kinder mit Aufenthaltsdauern bis zu drei Tagen pro Woche. Die Kinder mit häufigerer Aufenthaltsdauer konvertierten allerdings zu 100% nach einem Jahr. Bei Interpretationsversuchen dieser zunächst widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse gilt es zu bedenken, dass die niedrigen Fallzahlen von n=9 für Kinder mit mittlerer Stallexposition und n=6 für Kinder mit häufiger Stallexposition statistisch nur eingeschränkt aussagekräftig sind, so dass diese Ergebnisse anhand der Daten des größeren Probandenkollektivs aller Länder überprüft werden sollten. Die Erwartung, dass Kontakt mit Umweltallergenen und Tieren im Stall im frühen Lebensalter einen allergieprotektiven Effekt hat [88, 164, 170, 195, 339] und zu einer geringeren Th2-Gewichtung bei den Kindern im ersten Lebensjahr führt [1, 50], würde durch oben genannte Ergebnisse bei Betrachtung der Kinder ohne und mit Stallaufenthalt bis zu drei Tagen pro Woche gestützt werden. So konnte in der PARSIFAL-Studie gezeigt werden, dass regelmäßiger Stallaufenthalt mit einem geringeren Auftreten atopischen Asthmas assoziiert war, was wiederum niedrigere Th2-Spiegel erwarten lassen würde [89]. Auch in der ALEX-Studie fiel ein protektiver Effekt bezüglich des Auftretens von Asthma, Heuschnupfen und atopischer Sensibilisierung bei Stallkontakt des Kindes im ersten Lebensjahr auf, ebenso auch bei Langzeitkontakt in den ersten fünf Lebensjahren, was ebenso die oben angeführten Ergebnisse mit niedrigeren Konversionsraten für IL-5 bei einem Stallaufenthalt von bis zu drei Tagen pro Woche unterstützen würde. Hinsichtlich der Asthmaentstehung konnte in der ALEX-Studie jedoch nur ein Zusammenhang zwischen Stallaufenthalt und den nicht-atopischen Asthmaformen gesehen werden. Der protektive Einfluss auf die atopischen Asthmaformen wiederum wurde durch den vom Stallaufenthalt und Bauernstatus

unabhängigen Endotoxineffekt erklärt [88, 182]. Angaben über den Endotoxingehalt im Haushalt der Probanden dieser Studie lagen jedoch leider nicht vor.

Da Kinder im zweiten Lebensmonat nicht alleine in den Stall gehen können, sondern ihre Aufenthaltsdauer dort am ehesten von der ihrer Mütter abhängt, spielen wahrscheinlich noch zahlreiche andere Einflußfaktoren eine Rolle, die hier nicht berücksichtigt wurden. So auch der schon pränatale Einfluss des Stallaufenthaltes der Mutter in der Schwangerschaft und andere mütterliche Tätigkeiten auf dem Hof und in der Landwirtschaft [51]. Hier wäre eine Regressionsanalyse zur Detektion möglicher Confounder am größeren Probandenkollektiv und mit mehr Informationen über die mütterlichen Tätigkeiten interessant.

Die unerwartete 100%ige Konversion von Kindern mit Stallaufenthaltsdauern von mehr als drei Tagen pro Woche könnte eventuell darin begründet sein, dass die Mütter dieser Kinder auch stärker in andere landwirtschaftliche Tätigkeiten eingebunden waren, zu denen sie ihre Kinder ebenfalls mitnahmen. Dadurch wiederum könnten zusätzliche Einflußfaktoren wie z.B. eine erhöhte Pestizid- oder Herbizidbelastung zum Tragen kommen, die dann eventuell nicht mehr allergieprotektiv, sondern -fördernd wirken und so einen Anstieg der Il-5-Konzentration bei den Kindern hervorrufen könnten [197, 340]. Aber auch die Art der Viehhaltung und die Anzahl der verschiedenen Vieharten scheinen einen Einfluss darauf zu nehmen, ob ein Milieu allergieprotektiv wirkt oder insgesamt eher ein Risikoumfeld darstellt [170, 260]. So kamen in der PARSIFAL-Studie der Rinder- und Schweinehaltung allergieprotektive Eigenschaften zu, wohingegen die Schafzucht das Risiko atopischen Asthmas eher erhöhte [89].

### **5.3.3.7.2 Mikrobielle Stoffe in ländlicher Umgebung**

In mehreren epidemiologischen Studien konnte ein allergieprotektiver Effekt für das Leben auf einer Farm gezeigt werden [179, 341-343]. Dieser „farm effect“ beruht möglicherweise auf einer hohen Belastung mit mikrobiellen Bestandteilen in der Farmumgebung [164], deren Antigene durch eine Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen zu einer vermehrten Th1-Zytokinproduktion führen können [233-236], was wiederum durch Unterdrückung einer Th2-Antwort mit der im Farmmilieu beobachteten geringeren Ausbildung allergischer Erkrankungen einhergehen würde [1, 163, 164]. Der protektive Farmeffekt konnte allerdings in der PARSIFAL-Studie nach Adjustierung auf die Tätigkeiten des Kindes auf dem Hof und auf bestimmte Hofcharakteristika nicht mehr gesehen werden [89], was das Augenmerk auf

die Untersuchung ebendieser Faktoren hinsichtlich ihres allergieprotektiven Effekts gelegt hat. So scheint die Summe aller beeinflussenden Faktoren ausschlaggebend dafür zu sein, ob ein Milieu als protektiv anzusehen ist oder nicht [89]. Mikrobielle Stoffe wie Endotoxin, aber auch EPS und  $\beta(1-3)$ Glucan konnten mit einer inversen Assoziation zur Entstehung allergischer Erscheinungen in Zusammenhang gebracht werden [89, 344], was auch nach Adjustierung auf den Farmerstatus davon unabhängige Effekte zeigte. Weitere als protektiv geltende Faktoren sind regelmäßiger Farmtierkontakt [88, 163, 164, 345], Stallaufenthalt [88], der Verzehr hofeigener Milchprodukte [61, 88, 228, 229] und die Haustierhaltung [56]. Die PARSIFAL-Studie konnte zudem bei Kindern auf deutschen Höfen eine Verstärkung des protektiven Effekts erkennen, wenn zusätzlich zur Viehzucht auch noch Ackerbau betrieben wurde [89].

Allerdings konnte bei Berger et al auch ein erhöhtes Risiko für das Auftreten allergischer Reaktionen im Rahmen landwirtschaftlicher Tätigkeiten gesehen werden – zum Beispiel durch eine Belastung mit Allergenen wie Hautschuppen von Kühen [346]. Auch in einer Kalifornischen Studie konnte eine erhöhte Asthmarate bei Kindern bis zum 5. Lebensjahr gesehen werden, wenn sie im ersten Lebensjahr mit Getreide, Farmstaub und Farmtieren exponiert waren. Aber auch der Kontakt mit in der Landwirtschaft eingesetzten Herbiziden und Pestiziden schien eine erhöhte Asthmaentstehung zu bewirken [326]. Zudem wird der Art der Viehhaltung ein Einfluss zugeschrieben. Daten der PARSIFAL-Studie legen nahe, dass Rinder- und Schweinefarmen ein eher allergieprotektives Potential haben, Schaffarmen dagegen mit einer erhöhten Rate an allergischen Erscheinungen assoziiert sind [89].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zytokinresponderstatus der einjährigen Kinder in Bezug zu einigen Faktoren des ländlichen Lebens gesetzt, bei denen eine hohe Belastung mit mikrobiellen Stoffen erwartet wurde. Dabei zeigten sich signifikante Ergebnisse für die Nutzung von Stroh und Sägemehl auf dem Hof, ebenso wie für das Vorkommen eines Misthaufens und das Düngen von Feldern in Hausnähe. Die Ergebnisse fielen sehr inhomogen und zum Teil unerwartet aus. Wurden die Farmtiere mit Stroh gefüttert, zeigte sich bei den einjährigen Kindern dieser Farmen eine signifikant höhere IL-5-Konversionsrate als bei Kindern von Farmen ohne Strohnutzung. Die Konversion für IL-12 fiel allerdings ebenfalls bei den Kindern höher aus, auf deren Farmen Stroh als Tierfutter oder auch Einstreu im Stall benutzt wurde, so dass es zunächst so erscheint, als würde Kontakt mit Stroh eine vermehrte Produktion von sowohl Th1-als auch Th2-Zytokinen fördern. Bei genauerer Betrachtung der Daten fällt allerdings auf, dass lediglich in der Hälfte der Fälle ein Kind sowohl für IL-5 als

auch für IL-12 vermehrt konvertierte, in den restlichen Fällen betrafen die erhöhten Konversionsraten unterschiedliche Kinder. Stroh wurde auch in der PARSIFAL-Studie als möglicher Einflussfaktor auf die Entstehung allergischer Erkrankungen untersucht. Hierbei konnte eine negative Assoziation gesehen werden, während die Benutzung von Heu mit einer erhöhten Rate an Asthma und atopischer Sensibilisierung einherging [89]. Möglicherweise spielt die Art der mikrobiellen Besiedelung des jeweiligen Futters hierbei eine Rolle, wobei wohl auch die Art der Lagerung, also in gepresster Form oder frisch, einen Unterschied macht [347, 348]. Da Stroh aus den Halmen verschiedener Pflanzen wie Getreide, Hülsenfrüchten, Öl- oder Faserpflanzen besteht, wären Angaben zur genauen Zusammensetzung des Strohs auf den jeweiligen Höfen der Kinder dieser Arbeit für die Interpretation der Ergebnisse hilfreich gewesen. Möglicherweise unterschied sich die mikrobielle Besiedelung der unterschiedlichen Strohbestandteile voneinander und könnte so die inhomogenen Ergebnisse erklären. Es muss allerdings auch bedacht werden, dass meist noch andere Futterstoffe in derselben Scheune gelagert werden, die mit immunmodulatorischen Substanzen, wie z.B. Mycotoxinen, kontaminiert sein können [349-351], so dass auch hier je nach Zusammensetzung der unterschiedlichen Stoffe ein eher allergieprotektives oder eben –förderndes Milieu entstehen kann [89].

Die Nutzung von Sägemehl als Einstreu im Stall ging mit einer geringeren Konversionsrate von IFN- $\gamma$  bei den Kindern der betreffenden Höfe einher. Möglicherweise stellt Sägemehl mit seiner geringen Partikelgröße ein geeignetes Transportmedium für verschiedene Allergene dar, die so inhalativ aufgenommen werden [255, 315] und je nach Art und Menge des Antigens unterschiedliche Immunreaktionen auslösen können [210]. Die hier beobachtete niedrigere Konversionsrate für das Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  bei Sägemehlkontakt lässt eine eher allergiefördernde Wirkung vermuten, die im Tiermodell für den Kontakt mit niedrigen Allergendosen beobachtet werden konnte [246]. Möglicherweise enthält aber auch das Sägemehl an sich Epitope, die eine eher Th2-gerichtete Immunantwort auslösen können. Ebenfalls widersprüchlich erscheinende Ergebnisse zeigten sich in Bezug auf das Vorkommen eines Misthaufens in Hausnähe. Während hierbei die Konversionsraten für IL-5 fast doppelt so hoch ausfielen wie bei Kindern ohne Misthaufen in der Wohnumgebung, was eher eine vermehrte Rate an allergischen Erkrankungen erwarten lassen würde, zeigte sich eine umso höhere Konversion für TNF- $\alpha$ , je näher der Misthaufen am Haus lag. So lag die Responderrate der Non-Responder bei Geburt nach einem Jahr bei 100%, wenn der Misthaufen nur 10 m vom Haus entfernt lag. Bei einer Entfernung von 50 Metern betrug die

Konversionsrate nur noch die Hälfte. TNF- $\alpha$  ist ein proinflammatorisches Zytokin und wird den Th1-Zytokinen zugerechnet, was daher eher für einen allergieprotektiven Charakter des Misthaufens sprechen würde. Auch das Düngen von Feldern, die sich in weniger als 300 Metern Entfernung zum Wohnhaus befanden, konnte mit einer höheren Konversionsrate für das Th1-Zytokin IL-12 im ersten Lebensjahr der betreffenden Kinder in Verbindung gebracht werden. Sowohl Mist als auch Düngemittel enthalten eine Vielzahl an mikrobiellen Stoffen, deren Zusammensetzung von Interesse wäre, um den hier beobachteten Trend zu einem eher Th1-gewichteten Zytokinprofil mit vermutlich allergieprotektivem Potential genauer beurteilen und eventuell den einzelnen Bestandteilen zuschreiben zu können [144, 352]. Dafür bedarf es allerdings weiterer Studien.

Bei allen genannten Einflußfaktoren der ländlichen Umgebung muss natürlich bedacht werden, dass diese höchstwahrscheinlich schon auf die schwangere Mutter eingewirkt haben, so dass mögliche Effekte auf das Kind schon in utero bestanden haben können [51]. Somit können auch pränatal entstandene Sensibilisierungen oder Toleranzentwicklungen auf Umweltallergene das Zytokinantwortverhalten im ersten Lebensjahr beeinflusst haben.

### **5.3.3.7.3 Mikrobielle Stoffe im Haus und durch mütterliche Farmtätigkeiten**

Es fiel auf, dass der Großteil der Non-Responder für IL-12 während der Wochenbettzeit über 16 Stunden am Tag im Zimmer der Mutter war, und dass diese im Vergleich zu den Kindern mit kürzeren Aufenthaltszeiten im mütterlichen Zimmer nach einem Jahr signifikant weniger zu Respondern konvertierten. Ab dem zweiten Lebensmonat dagegen schliefen die meisten Non-Responder für IL-12 im eigenen Bett, nur wenige schliefen ganz oder teilweise im Elternbett. Auffallend war, dass letztere nach einem Jahr nahezu alle zu Respondern konvertierten, während die Responderrate der Kinder, die nur im eigenen Bett schliefen, lediglich 30% betrug.

Diese Ergebnisse scheinen zunächst widersprüchlich, da im ersten Fall der Aufenthalt im mütterlichen Bett eine geringere Th1-Konversion zu bewirken scheint, während dies im zweiten Fall genau umgekehrt ist.

Als allergieprotektive Faktoren im mütterlichen Bett, die eine erhöhte Th1-Konversion erwarten lassen würden [233-236], könnte die Endotoxinkonzentration in der Matratze

gesehen werden [173]. Diese scheint in Farmhaushalten höher zu liegen als bei Nichtfarmern [163, 164] und wurde schon in einigen Studien mit einer geringeren Rate an allergischen Erkrankungen bei den betreffenden Kindern assoziiert [56, 163, 164, 171, 260] – auch unabhängig vom Farmerstatus [353]. Auch die Haustierhaltung konnte mit erhöhten innerhäuslichen Endotoxinleveln in Verbindung gebracht werden [306-308], was sich jedoch nicht in allen Studien zeigte [173, 304, 305].

Es gibt allerdings auch zahlreiche andere Faktoren im häuslichen Bereich, die allergische Reaktionen auslösen und so den protektiven Endotoxineffekt aufheben können [105]. Dies konnte zum Beispiel schon mehrfach für eine hohe Belastung mit Hausstaubmilben gezeigt werden [314, 354-359], aber auch Katzenallergene oder Allergene von Farmtieren und Stallprodukten, die durch die auf der Farm arbeitenden Eltern ins Haus gebracht werden, könnten zur Ausbildung allergischer Reaktionen führen [164, 346] und somit Grund für niedrigere Th1-Level beim Kind sein [288-291]. Das könnte auch die deutlich niedrigere IL-12-Konversionsrate der Kinder erklären, deren Mütter in der Viehüberwachung und Medikamentengabe tätig waren. Es wäre interessant zu evaluieren, mit welchen Umweltstoffen die Mütter bei dieser Tätigkeit in Kontakt kamen und welche Antigene sie dadurch in das Wohnhaus und evtl. das eigene Bett brachten. Daten hierzu liegen leider nicht vor. Es wäre allerdings auch möglich, dass Kinder der betreffenden Mütter vermehrt zu deren Farmtätigkeiten mitgenommen wurden und daher selbst mit einer größeren Vielfalt mikrobieller Umweltstoffe, möglicherweise aber auch Substanzen wie Tierallergenen, Futterstoffen oder auch Pestiziden [340] in Berührung kamen, die in der Summe hier eine eher allergiefördernde Wirkung hatten [319, 326] und somit Grund für die niedrigeren Th1-Level waren [288-291]. Auch eine Belastung mit und möglicherweise Sensibilisierung auf diese Stoffe schon in utero kann nicht ausgeschlossen werden [149, 299], da die betreffenden Mütter die Viehbetreuung sehr wahrscheinlich nicht erst nach der Geburt begonnen, sondern schon vorher ausgeführt haben, und in mehreren Studien gezeigt werden konnte, dass Einflußfaktoren durch die Mutter im Zeitraum der Schwangerschaft einen größeren Effekt haben als nach der Geburt [51].

Bei Betrachtung der Schlafplatzsituation des Kindes stellt sich zudem die Frage, wo sich die Kinder mit kürzeren Aufenthaltszeiten im mütterlichen Bett sonst aufgehalten haben. Möglicherweise verbrachten sie mehr Zeit im Wohnraum oder im Kinderzimmer mit älteren Geschwistern, was sowohl das Spektrum an mikrobiellen Umweltstoffen, mit denen sie in Kontakt kamen, als auch die Gefahr einer Ansteckung mit Infektionen durch die

Geschwisterkinder erhöhte [37, 313] und somit in der Summe ein eher allergieprotektives Milieu [40, 89, 313, 323] mit einem Th1-gewichteten Zytokinprofil [233-236] geschaffen haben könnte.

Zu Bedenken gilt auch, dass die signifikant niedrigere IL-12-Konversion bei Kindern mit langen Aufenthaltszeiten im mütterlichen Bett während der Wochenbettzeit und bei Kindern von in der Viehüberwachung tätigen Müttern nach Stimulation mit LPS detektierbar war, die höhere IL-12-Konversionsrate der Kinder, die nach dem 2. Lebensmonat im elterlichen Bett schliefen, dagegen nach Stimulation mit SEB, so dass möglicherweise auch die verwendeten Stimulantien bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollten.

#### **5.3.3.7.4 Beeinflussung durch Verkehrsabgase**

Ein weiterer Umweltfaktor, der einen Einfluss auf die Entwicklung des Immunsystems im ersten Lebensjahr nehmen könnte, ist die Belastung durch Verkehrsabgase. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Frequenz des Traktorenverkehrs in der zum Wohnhaus führenden Straße mit signifikanten Unterschieden in der Konversionsrate für das Th2-Zytokin IL-5 assoziiert war. So zeigte sich bei einer Frequenz von bis zu fünf Traktorfahrten am Tag die höchste Konversionsrate, bei einer Frequenz von bis zu 25 mal täglich zeigten sich ebenfalls noch hohe Werte, während bei einer Frequenz von über 25 mal kaum noch Konversion stattfand.

Ein hohes Verkehrsaufkommen lässt eine erhöhte Belastung mit Feinstaub, Stickoxiden und anderen Abbauprodukten vermuten. Diese zeigten zwar nicht in allen Untersuchungen Auswirkungen auf die Atemwegsfunktion [338], konnten aber in einigen Studien durchaus mit einer erhöhten Rate an Asthma und anderen Atemwegssymptomen bei Kindern in Zusammenhang gebracht werden [326, 329, 331-337, 360, 361]. Eine hierbei zu erwartende erhöhte Th2-Antwort [1] konnte bei Duramad et al bei Exposition mit Stickstoffdioxid gesehen werden [197]. Auch Erwachsene zeigten nach vierstündiger Exposition mit Stickstoffdioxid eine Hochregulation von Th2-Zytokinen [362], so dass die hohe IL-5-Responderrate unter den Kindern mit regem Traktorenverkehr in der unmittelbaren Wohnumgebung mit diesen Ergebnissen kongruent wäre. Die geringere Konversionsrate der Kinder, in deren Umgebung mehr als 25 mal am Tag Traktorenverkehr herrschte, stellt dagegen ein eher unerwartetes Ergebnis dar, wobei man bedenken muss, dass mit n=4 eine nur sehr geringe Fallzahl herangezogen wurde, die bei Testverfahren mit unsteten Variablen

nur eingeschränkte Interpretationsmöglichkeiten zulässt. Gegebenenfalls lassen Auswertungen am gesamten Datenmaterial aller beteiligten Studienzentren genauere Aussagen zu.



## 6 Zusammenfassung

**Hintergrund:** Die in den letzten Jahrzehnten deutlich werdende Zunahme allergischer Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter gab Anlass zur Durchführung zahlreicher Studien, die die genetischen und immunologischen Faktoren, aber auch mögliche Risikofaktoren und protektive Konstellationen im Lebensumfeld der betreffenden Kinder zu ermitteln versuchten. Dabei konnte mehrfach ein allergie-protektiver Effekt für das Leben im ländlichen Bereich, insbesondere auf Bauernhöfen, gesehen werden. Die zugrundeliegenden Mechanismen und ihr Bezug zu den verschiedenen Faktoren im Bauernhofumfeld sind jedoch noch in vielen Punkten unklar. In diesem Rahmen entstand daher das PASTURE-Projekt („Protection against Allergy: A Study in Rural Environment“), eine prospektive longitudinale Studie, die in fünf europäischen Ländern (Deutschland, Österreich, Schweiz, Frankreich und Finnland) durchgeführt wurde, und sowohl umfassende genetische und immunologische Daten der Bauern- und Nicht-Bauern-Kinder, als auch mikrobiologische und familiäre Einflußfaktoren ihres Lebensumfelds zum Zeitpunkt der Geburt und am Ende des ersten Lebensjahrs erhob.

**Zielsetzung:** Gegenstand dieser Arbeit war es, anhand der Subpopulation der deutschen Probanden neben der Darstellung des unterschiedlichen Zytokin-Sekretionsprofils der Bauern- und Nicht-Bauern-Kinder zum Zeitpunkt der Geburt und nach einem Jahr, auch den dynamischen Verlauf dieser Zytokinentwicklung darzustellen und mit Einflußfaktoren aus den Bereichen Schwangerschaftsexposition der Mutter, Umwelt, Ernährung und Gesundheitszustand von Mutter und Kind in einen möglichen Zusammenhang zu bringen.

**Methoden:** In der vorliegenden Arbeit wurde eine Subpopulation von 108 Kindern, bestehend aus 50 Bauern- und 58 Nicht-Bauern-Kindern, verwendet. Anhand mehrerer standardisierter Fragebögen wurden umfassende Daten zu Lebensumständen, Ernährungsgewohnheiten und Gesundheitszustand von Mutter, Vater und Kind erhoben. Für die Bestimmung der Zytokine wurde plazentares Nabelschnurblut und peripheres Vollblut der einjährigen Kinder entnommen und jeweils mit Lipopolysaccharid, Staphylokokken Enterotoxin B und Phorbol ester/Ionomycin stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 24h bzw. 48h wurden die Überstände entnommen und die Zytokine IL-5, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  mittels ELISA quantitativ erfasst.

**Ergebnisse:** Insgesamt fiel eine breite Streuung der Zytokinkonzentrationen mit zahlreichen Nullwerten (v.a. für IL-5 und IL-10) auf, die Berechnung der Mediane erfolgte daher unter Ausschluss dieser. Die 48h-Median-Werte von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  lagen im Allgemeinen sowohl bei Geburt als auch nach einem Jahr höher als die 24 h-Werte, IL-10 zeigte zum Teil niedrigere Werte nach 48 h und IL-5 und IL-12 zeigten keine Veränderung bezüglich des Stimulationszeitpunktes. Die 1-Jahres Mediane lagen - außer bei IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit PI - über denen der Geburtsmediane und bezüglich des Bauernstatus zeigten sich bei Geburt für IL-10 und TNF- $\alpha$  niedrigere Werte bei den Bauern, höhere dagegen für IFN- $\gamma$ , IL-12 und IL-5. Die 1-Jahreswerte der Bauern und Nicht-Bauern unterschieden sich nicht voneinander, ebenso bestand kein Unterschied in der Anzahl der detektierbaren Werte zu beiden Zeitpunkten. Es konnte nur für IL-5 (PI) und IL-12 (SEB) ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der 1-Jahres-Responder (=Kinder mit positiven Zytokinwerten) in Abhängigkeit vom Geburts-Responderstatus gesehen werden.

Die Entwicklung der Non-Responder bei Geburt zum Responder nach einem Jahr, wurde mit verschiedenen Faktoren aus den Bereichen Ernährung, Gesundheit und Lebensumfeld von Mutter und Kind korreliert. Dabei waren bezüglich mütterlicher Faktoren erhöhte Konversionsraten für IL-5 mit „niedriger Schulbildung“ assoziiert, niedrige dagegen mit „Allergenmeidung aufgrund von Allergien in der Familie“, „Ekzem des Vaters der Mutter“, „Allergie der Mutter in der Schwangerschaft“, „Antibiotikaeinnahme der Mutter in der Schwangerschaft“ und „Verzehr saurer Speisen und Getränke in der Stillzeit“. Erhöhte IL-12-Konversion zeigte sich für „Vorhandensein weiterer eigener Kinder“, „spastische Bronchitis in der Kindheit“ und „Infektionen während der Schwangerschaft“, niedrige IL-12-Konversion dagegen für „Neurodermitis in der Vorgeschichte“, „Frischmilchkonsum in der Schwangerschaft“, „Verzehr scharfer Gewürze in der Stillzeit“, „Verzehr von Koffein in der Stillzeit“, und „Tätigkeit in der Viehüberwachung und Medikamentengabe“. Erhöhte Konversion für TNF- $\alpha$  ergab sich für „Kindheit der Mutter auf einem Hof“ und „Verzehr von Koffein in der Stillzeit“, niedrige IFN- $\gamma$ -Konversion für „Vorhandensein weiterer eigener Kinder“, „Kindheit der Mutter auf einem Hof“ und „vaginale Pilzinfektion in der Schwangerschaft“. Hinsichtlich kindlicher Faktoren fand sich eine Assoziation von erhöhter IL-12-Konversionrate mit „keuchendem Atmen bis zum 2. Lebensmonat“, „Neugeborenenexanthem bis zum 2. Lebensmonat“ und „Verzehr von Fisch“, und von niedriger IL-12-Konversion mit „Wochenbettzeit über 16 Stunden täglich im mütterlichen Bett“ und „eigenes Bett als Schlafplatz ab dem 2. Lebensmonat“. Die IFN- $\gamma$ -Konversion war

erhöht bei „H-Milchkonsum“ und erniedrigt bei „Verzehr von Zitrusfrüchten“, während IL-5 eine erhöhte Konversionsrate für „Hautausschlag in der ersten Lebenswoche“ und eine erniedrigte Rate für „Antibiotikaeinnahme ab dem 2. Lebensmonat“ zeigte. „Stallaufenthalt im 2. Lebensmonat“ war bei einer Dauer von mehr als drei Tagen pro Woche und keinem Tag pro Woche assoziiert mit hoher IL-5 Konversion im Vergleich zu mittleren Aufenthaltsdauern. Bezüglich Faktoren aus dem Lebensumfeld der Kinder fiel eine erhöhte IL-5-Konversionsrate für „Stroh als Futter“, „Misthaufen in Wohnungsnähe“, „Nutzung einer Zentralheizung“ und „Traktorenverkehr in der Straße mit einer Frequenz bis 25 mal täglich“ auf, eine erniedrigte IL-5-Konversion für „Nutzung einer Holz-, Kohle- oder Einzelraumheizung“. Erhöhte IL-12-Konversion waren assoziiert mit „Stroh als Tierfutter oder Einstreu“, „Gedüngten Feldern in Wohnungsnähe“ und „Zwei weiteren Kindern im Haushalt“ (im Vergleich zu einem bzw. drei oder mehr Kindern), erniedrigte IL-12-Konversion mit „Katze als Haustier“. Eine erniedrigte IFN- $\gamma$ -Konversion fiel für „Sägemehl als Einstreu“ auf, eine erniedrigte TNF- $\alpha$ -Konversion für „Nutzung einer Einzelraumheizung“ und eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Konversion für „Misthaufen in weniger als 10 oder mehr als 50 Metern Entfernung zum Haus“.

### **Schlussfolgerung:**

Das häufigere Auftreten von Zytokinen oberhalb der Nachweisgrenze und die insgesamt höheren Medianwerte nach einem Jahr beruhen möglicherweise auf einer gewissen Unreife des kindlichen Immunsystems bei Geburt. Eine Ausnahme bildeten IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  mit höheren Werten im Nabelschnurblut, was der bisherigen Annahme eines eher Th2-gewichteten Zytokinprofils bei Geburt eher widerspricht. Auch eine Stimulantenabhängigkeit bezüglich der Messwerte muss bedacht werden, zeigten sich doch für die Stimulation mit PI zum Teil höhere Medianwerte als für SEB oder LPS. Die bei den Bauern (tendenziell) signifikant höheren Geburtswerte für IFN- $\gamma$  und IL-12 lassen zwar die erwartete Th1-Dominanz erkennen, die ebenfalls erhöhten IL-5-Werte wären im Sinne einer Th2-Gewichtung jedoch eher bei den Nicht-Bauernkindern zu erwarten gewesen, bei denen dagegen höhere Werte für das regulatorische Zytokin IL-10 und das Th1-Zytokin TNF- $\alpha$  auffielen. Erstaunlicherweise konnten keine Unterschiede nach einem Jahr festgestellt werden, was bei dem vielfach postulierten allergie-protectiven Effekt des Bauernstatus anzunehmen gewesen wäre.

Die Ergebnisse zu möglichen Einflußfaktoren auf die Zytokinentwicklung fielen sehr inhomogen und zum Teil unerwartet aus. Der in Studien gezeigte protektive Effekt von Faktoren wie Stallaufenthalt, regelmäßigem Farmtierkontakt, Haustierhaltung, Verzehr hofeigener Milchprodukte und hohem Endotoxingehalt im Lebensumfeld konnte hier nur teilweise im Sinne einer Th1-Gewichtung der Zytokinentwicklung der davon betroffenen Kinder gezeigt werden. Auch die Ergebnisse bezüglich mikrobieller Umweltstoffe in der Lebensumgebung, Ernährungsgewohnheiten von Mutter und Kind, familiärer Vorbelastung bezüglich allergischer Erkrankungen und Infektionen von Mutter und Kind fielen sehr unterschiedlich aus: teilweise zeigte sich eine Gewichtung in die eine oder andere Richtung, zum Teil waren aber sowohl Th1- als auch Th2-Zytokine erhöht. Bei all diesen Einflüssen bleibt jedoch letztlich unklar, welches die genauen Bestandteile sind, die für die beobachteten Effekte verantwortlich sind, und wie sie sich gegenseitig beeinflussen. Auch ist unklar, ob die Menge eines Allergens ausschlaggebend dafür ist, ob sich ein eher Th1- oder Th2-gewichtetes Zytokinprofil entwickelt, oder ob der Art der Aufnahme (inhalativ, oral) eine besondere Bedeutung zukommt. Auch der Zeitpunkt der Exposition (Schwangerschaft, Stillzeit, frühe Kindheit) und die generelle genetische Prädisposition der einzelnen Kinder dürfen nicht außer Acht gelassen werden. Genauere Untersuchungen zu den einzelnen Faktoren mit all ihren Einflüssen sollten daher in weiteren Studien erfolgen. Letztlich entscheidet wahrscheinlich auch die Summe aller beeinflussenden Faktoren, ob ein Milieu als allergieprotektiv oder – fördernd gilt. Daher wäre es hilfreich, die in dieser Arbeit beobachteten Assoziationen von Einflußfaktoren und Zytokinentwicklungen in weiteren multivariaten Analysen am gesamten, größeren PASTURE-Probandenkollektiv aller Länder auf mögliche Abhängigkeiten zu überprüfen, da die Fallzahlen dieser Studie für zuverlässige Aussagen zum Teil zu klein ausfielen. Die hier erhobenen Daten erstrecken sich zudem auf einen vergleichsweise kurzen Beobachtungszeitraum von nur einem Jahr und könnten durch Langzeitbeobachtungen sinnvoll ergänzt werden. Auch sollte nicht vergessen werden, dass aufgrund verschiedener verwendeter Stimulantien und Stimulationszeiten in den sich mit diesem Thema befassenden unterschiedlichen Studien eine Beeinflussung der Ergebnisse stattgefunden haben kann und die Studien dahingehend nur eingeschränkt miteinander verglichen werden können.

## 7 Anhang

### 7.1 Literaturverzeichnis

1. Mosmann, T.R., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.* J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
2. Janeway, C.A., Jr., *Immunobiology. The Immune System in Health and Disease.* 5th ed. ed, ed, P.W. Travers, M.; Shlomchik, M. 2001, New York. 74-75.
3. Renz, H.u.H.U., *The bidirectional capacity of bacterial antigens to modulate allergy and asthma.* Eur Respir J, 2002. **19**(1): p. 158-71.
4. Piccinni, M.P., et al., *Role of hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines in successful pregnancy.* J Neuroimmunol, 2000. **109**(1): p. 30-3.
5. Romagnani, S., *The Th1/Th2 paradigm.* Immunol.Today, 1997. **18**: p. 263-266.
6. Parronchi, P., et al., *Genetic and environmental factors contributing to the onset of allergic disorders.* Int Arch Allergy Immunol, 2000. **121**(1): p. 2-9.
7. Romagnani, S., *Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance.* J Allergy Clin Immunol,, 2004. **113**(3): p. 395-400.
8. Del Prete, G., *The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans.* Int.Rev.Immunol, 1998. **16**: p. 427-455.
9. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes.* Nature, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
10. Geha, R.S., H.H. Jabara, and S.R. Brodeur, *The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 721-32.
11. Gould, H.J.e.a., *The biology of IGE and the basis of allergic disease.* Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 579-628.
12. Martinez, F.D.a.H., P.G. , *Role of microbial burden in aetiology of allergy and asthma.* Lancet, 1999. **354 Suppl 2**: p. SII12-5.
13. Renz, H.e.a., *T(H)1/T(H)2 immune response profiles differ between atopic children in eastern and western Germany.* J Allergy Clin Immunol,, 2002. **109**(2): p. 338-42.
14. Bullens, D.M., et al., *Allergen-specific T cells from birch-pollen-allergic patients and healthy controls differ in T helper 2 cytokine and in interleukin-10 production.* Clin Exp Allergy, 2004. **34**(6): p. 879-87.
15. van Reijssen, F.C., et al., *Skin-derived aeroallergen-specific T-cell clones of Th2 phenotype in patients with atopic dermatitis.* J Allergy Clin Immunol, 1992. **90**(2): p. 184-93.
16. Karagiannidis, C., et al., *Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma.* J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(6): p. 1425-33.
17. Eder, W.a.v.M., E., *Hygiene hypothesis and endotoxin: what is the evidence?* Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2004. **4**(2): p. 113-7.
18. Weiner, H., *Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells.* Immunol Rev, 2001. **182**(182): p. 207-214.
19. Akdis M, B.K., Akdis CA, *T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases.* J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**: p. 961-968.
20. Prescott, S.L., *New concepts of cytokines in asthma: is the Th2/Th1 paradigm out the window?* J Paediatr Child Health, 2003. **39**(8): p. 575-9.
21. Macaubas, C., et al., *Association between antenatal cytokine production and the development of atopy and asthma at age 6 years.* Lancet, 2003. **362**(9391): p. 1192-7.
22. Wegmann TG, L.H., Guilbert L, Mosmann TR, *Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon?* Immunol Today, 1993. **14**(7): p. 353-6.

23. Jenkins C, R.J., Wilson R, MacLean MA, Shilito J, Walker JJ., *Evidence of a T(H) 1 type response associated with recurrent miscarriage*. *Fertil Steril*, 2000. **73**(6): p. 1206-8.
24. Chalmers IM, J.G., Contreras M, Navarrete C., *Intracellular cytokine profile of cord and adult blood lymphocytes*. *Blood*, 1998. **92**(1): p. 11-8.
25. Holt, P., *Postnatal maturation of immune competence during infancy and childhood*. *Pediatr Allergy Immunol*, 1995. **6**(2): p. 59-70.
26. Scott ME, K.M., Kohl S, *High level interleukin-12 production, but diminished interferon-gamma production, by cord blood mononuclear cells*. *Pediatr Res*, 1997. **41**(4 PT 1): p. 547-53.
27. Holt, P.G., et al., *Drug development strategies for asthma: in search of a new paradigm*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(7): p. 695-8.
28. Ramsey, C.D.a.J.C.C., *The hygiene hypothesis and asthma*. *Curr Opin Pulm Med*, 2005. **11**(1): p. 14-20.
29. Hagedorens, M.M., et al, *Prenatal exposure to house dust mite allergen (Der p1), cord blood T cell phenotype and cytokine production and atopic dermatitis during the first year of life*. *Pediatr Allergy Immunol*, 2004. **15**(4): p. 308-15.
30. Prescott, S.L., et al, *Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children*. *Lancet*, 1999. **353**(9148): p. 196-200.
31. von Mutius, E., *Paediatric origins of adult lung disease*. *Thorax*, 2001. **56**(2): p. 153-7.
32. Illi, S., et al, *The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma*. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. **113**(5): p. 925-31.
33. Del Giudice, M.M., A. Rocco, and C. Capristo, *Probiotics in the atopic march: highlights and new insights*. *Dig Liver Dis*, 2006. **38 Suppl 2**: p. S288-90.
34. Hahn, E.L.a.L.B.B., *The atopic march: the pattern of allergic disease development in childhood*. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2005. **25**(2): p. 231-46.
35. Lauener, R.a.P.E., *The course of allergy: principles for early diagnosis, prevention and early therapy of allergic diseases*. *Ther Umsch*, 2001. **58**(5): p. 262-5.
36. Bach, J.F., *The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(12): p. 911-20.
37. Strachan, D.P., *Hay fever, hygiene, and household size*. *British Medical Journal*, 1989. **299**: p. 1259-1260.
38. Werner, S., et al., *The incidence of atopic dermatitis in school entrants is associated with individual life-style factors but not with local environmental factors in Hannover, Germany*. *Br J Dermatol*, 2002. **147**(1): p. 95-104.
39. McKinney, P.A., et al., *Early social mixing and childhood Type 1 diabetes mellitus: a case-control study in Yorkshire, UK*. *Diabet Med*, 2000. **17**(3): p. 236-42.
40. Ball, T.M., et al., *Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(8): p. 538-43.
41. Hampe, J., et al., *Association of inflammatory bowel disease with indicators for childhood antigen and infection exposure*. *Int J Colorectal Dis*, 2003. **18**(5): p. 413-7.
42. Bach, J.F., *Six questions about the hygiene hypothesis*. *Cell Immunol*, 2005. **233**(2): p. 158-61.
43. von Mutius, E., et al., *Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison*. *Bmj*, 1992. **305**(6866): p. 1395-9.
44. von Mutius, E., et al., *Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994. **149**(2 Pt 1): p. 358-64.
45. Nowak, D., et al., *Prevalence of respiratory symptoms, bronchial hyperresponsiveness and atopy among adults: west and east Germany*. *Eur Respir J*, 1996. **9**(12): p. 2541-52.
46. Weiland, S.K., et al., *Prevalence of respiratory and atopic disorders among children in the East and West of Germany five years after unification*. *Eur Respir J*, 1999. **14**(4): p. 862-70.
47. Klugman, K.P., et al., *A trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with and those without HIV infection*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(14): p. 1341-8.

48. Lynch, N.R., et al., *Effect of anthelmintic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum*. J Allergy Clin Immunol, 1993. **92**(3): p. 404-11.
49. van den Biggelaar, A.H., et al., *Long-term treatment of intestinal helminths increases mite skin-test reactivity in Gabonese schoolchildren*. J Infect Dis, 2004. **189**(5): p. 892-900.
50. Peters, M., et al., *Inhalation of stable dust extract prevents allergen induced airway inflammation and hyperresponsiveness*. Thorax, 2006. **61**(2): p. 134-9.
51. Ege, M.J., et al., *Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(4): p. 817-23.
52. Gereda, J.E., et al., *Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma*. Lancet, 2000. **355**(9216): p. 1680-3.
53. Schram, D., et al., *Bacterial and fungal components in house dust of farm children, Rudolf Steiner school children and reference children--the PARSIFAL Study*. Allergy, 2005. **60**(5): p. 611-8.
54. Remes, S.T., et al., *Dog exposure in infancy decreases the subsequent risk of frequent wheeze but not of atopy*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(4): p. 509-15.
55. Perzanowski, M.S., et al., *Effect of cat and dog ownership on sensitization and development of asthma among preteenage children*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(5): p. 696-702.
56. Ownby, D.R., C.C. Johnson, and E.L. Peterson, *Exposure to dogs and cats in the first year of life and risk of allergic sensitization at 6 to 7 years of age*. Jama, 2002. **288**(8): p. 963-72.
57. Ronmark, E., et al., *Four-year incidence of allergic sensitization among schoolchildren in a community where allergy to cat and dog dominates sensitization: report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Study Group*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(4): p. 747-54.
58. Nafstad, P., et al., *Exposure to pets and atopy-related diseases in the first 4 years of life*. Allergy, 2001. **56**(4): p. 307-12.
59. Nafstad, P., P. Magnus, and J.J. Jaakkola, *Early respiratory infections and childhood asthma*. Pediatrics, 2000. **106**(3): p. E38.
60. Zirngibl, A., et al., *Exposure to pets and atopic dermatitis during the first two years of life. A cohort study*. Pediatr Allergy Immunol, 2002. **13**(6): p. 394-401.
61. Wickens, K., et al., *Farm residence and exposures and the risk of allergic diseases in New Zealand children*. Allergy, 2002. **57**(12): p. 1171-9.
62. Wahn, U., et al., *Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life*. J Allergy Clin Immunol, 1997. **99**(6 Pt 1): p. 763-9.
63. Almqvist, C., et al., *Direct and indirect exposure to pets - risk of sensitization and asthma at 4 years in a birth cohort*. Clin Exp Allergy, 2003. **33**(9): p. 1190-7.
64. Apelberg, B.J., Y. Aoki, and J.J. Jaakkola, *Systematic review: Exposure to pets and risk of asthma and asthma-like symptoms*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(3): p. 455-60.
65. Waser, M., et al., *Exposure to pets, and the association with hay fever, asthma, and atopic sensitization in rural children*. Allergy, 2005. **60**(2): p. 177-84.
66. Kalliomäki M, K.P., Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E., *Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**: p. 129-34.
67. Marko Kalliomäki, S.S., Heikki Arvilommi, Pentti Kero, Pertti Koskinen, Erika Isolauri, *Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial*. Lancet, 2001. **357**(9262): p. 1055-1140
68. Abrahamsson TR, J.T., Böttcher MF, Fredrikson M, Jenmalm MC, Björkstén B, Oldaeus G., *Probiotics in prevention of IgE-associated eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(5): p. 1174-80.

69. Björkstén B, N.P., Sepp E, Mikelsaar M., *The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children*. Clin Exp Allergy, 1999. **29**(3): p. 342-6.
70. Kalliomäki, M.S., S; Arvilommi, H; Kero, P; Koskinen, P; Isolauri, E, *Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial*. Lancet, 2001. **357**(9262): p. 1055-1140
71. Salminen S, B.C., Boutron-Ruault MC, et al., *Functional food science and gastrointestinal physiology and function*. Br J Nutr, 1998. **80** (suppl 1): p. 147–71.
72. Kukkonen K, S.E., Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela R, Poussa T, Tuure T, Kuitunen M., *Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(1): p. 192-8.
73. Noverr, M.H., GB, *The 'microflora hypothesis' of allergic diseases*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**(12): p. 1511-20.
74. Taylor, A.D., JA; Prescott, SL, *Probiotic supplementation for the first 6 months of life fails to reduce the risk of atopic dermatitis and increases the risk of allergen sensitization in high-risk children: a randomized controlled trial*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(1): p. 184-91.
75. Vancíková, Z.L.-Z., R; Radl, J; Tlaskalová-Hogenová, H, *The early postnatal development of salivary antibody and immunoglobulin response in children orally colonized with a nonpathogenic, probiotic strain of E. coli*. Folia Microbiol (Praha), 2003. **48**(2): p. 281-7.
76. Kopp, M.G., M; Dietschek, A; Sofke, J; Heinzmann, A; Urbanek, R, *Lactobacillus GG has in vitro effects on enhanced interleukin-10 and interferon-gamma release of mononuclear cells but no in vivo effects in supplemented mothers and their neonates*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**(4): p. 602-10.
77. Havenaar, R.H.i.t.V., JHJ, *Lactic acid bacteria in health and disease. Vol 1 of the Series, The Lactic Acid Bacteria; Elsevier Applied Science Publishers Probiotics: a general view*. In: Wood BJB, ed., 1992: p. 151-70.
78. Isolauri, E.M., H; Arvola, T; Rantala, I; Virtanen, E; Arvilommi, H, *Lactobacillus casei strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats*. Gastroenterology, 1993. **105**: p. 1643–50.
79. Majamaa, H.I., E, *Evaluation of the gut mucosal barrier: evidence for increased antigen transfer in children with atopic eczema*. J Allergy Clin Immunol, 1996. **97**: p. 985-90.
80. Smits, H.E., A; van der Kleij, D; de Jong, EC; Schipper, K; van Capel, TM; Zaat, BA; Yazdanbakhsh, M; Wierenga, EA; van Kooyk, Y; Kapsenberg, ML, *Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(6): p. 1260-7.
81. Pessi, T.S., Y; Marttinen, A; Isolauri, E, *Probiotics reinforce mucosal degradation of antigens in rats: implications for therapeutic use of probiotics*. J Nutr, 1998. **128**: p. 2313–18.
82. Kopp, M.H., I; Heinzmann, A; Urbanek, R, *Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of probiotics for primary prevention: no clinical effects of Lactobacillus GG supplementation*. Pediatrics, 2008. **121**(4): p. e850-6.
83. Kalliomäki, M.S., S; Poussa, T; Arvilommi, H; Isolauri, E, *Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial*. Lancet, 2003. **361**(9372): p. 1869-71.
84. Kalliomäki, M.S., S; Poussa, T; Isolauri, E, *Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(4): p. 1019-21.
85. Rachmilewitz, D.K., K; Karmeli, F; Hayashi, T; Reinus, C; Rudensky, B; Akira, S; Takeda, K; Lee, J; Takabayashi, K; Raz, E, *Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis*. Gastroenterology, 2004. **126**(2): p. 520-8.



86. Vaarala, O., *Immunological effects of probiotics with special reference to lactobacilli*. Clin Exp Allergy, 2003. **33**(12): p. 1634-40.
87. Zeuthen, L.C., HR; Frokiaer, H, *Lactic acid bacteria inducing a weak Interleukin-12 and Tumor Necrosis Factor Alpha response in human dendritic cells inhibit strongly stimulating lactic acid bacteria but act synergistically with gram negative bacteria*. Clin Vaccine Immunol, 2005. **13**: p. 365-75.
88. Riedler, J., et al., *Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey*. Lancet, 2001. **358**(9288): p. 1129-33.
89. Ege, M.J., et al, *Not all farming environments protect against the development of asthma and wheeze in children*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(5): p. 1140-7.
90. Asher, M.I., et al., *International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods*. Eur Respir J, 1995. **8**(3): p. 483-91.
91. Ferris, B., *Recommended respiratory disease questionnaires for use with adults and children in epidemiological research*. Am Rev Respir Dis, 1978. **188**: p. 1-79.
92. Blettner M, H.C., Razum O, *Critical reading of epidemiological papers*. Eur.J.Public Health, 2001. **11**: p. 97-101.
93. De Groote, D., et al., *Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation*. Cytokine, 1992. **4**(3): p. 239-48.
94. Hodge, G., Hodge S., Han, P., *Increased levels of apoptosis of leukocyte subsets in cultured PBMCs compared to whole blood as shown by Annexin V binding: relevance to cytokine production*. Cytokine, 2000. **12**(12): p. 1763-8.
95. Yaqoob, P., E.A. Newsholme, and P.C. Calder, *Comparison of cytokine production in cultures of whole human blood and purified mononuclear cells*. Cytokine, 1999. **11**(8): p. 600-5.
96. Miles, E.A., L. Bakewell, and P.C. Calder, *Production of lymphocyte-derived cytokines by whole umbilical cord blood cultures stimulated with mitogens and allergens*. Cytokine, 2003. **21**(2): p. 74-83.
97. Lagrelius, M., et al., *Cytokine detection by multiplex technology useful for assessing antigen specific cytokine profiles and kinetics in whole blood cultured up to seven days*. Cytokine, 2006. **33**(3): p. 156-65.
98. Campbell, D.E.a.A.S.K., *Proliferation and production of interferongamma (IFN-gamma) and IL-4 in response to Staphylococcus aureus and staphylococcal superantigen in childhood atopic dermatitis*. Clin Exp Immunol, 1997. **107**(2): p. 392-7.
99. Konig, B., K. Neuber, and W. Konig, *Responsiveness of peripheral blood mononuclear cells from normal and atopic donors to microbial superantigens*. Arch Allergy Immunol, 1995. **106**(2): p. 124-33.
100. Couturier, C., et al., *Binding sites for endotoxins (lipopolysaccharides) on human monocytes*. J Immunol, 1991. **147**(6): p. 1899-904.
101. West, M., Heagy, W., *Endotoxin tolerance: A review*. Crit. Care Med., 2002. **30**: p. 64-73.
102. Liu, C.a.T.E.H., *Characterization of ionomycin as a calcium ionophore*. J Biol Chem, 1978. **253**(17): p. 5892-4.
103. Lee, G.a.M.G., *Dual modes of control of c-fos mRNA induction by intracellular calcium in T cells*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(7): p. 4579-87.
104. Morley, S.J., *Signalling through either the p38 or ERK mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway is obligatory for phorbol ester and T cell receptor complex (TCR-CD3)-stimulated phosphorylation of initiation factor (eIF) 4E in Jurkat T cells*. FEBS Lett, 1997. **418**(3327-32).
105. Waser, M., Schierl, R., von Mutius, E., Maisch, S., Carr, D., Riedler, J., Eder, W., Schreuer, M., Nowak, D., Braun-Fahrlander, C., *Determinants of endotoxin levels in living environments of farmers' children and their peers from rural areas*. Clin. Exp. Allergy, 2004. **34**: p. 389-397.
106. Prescott, S.L., et al., *Developing patterns of T cell memory to environmental allergens in the first two years of life*. Int Arch Allergy Immunol, 1997. **113**(1-3): p. 75-79.

107. Engvall, E.a.P.P., *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 1971. **8**(9): p. 871-4.
108. Lequin, R.M., *Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Clin Chem, 2005. **51**(12): p. 2415-8.
109. Schuurs, A.H.a.B.K.v.W., *Enzyme-immunoassay: a powerful analytical tool*. J Immunoassay, 1980. **1**(2): p. 229-49.
110. Van Weemen, B.K.a.A.H.S., *Immunoassay using antigen-enzyme conjugates*. FEBS Lett, 1971. **15**(3): p. 232-236.
111. Favre, N., G. Bordmann, and W. Rudin, *Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR*. J Immunol Methods, 1997. **204**(1): p. 57-66.
112. van dV, V., Laan MP, Baert MR, de Waal MR, Neijens HJ, Savelkoul HF, *Selective development of a strong Th2 cytokine profile in high-risk children who develop atopy: risk factors and regulatory role of IFN-gamma, IL-4 and IL-10*. Clin.Exp.Allergy, 2001. **31**: p. 997-1006.
113. Rowe J, H.T., Kusel M, Suriyaarachchi D, Serralha M, Holt BJ, de Klerk N, Sly PD, Holt PG, *High IFN-gamma production by CD8+ T cells and early sensitization among infants at high risk of atopy*. J.Allergy Clin.Immunol., 2004. **13**: p. 710-716.
114. Sharp MJ, R.J., Kusel M, Sly PD, Holt PG, *Specific patterns of responsiveness to microbial antigens staphylococcal enterotoxin B and purified protein derivative by cord blood mononuclear cells are predictive of risk for development of atopic dermatitis*. Clin Exp Allergy, 2003. **33**: p. 435-441.
115. Jacob, C.O., et al., *Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(3): p. 1233-7.
116. Molvig, J., et al., *Endotoxin-stimulated human monocyte secretion of interleukin 1, tumour necrosis factor alpha, and prostaglandin E2 shows stable interindividual differences*. Scand J Immunol, 1988. **27**(6): p. 705-16.
117. Sullivan Dillie KT, T.C., Dasilva DF, Pappas TE, Roberg KA, Carlson-Dakes KT, Evans MD, Rosenthal LA, Gangnon RE, Gern JE, Lemanske RF Jr., *The influence of processing factors and non-atopy-related maternal and neonate characteristics on yield and cytokine responses of cord blood mononuclear cells*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**(2): p. 298-304.
118. Smillie FI, E.A., Patel F, *Lymphoproliferative responses in cord blood and at one year: no evidence for the effect of in utero exposure to dust mite allergens*. Clin Exp Allergy, 2001. **31**: p. 1194-204.
119. Devereux G, B.R., *Studies of cord blood mononuclear cell responses and allergy: still in their infancy?* Clin Exp Allergy, 2002. **32**: p. 331-4.
120. Lemanske RF, J., *The childhood origins of asthma (COAST) study*. Pediatr Allergy Immunol, 2002. **15** (Suppl.): p. 38-43.
121. Noakes PS, H.P., Prescott SL, *Maternal smoking in pregnancy alters neonatal cytokine responses*. Allergy, 2003. **58**: p. 1053-8.
122. Smart JM, K.A., *Ontogeny of T-helper 1 and T-helper 2 cytokine production in childhood*. Pediatr Allergy Immunol, 2001. **12**: p. 181-7.
123. Kawamoto N, k.H., Takemura M, Seishima M, Sakurai S, Fukao T, Kasahara K, Iwasa S, Kondo N, *Age-related changes in intracellular cytokine profiles and Th2 dominance in allergic children*. Pediatric Allergy and Immunology, 2006. **17**(2): p. 125-133.
124. Schnurr M, T.F., Galambos P, Scholz C, Siegmund B, Endres S, Eigler A, *Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells*. J Immunol, 2000. **165**: p. 4704-4709.
125. Hernandez-Pando R, R.G., *The role of TNF-alpha in T-cell-mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance*. Immunology, 1994. **82**: p. 591-595.
126. Shah A, C.M., Holgate ST, *Tumour necrosis factor alpha: a potential mediator of asthma*. Clin Exp Allergy, 1995. **25**: p. 1038-1044.

127. Silver RM, L.W., Daynes RA, Mitchell MD, Branch DW, *Lipopolysaccharide-induced fetal death: the role of tumor-necrosis factor alpha*. Biol. Reprod., 1994. **50**: p. 1108-1112.
128. Prescott SL, T.A., King B, Dunstan J, Upham JW, Thornton CA, Holt PG, *Neonatal interleukin-12 capacity is associated with variations in allergen-specific immune responses in the neonatal and postnatal periods*. Clin Exp. Allergy, 2003. **33**: p. 566-572.
129. Malamitsi-Puchner A, P.E., Boutsikou T, Makrakis E, Sarandakou A, Creatsas G, *The influence of the mode of delivery on circulating cytokine concentrations in the perinatal period*. Early Human Development, 2005. **81**(4): p. 387-392.
130. Protonotariou E, M.-P.A., Rizos D, Sarandakou A, Makrakis E, Salamolekis E, *Alterations in Th1/Th2 cytokine concentrations in early neonatal life*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2003. **14**(6): p. 407-10.
131. Jeannin P, L.S., Delneste Y, Gauchat JF, Bonnefoy JY, *IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10*. J Immunol, 1998. **160**: p. 3555-3561.
132. Hartl D, K.B., Mehlhorn A, *Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25high regulatory T cells in pediatric asthma*. J.Allergy Clin.Immunol., 2007. **119**: p. 1258-1266.
133. De Waal MR, H.J., Spits H, Roncarolo MG, te VA, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE, *Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression*. J.Exp.Med., 1991. **174**: p. 915-924.
134. Del Prete G, D.C.M., Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S, *Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production*. J Immunol, 1993. **150**: p. 353-360.
135. Hata T, K.T., Fujiwaki R, Aoki S, Hata K, Inada K, *Interleukin-4, interleukin-10, and soluble tumor necrosis factor receptors in cord blood*. Gynecol.Obstet.Invest., 1997. **43**: p. 155-157.
136. Moreau P, A.-C.F., Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, Carosella ED, Paul P, *IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes*. Int.Immunol., 1999. **11**: p. 803-811.
137. Lappalainen M, R.M., Pekkanen J, Huttunen K, Hirvonen M-R, *Maturation of cytokine-producing capacity from birth to 1 yr of age*. Ped Allergy and Immunol, 2009. **20**(8): p. 714-25.
138. Yerkovich ST, W.M., Suriyaarachchi D, Prescott SL, Upham JW, Holt PG, *Postnatal development of monocyte cytokine responses to bacterial lipopolysaccharide*. Pediatr Res, 2007. **62**: p. 547-52.
139. Levy O, Z.K., Roy RM, Cywes C, Godowski PJ, Wessels MR, *Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF-alpha induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848*. J Immunol., 2004. **173**(7): p. 4627-34.
140. Chheda S, P.K., Garofalo R, Rassin DK, Goldman AS, *Decreased interleukin-10 production by neonatal monocytes and T cells: relationship to decreased production and expression of tumor necrosis factor-alpha and its receptors*. Pediatr Res., 1996. **40**(3): p. 475-83.
141. Yan SR, Q.G., Byers DM, Stadnyk AW, Al-Hertani W, Bortolussi R, *Role of MyD88 in diminished tumor necrosis factor alpha production by newborn mononuclear cells in response to lipopolysaccharide*. Infect Immun., 2004. **72**(3): p. 1223-9.
142. Gabrielsson S, S.A., Nilsson C, Lilja G, Nordlund M, Troye-Blomberg M, *Influence of atopic heredity on IL-4-, IL-12- and IFN-gamma-producing cells in in vitro activated cord blood mononuclear cells*. Clin Exp Immunol, 2001. **126**: p. 390-396.
143. Manetti R, P.P., Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S, *Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune*

- responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med*, 1993. **1199-1204**: p. 177.
144. Prescott SL, M.C., Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Loh R, Holt PG, *Reciprocal age-related patterns of allergen-specific T-cell immunity in normal vs. atopic infants*. *Clin Exp Allergy*, 1998. **28 Suppl 5**: p. 39-44.
145. Holt, P.G., et al., *Genetic 'risk' for atopy is associated with delayed postnatal maturation of T-cell competence*. *Clin Exp Allergy*, 1992. **22**(12): p. 1093-9.
146. Smyth MJ, Z.C., Norihisa Y, Ortaldo JR, Hishinuma A, Matsushima K, *IL-8 gene expression and production in human peripheral blood lymphocyte subsets*. *J Immunol*, 1991. **146**(11): p. 3815-23.
147. Jones AC, M.E., Warner JO, Colwell BM, Bryant TN, Warner JA, *Fetal peripheral blood mononuclear cell proliferative responses to mitogenic and allergenic stimuli during gestation*. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 1996. **7**: p. 109-116.
148. Taylor S, B.Y., *Impaired production of gamma-interferon by newborn cells in vitro is due to a functionally immature macrophage*. *J Immunol*, 1985. **134**: p. 1493-1497.
149. Prescott SL, M.C., Holt BJ, Smallacombe TB, Loh R, Sly PD, Holt PG, *Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile*. *J Immunol*, 1998. **160**(10): p. 4730-7.
150. Raghupathy, R., *Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy*. *Immunol Today*, 1997. **18**(10): p. 478-82.
151. Lin H, M.T., Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG, *Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface*. *J Immunol*, 1993. **151**: p. 4562-4573.
152. Kondo N, K.Y., Shinoda S, Takenaka R, Teramoto T, Kaneko H, Fukao T, Matsui E, Kasahara K, Yokoyama Y, *Reduced interferon gamma production by antigen-stimulated cord blood mononuclear cells is a risk factor of allergic disorders--6-year follow-up study*. *Clin Exp Allergy*, 1998. **28**: p. 1340-1344.
153. Warner JA, M.E., Jones AC, Quint DJ, Colwell BM, Warner JO, *Is deficiency of interferon gamma production by allergen triggered cord blood cells a predictor of atopic eczema?* *Clin Exp Allergy*, 1994. **24**: p. 423-430.
154. Härtel C, A.N., Strunk T, Temming P, Müller-Steinhardt M, Schultz C, *Cytokine responses correlate differentially with age in infancy and early childhood*. *Clin Exp Immunol.*, 2005. **142**(3): p. 446-53.
155. Marodi, L., *Innate cellular immune responses in newborns*. *Clin Immunol*, 2006. **118**(2-3): p. 137-44.
156. Gasparoni A, C.L., Avanzini A, Castellazzi AM, Carini R, Rondini G, Chirico G, *Age-related changes in intracellular TH1/TH2 cytokine production, immunoproliferative T lymphocyte response and natural killer cell activity in newborns, children and adults*. *Biol Neonate.*, 2003. **84**(4): p. 297-303.
157. Chipeta J, K.Y., Zhang XL, Deguchi T, Sugiyama K, Azuma E, Sakurai M, *CD4+ and CD8+ cell cytokine profiles in neonates, older children, and adults: increasing T helper type 1 and T cytotoxic type 1 cell populations with age*. *Cell Immunol*, 1998. **183**(2): p. 149-56.
158. Prokesová L, L.-Z.R., Zizka J, Kocourková I, Novotná O, Petrásková P, Sterzl I, *Cytokine levels in healthy and allergic mothers and their children during the first year of life*. *Pediatr Allergy Immunol.* , 2006. **17**(3): p. 175-83.
159. Bocci, V., *The neglected organ: bacterial flora has a crucial immunostimulatory role*. *Perspect Biol Med.* , 1992. **35**(2): p. 251-60.
160. Wakasugi N, V.J., *Defective IFN-gamma production in the human neonate. I. Dysregulation rather than intrinsic abnormality*. *J Immunol.*, 1985. **134**(1): p. 167-71.
161. Thornton CA, C.C., Power LL, Holloway JA, Popplewell EJ, Diaper ND, Warner JO, *The effect of labor on neonatal T-cell phenotype and function*. *Pediatr Res.*, 2003. **54**(1): p. 120-4.

162. Jokic M, G.B., Cauquelin B, Giroux JD, Bessis JL, Morello R, Levy G, Ballet JJ, *Fetal distress increases interleukin-6 and interleukin-8 and decreases tumour necrosis factor-alpha cord blood levels in noninfected full-term neonates*. BJOG, 2000. **107**(3): p. 420-5.
163. von Mutius, E., et al., *Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(9): p. 1230-4.
164. Braun-Fahrlander, C., et al., *Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children*. N Engl J Med, 2002. **347**(12): p. 869-77.
165. Alm JS, S.J., Lilja G, Scheynius A, Pershagen G, *Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle*. Lancet, 1999. **353**(9163): p. 1485-8.
166. Gereda JE, L.D., Thatayatikom A, Streib JE, Price MR, Klinnert MD, Liu AH, *Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma*. Lancet, 2000. **355**(9216): p. 1680-3.
167. Prescott SL, K.B., Strong TL, Holt PG, *The value of perinatal immune responses in predicting allergic disease at 6 years of age*. Allergy, 2003. **58**: p. 1187-1194.
168. Martinez FD, S.D., Wright AL, Holberg CJ, Taussig LM, Halonen M, *Association of interleukin-2 and interferon-gamma production by blood mononuclear cells in infancy with parental allergy skin tests and with subsequent development of atopy*. J.Allergy Clin.Immunol., 1995. **96**: p. 652-660.
169. Tang ML, K.A., Thorburn J, Hill DJ, *Reduced interferon-gamma secretion in neonates and subsequent atopy*. Lancet, 1994. **344**: p. 983-985.
170. Riedler, J., et al., *Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(2): p. 194-200.
171. Remes, S.T., et al., *Which factors explain the lower prevalence of atopy amongst farmers' children?* Clin Exp Allergy, 2003. **33**(4): p. 427-34.
172. Hölscher B, F.C., Wichmann HE, Heinrich J, *Exposure to pets and allergies in children*. Pediatr Allergy Immunol, 2002. **13**(5): p. 334-41.
173. Roponen M, H.A., Hirvonen MR, Keski-Nisula L, Pekkanen J, *Change in IFN-gamma-producing capacity in early life and exposure to environmental microbes*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(5): p. 1048-52.
174. Jenmalm MC, B.B., Macaubas C, Holt BJ, Smallacombe TB, Holt PG, *Allergen-induced cytokine secretion in relation to atopic symptoms and immunoglobulin E and immunoglobulin G subclass antibody responses*. Pediatr Allergy Immunol, 1999. **10**: p. 168-177.
175. Moverare R, E.L., Stalenheim G, Bjornsson E, *Study of the Th1/Th2 balance, including IL-10 production, in cultures of peripheral blood mononuclear cells from birch-pollen-allergic patients*. Allergy, 2000. **55**: p. 171-175.
176. Machura, E., et al., *Intracellular production of IL-2, IL-4, IFN-gamma, and TNFalpha by peripheral blood CD3(+) and CD4 (+) T cells in children with atopic dermatitis*. Eur J Pediatr, 2007. **166**(8): p. 789-95.
177. Takahashi, T., et al., *Production of IL-4, IL-2, IFN-gamma, and TNF-alpha by peripheral blood mononuclear cells of patients with atopic dermatitis*. J Dermatol Sci, 1992. **3**(3): p. 172-80.
178. Von Ehrenstein, O.S., et al., *Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(2): p. 187-93.
179. Braun-Fahrlander, C., *Allergic diseases in farmers' children*. Pediatr Allergy Immunol, 2000. **11 Suppl. 13**: p. 19-22.
180. Ernst, P. and Y. Cormier, *Relative scarcity of asthma and atopy among rural adolescents raised on a farm*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(5): p. 1563-6.
181. Kilpelainen, M., et al., *Farm environment in childhood prevents the development of allergies*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(2): p. 201-8.
182. Maisch S, v.M.E., *Schutz vor der Entstehung allergischer Erkrankungen: Protektive Faktoren des bäuerlichen Lebens (ALEX-Studie), Abschlussbericht 2002*. Bayerisches Staatsministerium für Gesundheit, Ernährung und Verbraucherschutz., 2002. **Band 6**.

183. Devereux, G., A. Seaton, and R.N. Barker, *In utero priming of allergen-specific helper T cells*. Clin Exp Allergy, 2001. **31**(11): p. 1686-95.
184. Piccinni, M.P., et al., *Aeroallergen sensitization can occur during fetal life*. Int Arch Allergy Immunol, 1993. **102**(3): p. 301-3.
185. Szepefalusi, Z., et al., *Transplacental priming of the human immune system with environmental allergens can occur early in gestation*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(3): p. 530-6.
186. Warner, J.A., et al., *Prenatal origins of allergic disease*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(2 Pt 2): p. 493-8.
187. Mariani F, P.J., Kemeny DM, *The IgG subclass antibody response to an inhalant antigen (Dermatophagoides pteronyssinus) during the first year of life: evidence for early stimulation of the immune system following natural exposure*. Clin Exp Allergy, 1992. **22**: p. 29-33.
188. Szepefalusi, Z., et al., *Direct evidence for transplacental allergen transfer*. Pediatr Res, 2000. **48**(3): p. 404-7.
189. Dunstan JA, M.T., Barden A, Beilin LJ, Taylor AL, Holt PG, Prescott SL, *Fish oil supplementation in pregnancy modifies neonatal allergen-specific immune responses and clinical outcomes in infants at high risk of atopy: a randomized, controlled trial*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**: p. 1178-1184.
190. Fogarty, A.a.J.B., *The role of diet in the aetiology of asthma*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(5): p. 615-27.
191. Miller RL, C.G., Bell CA, Biedermann SA, Aggarwal M, Kinney PL, Tsai WY, Whyatt RM, Perera FP, Ford JG, *Prenatal exposure, maternal sensitization, and sensitization in utero to indoor allergens in an inner-city cohort*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**: p. 995-1001.
192. Szépefalusi Z, L.C., Hänel-Dekan S, Dehlink E, Gerstmayr M, Pichler J, Eiwegger T, Horvat R, Urbanek R, *Most of diaplacentally transferred allergen is retained in the placenta*. Clin Exp Allergy, 2006. **36**(9): p. 1130-7.
193. Constant S, P.C., Woodard A, Pasqualini T, Bottomly K, *Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells*. J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1591-6.
194. Forastiere F, A.N., Corbo GM, Dell'Orco V, Porta D, Pistelli R, Levenstein S, Perucci CA, *Socioeconomic status, number of siblings, and respiratory infections in early life as determinants of atopy in children*. Epidemiology, 1997. **8**(5): p. Socioeconomic status, number of siblings, and respiratory infections in early life as determinants of atopy in children.
195. Debra A. Stern, M., Josef Riedler, MD, Dennis Nowak, MD, Charlotte Braun-, et al., *Exposure to a farming environment has allergen-specific protective effects on TH2-dependent isotype switching in response to common inhalants*. J Allergy Clin Immunol 2007. **119**: p. 351-8.
196. Remes ST, K.H., Iivanainen K, Pekkanen J, *Allergen-specific sensitization in asthma and allergic diseases in children: the study on farmers' and non-farmers' children*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**(2): p. 160-6.
197. Duramad P, H.K., Lipsett M, Bradman A, Eskenazi B, Holland NT, Tager IB, *Early Environmental Exposures and Intracellular Th1/Th2 Cytokine Profiles in 24-Month-Old Children Living in an Agricultural Area*. Environmental Health Perspectives, 2006. **114**(12): p. 1916-1922.
198. Ellwood P, A.M., Björkstén B, Burr M, Pearce N, Robertson CF, *Diet and asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema symptom prevalence: an ecological analysis of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) data. ISAAC Phase One Study Group*. Eur Respir J, 2001. **17**(3): p. 436-43.
199. Schoeffel, P., *Health and development in the Pacific Islands: Policy Implication for Micronesia*. ISLA: J Micronesian Studies, 1992. **1:2 Dry Season**: p. 223 – 50.

200. Prior IAM, S.J., Grimley Evans J, Salmond CE, *The Tokelau Island Migrant Study*. Int J Epidemiol, 1974. **3**: p. 225 – 232.
201. Leung RC, C.J., Burdon JGW, Czarny D, *Asthma, allergy and atopy in Asian immigrants in Melbourne*. Med J Aust, 1994. **161**: p. 418 – 425.
202. Sengler C, L.S., Wahn U, Nickel R, *Interactions between genes and environmental factors in asthma and atopy: new developments*. Respir Res, 2002. **3**: p. 7.
203. Williams TJ, J.C., Miles EA, Warner JO, Warner JA., *Fetal and neonatal IL-13 production during pregnancy and at birth and subsequent development of atopic symptoms*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**: p. 951–959.
204. Reefer AJ, C.R., Custis NJ, Platts-Mills TA, Sung SS, Hammer and e.a. J, *A role for IL-10-mediated HLA-DR7-restricted T cell-dependent events in development of the modified Th2 response to cat allergen*. J Immunol, 2004. **172**: p. 2763-72.
205. Hamelmann E, C.G., Schwarze J et al. , *Anti-interleukin 5 but not anti-IgE prevents airway inflammation and airway hyperresponsiveness*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**: p. 934-41.
206. Holloway JA, W.J., Vance GH, Diaper ND, Warner JA, Jones CA, *Detection of house-dust-mite allergen in amniotic fluid and umbilical-cord blood*. Lancet, 2000. **356**: p. 1900-2.
207. Chan-Yeung M, F.A., Chan A et al., *Umbilical cord blood mononuclear cell proliferative response to house dust mite does not predict the development of allergic rhinitis and asthma*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **104**: p. 317-21.
208. Kramer, M., *Maternal antigen avoidance during pregnancy for preventing atopic disease in infants of women at high risk*. Cochrane Database Syst Rev, 2000. **2**: p. CD000133.
209. Jones CA, K.S., Warner JA, Warner JO., *Intrauterine environment and fetal allergic sensitization*. Clin Exp Allergy, 1998. **28**: p. 655-9.
210. Friedmann A, W.H., *Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994. **91**: p. 6688-6692.
211. Eisenbarth SC, P.D., Huleatt JW, Visintin I, Herrick CAK, Bottomly K, *Lipopolysaccharide-enhanced, Toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen*. J Exp Med, 2002. **196**: p. 1645-51.
212. Zeiger RS, H.S., Mellon MH, Forsythe AB, O'Connor RD, Hamburger RN, et al., *Effect of combined maternal and infant food-allergen avoidance on development of atopy in early infancy: a randomized study*. J Allergy Clin Immunol, 1989. **84**: p. 72-89.
213. Arshad S, D., Bateman B, MRCP, Sadeghnejad A, MD, PhD, Gant C, SRD, Matthews SM, RGN, *Prevention of allergic disease during childhood by allergen avoidance: The Isle of Wight prevention study*. American Academy of Allergy, Asthma & Immunology, 2007. **119**: p. 307-13.
214. Marini A, A.M., Motta G, Mosca F, *Effects of a dietary and environmental prevention programme on the incidence of allergic symptoms in high atopic risk infants: three years' follow-up*. Acta Paediatr Suppl, 1996. **414**: p. 1-21.
215. Kondo M, S.K., Inoue R, Sakaguchi H, Matsukuma E, Kato Z, et al, *Characterization of T-cell clones specific to ovomucoid from patients with egg-white allergy*. J Invest Allergol Clin Immunol, 2005. **15**: p. 107-11.
216. Bohle B, Z.B., Fischer GF, Seppala U, Kinaciyan T, Bolwig C, et al., *Characterization of the human T cell response to antigen 5 from Vespula vulgaris (Ves v 5)*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**: p. 367-73.
217. van der Walt A, L.A., Nieuwenhuizen NE, Jeebhay MF, *Work-Related Allergy and Asthma in Spice Mill Workers - The Impact of Processing Dried Spices on IgE Reactivity Patterns*. Int Arch Allergy Immunol, 2010. **152**(3): p. 271-278.
218. Fukushima Y, K.M., Nakao K, Shimomura I, Matsuzawa Y, *Effects of coffee on inflammatory cytokine gene expression in mice fed high-fat diets*. J Agric Food Chem, 2009. **57**(23): p. 11100-5.

219. Goto M, Y.K., Shinmoto H, Takano-Ishikawa Y, *Continuous orally administered coffee enhanced the antigen-specific Th1 response and reduced allergic development in a TCR-transgenic mice model*. Biosci Biotechnol Biochem, 2009. **73**(11): p. 2439-44.
220. Hodge L, S.C., Peat JK, Haby MM, Xuan W, Woolcock AJ, *Consumption of oily fish and childhood asthma risk*. Med J Aust, 1996. **164**: p. 137 – 140.
221. Black PN, S.S., *Dietary fat and asthma: is there a connection?* Eur Respir J, 1997. **10**: p. 6 – 12.
222. Sausenthaler S, K.S., Schaaf B, Lehmann I, Borte M, Herbarth O, von Berg A, Wichmann HE, Heinrich J; LISA Study Group, *Maternal diet during pregnancy in relation to eczema and allergic sensitization in the offspring at 2 y of age*. Am J Clin Nutr, 2007. **85**(2): p. 530-7.
223. Sigurs N, H.G., Kjellman B, *Maternal avoidance of eggs, cow's milk, and fish during lactation: effect on allergic manifestations, skin-prick tests, and specific IgE antibodies in children at age 4 years*. Pediatrics, 1992. **89**: p. 735–9.
224. Lilja G, D.A., Foucard T, Graff LV, Johansson SG, Oman H, *Effects of maternal diet during late pregnancy and lactation on the development of atopic diseases in infants up to 18 months of age—in-vivo results*. Clin Exp Allergy, 1989. **19**: p. 473–9.
225. Seaton A, G.D., Brown K, *Increase in asthma: a more toxic environment or a more susceptible population?* Thorax, 1994. **49**: p. 171 – 174.
226. Bodner C, G.D., Brown K, Little J, Ross S, Seaton A, on behalf of Aberdeen WHEASE Study Group, *Antioxidant intake and Adult onset wheeze - a case control study*. Eur Respir J, 1999. **13**: p. 22 – 30.
227. Nwaru BI, A.S., Kaila M, Erkkola M, Haapala AM, Kronberg-Kippilä C, Veijola R, Ilonen J, Simell O, Knip M, Virtanen SM, *Maternal diet during pregnancy and allergic sensitization in the offspring by 5 yrs of age: a prospective cohort study*. Pediatr Allergy Immunol, 2010. **21**(1 Pt 1): p. 29-37 Epub 2009 Dec 9.
228. Waser M, M.K., Bieli C, Floistrup H, Pershagen G, von Mutius E, et al, *Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe*. Clin Exp Allergy, 2007. **37**: p. 661-70.
229. Perkin MR, S.D., *Which aspects of the farming lifestyle explain the inverse association with childhood allergy?* J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**: p. 1374-81.
230. von Mutius E, R.K., *Living on a farm: impact on asthma induction and clinical course*. Immunol Allergy Clin North Am, 2008. **28**(3): p. 631-47, ix-x.
231. Suhren G, H.H., Heeschen W, Südi JI, *Evaluation of the lipopolysaccharide (LPS) content as determined by the limulus test in milk and milk products II: raw milk and influences of technological procedures*. Milchwissenschaft, 1986. **41**: p. 156–60.
232. Kilewein, G., *Leitfaden der Milchkunde und Milchhygiene*. Berlin: Blackwell Wissenschaftsverlag, 1994: p. 83-85.
233. Ulevitch RJ, T.P., *Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 437–57.
234. Macatonia SE, H.N., Litton M, et al, *Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells*. J Immunol, 1995. **154**: p. 5071–79.
235. Baldini M, L.I., Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD, *A Polymorphism\* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **20**: p. 976–83.
236. Klinman DM, B.K., Conover J, *CpG motifs as immune adjuvants*. Vaccine, 1999. **17**: p. 19–25.
237. Pfefferle PI, B.G., Bluemer N, Roponen M, Ege MJ, Krauss-Etschmann S, Genuneit J, Hyvaerinen A, and L.R. Hirvonen MR, Pekkanen J, Riedler J, Dalphin JC, Brunekeef B, Braun-Fahrlaender C, von Mutius E and Renz H, on behalf of the PASTURE Study Group, *Cord blood cytokines are modulated by maternal farming activities and consumption of farm dairy products during pregnancy: The PASTURE Study*. American Academy of Allergy, Asthma & Immunology, 2010. **125**(1): p. 108-15.e1-3.



238. Wijga AH, S.H., Kerkhof M, de Jongste JC, Gerritsen J, Neijens HJ, et al, *Association of consumption of products containing milk fat with reduced asthma risk in pre-school children: the PIAMA birth cohort study*. Thorax, 2003. **58**: p. 567-72.
239. Dunder T, K.L., Turtinen J, Rasanen L, Uhari M, *Diet, serum fatty acids, and atopic diseases in childhood*. Allergy, 2001. **56**: p. 425-8.
240. Kraft J, C.M., Mockel P, Sieber R, Jahreis G, *Differences in CLA isomer distribution of cow's milk lipids*. Lipids, 2003. **38**: p. 657-64.
241. Weiland S, v.M.E., Huesing A, Asher MI, on behalf of the ISAAC Steering Committee., *Intake of trans fatty acids and prevalence of childhood asthma and allergies in Europe*. Lancet, 1999. **353**: p. 2040 – 2041.
242. Nugent AP, R.H., Noone EJ, Long A, Kelleher DK, Gibney MJ, *The effects of conjugated linoleic acid supplementation on immune function in healthy volunteers*. Eur J Clin Nutr, 2005. **59**: p. 742-50.
243. Jaudszus A, K.M., Mockel P, Darcan Y, Avagyan A, Matricardi P, et al, *Cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid inhibits allergic sensitization and airway inflammation via a PPARgamma-related mechanism in mice*. J Nutr, 2008. **138**: p. 1336-42.
244. Kanwar RK, M.A., Black PN, Kanwar JR, Rowan A, Vale M, et al, *Bovine milk fat enriched in conjugated linoleic and vaccenic acids attenuates allergic airway disease in mice*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**: p. 208-18.
245. Høst A, K.B., Dreborg S, Muraro A, Wahn U, Aggett P, Bresson JL, Hernell O, Lafeber H, Michaelsen KF, Micheli JL, Rigo J, Weaver L, Heymans H, Strobel S, Vandenplas Y, *Dietary products used in infants for treatment and prevention of food allergy. Joint Statement of the European Society for Paediatric Allergology and Clinical Immunology (ESPACI) Committee on Hypoallergenic Formulas and the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) Committee on Nutrition*. Arch Diss Child, 1999. **81**(1): p. 80-4.
246. Jarrett E, H.E., *Selective suppression of IgE antibody responsiveness by maternal influence*. Nature, 1979. **280**: p. 145-147.
247. Kopp MV, Z.C., Pichler J, Szeplalusi Z, Moseler M, Deichmann K et al, *Allergen-specific T cell reactivity in cord blood: the influence of maternal cytokine production*. Clin Exp Allergy, 2001. **31**: p. 1536–1543.
248. Tariq SM, M.S., Hakim EA, Stevens M, Arshad SH, Hide DW, *The prevalence of and the risk factor for atopy in early childhood: a whole population birth cohort study*. J Allergy Clin Immunol, 1998. **101**: p. 587–93.
249. Warner JA, J.C., Jones AC, Miles EA, Francis T, Warner JO, *Immune responses during pregnancy and the development of allergic disease*. Pediatr Allergy Immunol, 1997. **8 (Suppl. 10)**: p. 5-10.
250. Bergmann RL, E.G., Bergmann KE, et al, *Predictability of early atopy by cord blood-IgE and parental history*. Clin Exp Allergy, 1997. **27**: p. 752–60.
251. Liu CA, W.C., Chuang H, Ou CY, Hsu TY, Yang KD, *Prenatal prediction of infant atopy by maternal but not paternal total IgE levels*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**: p. 899–904.
252. Altounyan, R., *Changes in histamine and atropine responsiveness as a guide to diagnosis and evaluation of therapy in obstructive airways disease*. In: Pepys J, Edwards AM, editors. Disodium chromoglycate in allergic airways disease. London: Butterworth, 1970: p. 47-55.
253. Platts-Mills TAE, d.W.A., *Dust mite allergens and asthma: a worldwide problem*. J Allergy Clin Immunol, 1989. **83**: p. 416-27.
254. Platts-Mills, T., *Asthma severity and prevalence: an ongoing interaction between exposure, hygiene, and lifestyle*. PLoS Med, 2005. **2:e34**.
255. Platts-Mills TA, V.D., Thomas WR, Aalberse RC, Chapman MD, *Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop*. J Allergy Clin Immunol, 1997. **100**: p. S2-24.

256. Platts-Mills TA, T.E., Mitchell EB, Moszoro H, Nock P, Wilkins SR, *Reduction of bronchial hyperreactivity during prolonged allergen avoidance*. *Lancet*, 1982. **2**: p. 675-8.
257. Illi S, v.M.E., Lau S, Niggemann B, Gruber C, Wahn U, Multicentre Allergy Study (MAS) Group, *Perennial allergen sensitisation early in life and chronic asthma in children: a birth cohort study*. *Lancet*, 2006. **368**: p. 763-70.
258. Lau S, I.S., Sommerfeld C, Niggemann B, Bergmann R, von Mutius E, et al., *Early exposure to house-dust mite and cat allergens and development of childhood asthma: a cohort study*. *Multicentre Allergy Study Group*. *Lancet*, 2000. **356**: p. 1392-7.
259. Woodcock A, e.a., *Early life environmental control: effect on symptoms, sensitization, and lung function at age 3 years*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004. **170**: p. 433-439.
260. Eduard, W., et al., *Do farming exposures cause or prevent asthma? Results from a study of adult Norwegian farmers*. *Thorax*, 2004. **59**(5): p. 381-6.
261. Smit LA, H.D., Doekes G, Blom C, van Zweden I, Wouters IM, *Exposure-response analysis of allergy and respiratory symptoms in endotoxin-exposed adults*. *Eur Respir J*, 2008. **31**(6): p. 1241-8.
262. Szepefalusi Z, P.J., Elsasser S, et al, *Transplacental priming of the human immune system with environmental allergens can occur early in gestation*. *J Allergy Clin Immunol*, 2000. **106**: p. 530-6.
263. McKeever, T.M., S. A. Lewis, et al, *Early exposure to infections and antibiotics and the incidence of allergic disease: a birth cohort study with the West Midlands General Practice Research Database*. *J Allergy Clin Immunol*, 2000. **109**(1): p. 43-50.
264. McKeever TM, L.S., Smith C, Hubbard R, *The importance of prenatal exposures on the development of allergic disease: a birth cohort study using the West Midlands General Practice Database*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. **166**(6): p. 827-32.
265. Jones CA, H.J., Warner JO, *Fetal immune responsiveness and routes of allergic sensitization*. *Pediatr Allergy Immunol*, 2002. **13 (Suppl. 15)**: p. 19-22.
266. Ellertsen LK, N.U., Melkild I, Lovik M, *Maternal allergen immunisation to prevent sensitisation in offspring: Th2-polarising adjuvants are more efficient than a Th1-polarising adjuvant in mice*. *BMC Immunol*, 2010. **11**(1): p. 8 [Epub ahead of print].
267. Kihlstroem A, L.G., Pershagen G, Hedlin G, *Exposure to high doses of birch pollen during pregnancy, and risk of sensitization and atopic disease in the child*. *Allergy*, 2003. **58**: p. 871-877.
268. Kihlstroem A, L.G., Pershagen G, Hedlin G, *Exposure to birch pollen in infancy and development of atopic disease in childhood*. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. **110**: p. 78-84.
269. Warner JO, J.C., Kilburn SA, Vance GH, Warner JA, *Pre-natal sensitization in humans*. *Pediatr Allergy Immunol*, 2000. **11(Suppl.13)**: p. 6-8.
270. Szepefalusi Z, N.I., Gerstmayr M, Jost E, Todoran L, Gratzl R et al, *Prenatal allergen contact with milk proteins*. *Clin Exp Allergy*, 1997. **27**: p. 28-35.
271. Jenmalm MC, H.P., Bjorksten B, *Maternal influence on IgG subclass antibodies to Bet v 1 during the first 18 months of life as detected with a sensitive ELISA*. *Int Arch Allergy Immunol*, 1997. **114**: p. 175-184.
272. McKeever, T.M., S. A. Lewis, et al, *Early exposure to infections and antibiotics and the incidence of allergic disease: a birth cohort study with the West Midlands General Practice Research Database*. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. **109**(1): p. 43-50.
273. Hamelmann E, W.U., Gelfand EW, *Role of the Th2 cytokines in the development of allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness*. *Int Arch Allergy Immunol*, 1999. **118**: p. 90-4.
274. Robinson D, H.Q., Bentley A, Ying S, Kay AB, Durham SR, *Activation of CD4+ T cells, increased Th2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma*. *J Allergy Clin Immunol*, 1993. **92**: p. 313-24.

275. Celedon, J.C., Litonjua, A.A., Weiss, S.T. and Gold, D.R., *Daycare attendance in the first year of life and illnesses of the upper and lower respiratory tract in children with a familial history of atopy*. Pediatrics, 1999. **104**: p. 495–500.
276. Koopman LP, S.H., Heijnen M-LA, Wijga A, van Strein RT, Kerkhof M, Gerritsen J, Brunekreef B, de Jongste JC and Neijens H, *Respiratory infections in infants: interaction of parental allergy, child care, and siblings – The PIAMA Study*. Pediatrics, 2001. **108**: p. 943–948.
277. Nafstad P, H.J., Oeie L, Magnus P and Jaakola JJK, *Daycare centres and respiratory health*, Pediatrics, 1999. **103**: p. 253-258.
278. Furrie, E., *Probiotics and allergy*. Proc Nutr Soc, 2005. **64**: p. 465-9.
279. Marsh DG, N.J., Breazeale DR, et al, *Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations*. Science, 1994. **264**: p. 1152–6.
280. Matricardi PM, R.F., Riondino S et al, *Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study*. BMJ, 2000. **320**: p. 412–7.
281. Matricardi, P.M., et al., *Hay fever and asthma in relation to markers of infection in the United States*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **110**(3): p. 381-7.
282. Linneberg, A., et al., *IgG antibodies against microorganisms and atopic disease in Danish adults: the Copenhagen Allergy Study*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(4): p. 847-53.
283. McCune A, L.A., Murray L et al, *Reduced risk of atopic disorders in adults with Helicobacter pylori infection*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2003. **15**: p. 637–40.
284. Kosunen, T.U., et al., *Increase of allergen-specific immunoglobulin E antibodies from 1973 to 1994 in a Finnish population and a possible relationship to Helicobacter pylori infections*. Clin Exp Allergy, 2002. **32**(3): p. 373-8.
285. Sigurs N, B.R., Sigurbergsson F, Kjellman B, *Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**: p. 1501–1507.
286. Machura E, H.F., Mazur B, Kwiecień J, Karczewska K, *Serum levels of IL-4, IL-10 and IL-12 in infants and young children with recurrent wheezy bronchitis*. Pol Merkur Lekarski, 2005. **18**(108): p. 620-3.
287. Blanco-Quirós A, G.H., Arranz E, Lapeña S, *Decreased interleukin-12 levels in umbilical cord blood in children who developed acute bronchiolitis*. Pediatr Pulmonol, 1999. **28**(3): p. 175-80.
288. Prasse A, G.M., Pechkovsky DV, Markert A, Verres T, Stahl M, Melchers I, Luttmann W, Mueller-Quernheim J, Zissel G, *IL-10-producing monocytes differentiate to alternatively activated macrophages and are increased in atopic patients*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**: p. 464-71.
289. Ohmen JD, H.J., Nickoloff BJ, Rea TH, Wyzykowski R, Kim J, et al, *Overexpression of IL-10 in atopic dermatitis. Contrasting cytokine patterns with delayed-type hypersensitivity reactions*. J Immunol, 1995. **154**: p. 1956-63.
290. van der Pouw Kraan TC, B.L., de Groot ER, Stapel SO, Snijders A, Kapsenberg ML, et al, *Reduced production of IL-12 and IL-12-dependent IFN-gamma release in patients with allergic asthma*. J Immunol, 1997. **158**: p. 5560-5.
291. Tomita K, L.S., Hanazawa T, Usmani O, Stirling R, Chung KF, et al, *Attenuated Production of intracellular IL-10 and IL-12 in monocytes from patients with severe asthma*. Clin Immunol, 2002. **102**: p. 258-66.
292. Morgan AJ, S.C., Schwartz RA, Janniger CK, *Erythema toxicum neonatorum revisited*. Cutis, 2009. **83**(1): p. 13-6.
293. Marchini G, H.K., Nelson A, Yektaei-Karin E, Ståbi B, Lonne-Rahm S, Ulfgren AK, Brismar H, *Increased expression of HMGB-1 in the skin lesions of erythema toxicum*. Pediatr Dermatol, 2007. **24**(5): p. 474-82.

294. Spergel JM, P.A., *Atopic dermatitis and the atopic march*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**: p. S118-27.
295. Sudo M, S.S., Tanaka K., Aiba Y., Cubo C., Koga Y, *The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction*. J Immunol, 1997. **99**: p. 179-185.
296. Oyama N., S.N., Sogawa H., Kubo C, *Antibiotic use during infancy promotes a shift in the TH1/TH2 balance towards Th2-dominant immunity in mice*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**: p. 153-159.
297. Farooqi IS, H.J., *Early childhood infection and atopic disorder*. Thorax, 1998. **53**(11): p. 927-32.
298. Wjst M, H.B., Frye C, Wichmann HE, Dold S, Heinrich J, *Early antibiotic treatment and later asthma*. Eur J Med Res, 2001. **6**(6): p. 263-71.
299. Del-Rio-Navarro B, B.A., Blandón-Vijil V, Ramírez-Aguilar M, Romieu I, Ramírez-Chanona N, Heras-Acevedo S, Serrano-Sierra A, Barraza-Villareal A, Baeza-Bacab M, Sienra-Monge JJ, *Identification of asthma risk factors in Mexico City in an International Study of Asthma and Allergy in Childhood survey*. Allergy Asthma Proc, 2006. **27**(4): p. 325-33.
300. Droste J.H.J., W.H., Weyler J.J., Nelen V.J., Vermeire P.A., Van Bever H, *Does the use of antibiotics in childhood increase the risk of asthma and allergic disease?* Clinical and Experimental Allergy, 2002. **30**: p. 547-1553.
301. Ponsonby AL., C.D., Dwyer T., Carmichael A., Kemp A, *Relationship between early life respiratory illness, family size over time, and the development of asthma and hay fever: a seven year follow up study*. Thorax, 1999. **54**: p. 664-669.
302. Celedon JC., L.A., Ryan L., Weiss ST., Gold DR, *Lack of association between antibiotic use in the first year of life and asthma, allergic rhinitis, or eczema at age 5 years*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**: p. 72-75.
303. Wickens K, P.N., Crane J, Beasley R, *Antibiotic use in early childhood and the development of asthma*. Clin Exp Allergy, 1999. **29**(6): p. 766-71.
304. Lindfors A, v.H.-H.M., Rietz H, Wickman M, Nordvall SL, *Influence of interaction of environmental risk factors and sensitization in young asthmatic children*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **104**: p. 755-62.
305. Bolte G, B.W., Borte M, Lehmann I, Wichmann HE, Heinrich J, et al., *Early endotoxin exposure and atopy development in infants: results of a birth cohort study*. Clin Exp Allergy, 2003. **33**: p. 770-6.
306. Gereda JE, K.M., Price MR, Leung DY, Liu AH, *Metropolitan home living conditions associated with indoor endotoxin levels*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**: p. 790-6.
307. Park J-H, S.D., Gold DR, Burge HA, Milton DK, *Predictors of airborne endotoxin in the home*. Environ Health Perspect, 2001. **109**: p. 859-64.
308. Bischof W, K.A., Gehring U, Fahlbusch B, Wichmann HE, Heinrich J, et al., *Predictors of high endotoxin concentrations in the settled dust of German homes*. Indoor Air, 2002. **12**: p. 2-19.
309. Park, J.H., et al., *House dust endotoxin and wheeze in the first year of life*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(2): p. 322-8.
310. Hesselmar B, A.N., Aberg B, Eriksson B, Bjoerksten B., *Does early exposure to cat or dog protect against later allergy development?* Clin Exp Allergy, 1999. **29**: p. 611-7.
311. Platts-Mills TAE, V.J., Squillace S, Woodfolk J, Sporik R, *Sensitization, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study*. Lancet, 2001. **357**: p. 752-6.
312. Custovic A, H.C., Simpson BM, Craven M, Simpson A, Woodcock A, *Decreased prevalence of sensitization to cats with high exposure to cat allergen*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **537-9**: p. 108.
313. Benn CS, M.M., Wohlfahrt J, Björkstén B, Aaby P, *Cohort study of sibling effect, infectious diseases, and risk of atopic dermatitis during first 18 months of life*. BMJ, 2004. **328**(7450): p. 1223.

314. Liu, A., *Something old, something new: indoor endotoxin, allergens and asthma*. Paediatr Respir Rev, 2004. **5 Suppl A**: p. 65-71.
315. Platts-Mills JA, C.N., Woodfolk JA, Platts-Mills TA, *Airborne endotoxin in homes with domestic animals: implications for cat-specific tolerance*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**: p. 384-9.
316. Sohy C, L.-C.F., Casset A, Meyer P, Pauli G, Pons F, et al, *Dust and airborne endotoxin exposure in dwellings in the Strasbourg metropolitan area (France)*. Allergy, 2005. **60**: p. 541-2.
317. Platts-Mills, T., *The role of indoor allergens in chronic allergic disease*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**: p. 297-302.
318. Prouvost-Danon A, M.D., Abadie A, Mevel JC, Biozzi G, *Genetic regulation of IgE and agglutinating antibody synthesis in line of mice selected for high and low immune responsiveness*. Eur J Immunol, 1977. **7**: p. 342.
319. Hugg TT, J.M., Ruotsalainen R, Pushkarev V, Jaakkola JJ, *Exposure to animals and the risk of allergic asthma: a population-based cross-sectional study in Finnish and Russian children*. Environ Health, 2008. **7**: p. 28.
320. Suoniemi I, B.F., Haahtela T, *Dependence of immediate hypersensitivity in the adolescent period on factors encountered in infancy*. Allergy, 1981. **36**: p. 263-8.
321. Platts-Mills TA, E.E., Allison AB, et al., *The relevance of maternal immune responses to inhalant allergens to maternal symptoms, passive transfer to the infant, and development of antibodies in the first 2 years of life*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**: p. 123-30.
322. Sporik R, S.S., Ingram JM, Rakes G, Honsinger RW, Platts-Mills TA, *Mite, cat, and cockroach exposure, allergen sensitization, and asthma in children: a case-control study of three schools*. Thorax, 1999. **54**: p. 675-80.
323. Krämer U, H.J., Wjst M, Wichmann HE, *Age of entry to day nursery and allergy in later childhood*. Lancet, 1999. **353**: p. 450-54.
324. Broems K, S.K., Sundelin C, Norbaeck D, *A nationwide study of indoor and outdoor environments in allergen avoidance and conventional daycare centers in Sweden*. Indoor Air, 2006. **16**: p. 227-235.
325. Kiechl-Kohlendorfer U, H.E., Mueller W, Strobl R, Haberland C, Fink FM, Schwaiger M, Gutenberger KH, Reich H, Meraner D, Kiechl S, *Neonatal characteristics and risk of atopic asthma in schoolchildren: results from a large prospective birth-cohort study*. Acta Paediatr, 2007. **96**(11): p. 1606-10.
326. Salam MT, L.Y., Langholz B, Gilliland FD; Children's Health Study, *Early-life environmental risk factors for asthma: findings from the Children's Health Study*. Environ Health Perspect, 2004. **112**(6): p. 760-5.
327. Smedje G, N.D., Edling C, *Asthma among secondary schoolchildren in relation to the school environment*. Clin Exp Allergy, 1997. **27**(11): p. 1270-8.
328. Mutius von E, I.S., Nicolai T, Martinez FD, *Relation of indoor heating with asthma, allergic sensitization and bronchial responsiveness in South Bavarian children*. BMJ, 1996. **312**: p. 1448-50.
329. Anderson HR, P.d.L.A., Bland JM, Bower JS, Emberlin J, Strachan DP, *Air pollution, pollens, and daily admissions for asthma in London 1987-92*. Thorax, 1998. **53**: p. 842-8.
330. Burnett RT, D.R., Raizenne ME et al, *Effects of low ambient levels of ozone and sulfates on the frequency of respiratory admissions to Ontario hospitals*. Environ Res, 1994. **65**: p. 172-94.
331. Sunyer J, S.C., Quenel P et al, *Urban air pollution and emergency admissions for asthma in four European cities: the APHEA project*. Thorax, 1997. **52**: p. 760-5.
332. Morgan G, C.S., Wlodarczyk J, *Air pollution and hospital admissions in Sydney, Australia, 1990 to 1994*. Am J Public Health, 1998. **88**: p. 1761-6.
333. Petroseshevsky A, S.R., Thalib L, Rutherford S, *Associations between outdoor air pollution and hospital admissions in Brisbane, Australia*. Arch Environ Health, 2001. **56**: p. 37-52.

334. Fusco D, F.F., Michelozzi P et al, *Air pollution and hospital admissions for respiratory conditions in Rome, Italy*. Eur Respir J, 2001. **17**: p. 1143–50.
335. Barnett AG, W.G., Schwartz J et al, *Air pollution and child respiratory health: a case-crossover study in Australia and New Zealand*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **171**: p. 1272–8.
336. Chauhan AJ, I.H., Linaker CH et al, *Personal exposure to nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) and the severity of virus-induced asthma in children*. Lancet, 2003. **361**: p. 1939–44.
337. Lee SL, W.W.a.L.Y., *Association between air pollution and asthma admission among children in Hong Kong*. Clinical and Experimental Allergy, 2006. **36**: p. 1138–1146.
338. Roemer W, H.G., Brunekreef B, Haluszka J, Kalandidi A, Pekkanen J, *Daily variations in air pollution and respiratory health in a multicentre study: the PEACE project. Pollution effects on asthmatic children in Europe*. Eur Respir J, 1998. **12**: p. 1354–61.
339. Von Mutius E, B.-F.C., Riedler J, et al., *Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**: p. 1230–35.
340. Curwin BD, H.M., Sanderson WT, Striley C, Heederik D, Kromhout H, Reynolds SJ, Alavanja MC, *Urinary pesticide concentrations among children, mothers and fathers living in farm and non-farm households in Iowa*. Ann Occup Hyg, 2007. **51**(1): p. 53-65.
341. Radon K, D.B., Iversen M et al, *Respiratory symptoms in European animal farmers*. Eur Respir J, 2001. **17**: p. 747–54.
342. Radon K, S.A., Garz S et al, *Distribution of dust-mite allergens (Lep d 2, Der p 1, Der f 1, Der 2) in pig-farming environments and sensitization of the respective farmers*. Allergy, 2000. **55**: p. 219–25.
343. Portengen, L., et al., *Low prevalence of atopy in young Danish farmers and farming students born and raised on a farm*. Clin Exp Allergy, 2002. **32**(2): p. 247-53.
344. Chew GL, D.J., Doekes G, Higgins KM, Strien van R, Spithoven J, et al, *Fungal extracellular polysaccharides, beta (1-3)-glucans and culturable fungi in repeated sampling of house dust*. Indoor Air, 2001. **11**: p. 171-8.
345. Radon, K., et al., *Farming exposure in childhood, exposure to markers of infections and the development of atopy in rural subjects*. Clin Exp Allergy, 2004. **34**(8): p. 1178-83.
346. Berger I, S.R., Ochmann U, Egger U, Scharrer E, Nowak D, *Concentrations of dust, allergens and endotoxin in stables, living rooms and mattresses from cattle farmers in southern Bavaria*. Ann Agric Environ Med, 2005. **12**(1): p. 101-7.
347. Roussel S, R.G., Dalphin JC, Laplante JJ, Piarroux R, *Evaluation of salting as a hay preservative against farmer's lung disease agents*. Ann Agric Environ Med, 2005. **12**: p. 217-21.
348. Roussel S, R.G., Dalphin JC, Bardonnnet K, Millon L, Piarroux R, *Mikrobiological evolution of hay and relapse in patients with farmer's lung*. Occup Environ Med, 2004. **61**: p. e3.
349. Bondy GS, P.J., *Immunomodulation by fungal toxins*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2000. **3**: p. 109-43.
350. Pestka JJ, S.A., *Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2005. **8**: p. 39-69.
351. Pestka JJ, Z.H., Moon Y, Chung YJ, *Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox*. Toxicol Lett, 2004. **153**: p. 61-73.
352. van der Velden V, L.M., Baert MR, de Waal MR, Neijens HJ, Savelkoul HF, *Selective development of a strong Th2 cytokine profile in high-risk children who develop atopy: risk factors and regulatory role of IFN-gamma, IL-4 and IL-10*. Clin.Exp.Allergy, 2001. **31**: p. 997-1006.
353. Schram-Bijkerk D, D.G., Douwes J, Boeve M, Riedler J, Ublagger E, von Mutius E, Benz MR, Pershagen G, van Hage M, Scheynius A, Braun-Fahrlander C, Waser M, Brunekreef B; PARSIFAL Study Group, *Bacterial and fungal agents in house dust and wheeze in children: the PARSIFAL study*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**: p. 10.

354. Voorhorst R, S.R., Varekamp H, Leupen MJ, Lyklema AW, *The house dust mite (Dermatophagoides pteronyssinus) and the allergens it produces: identity with the house dust allergen.* J Allergy, 1967. **39**: p. 325.
355. Tovey E, C.M., Platts-Mills TAE, *Mite faeces are a major source of house dust allergens.* Nature, 1981. **289**: p. 592.
356. Sporik R, C.M., Platts-Mills TA, *House dust mite exposure as a cause of asthma.* Clin Exp Allergy, 1992. **22**: p. 897-906.
357. Sporik R, H.S., Platts-Mills TAE, Cogswell JJ, *Exposure to house-dust mite allergen (Der p1) and the development of asthma in childhood.* N Engl J Med, 1990. **323**: p. 502-7.
358. Asher MI, M.S., Bjorksten B, Lai CKW, Strachan DP, Weiland SK, et al, *Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys.* Lancet, 2006. **368**: p. 733-43.
359. Sunyer J, J.D., Pekkanen J, Chinn S, Janson C, Leynaert B, et al, *Geographic variations in the effect of atopy on asthma in the European Community Respiratory Health Study.* J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**: p. 1033-9.
360. D'Amato G, L.G., D'Amato M, Holgate S, *Environmental risk factors and allergic bronchial asthma.* Clin Exp Allergy, 2005. **35**: p. 1113-24.
361. Venn AJ, L.S., Cooper M, Hubbard R, Britton J, *Living near a main road and the risk of wheezing illness in children.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**: p. 2177-80.
362. Pathmanathan S, K.M., Blomberg A, Helleday R, Kelly FJ, Sandstrom T, et al, *Repeated daily exposure to 2 ppm nitrogen dioxide upregulates the expression of IL-5, IL-10, IL-13 and ICAM-1 in the bronchial epithelium of healthy human airways.* Occup Environ Med, 2003. **60**: p. 892-896.

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
<	Kleiner
>	Größer
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ALEX	Allergy and Endotoxin Study
allerg.	Allergisch
AMICS	Environmental influences and infection as aetiological agencies in atopy and asthma in young children
Kohorte	
APC	Antigen-präsentierende Zellen
AS	Aminosäuren
ATS	American Toracic Society
BMI	Body Mass Index
bzgl.	Bezüglich
bzw.	Beziehungsweise
CD	Cluster of differentiation

CO <sup>2</sup>	Kohlendioxid
d	Tag
d.h.	Das heißt
DC	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPS	Extracellular Polysaccharides
et al.	Et alii
etc.	Et cetera
evtl.	Eventuell
FB	Fragebogen
FCS	Fetal Calf Serum
FOX	Forkhead box
g	Gramm
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
h	Hour(s)
HLA	Human Leukocyte Antigen
I	Ionomycin
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IQR	Interquartilabstand
ISAAC	International Study of Allergy and Asthma in Childhood
J.	Jahr
kDa	Kilo-Dalton
KI	Konfidenzintervall
LBP	LPS-bindendes Protein
LISA	Influences of lifestyle-related factors on the immune system and the development of allergies in childhood
LJ	Lebensjahr
LM	Lebensmonat
LPS	Lipopolysaccharid
LUKAS	Ländliche Umgebung und Kinder: Allergiestudie
LW	Lebenswoche
m	Meter
M/B	Medium/Blut
MHC	Major histocompatibility complex
ml	Milliliter
MWU	Mann-Whitney- <i>U</i> -Test
n	Anzahl



NBMC	Nabelschnurblut-Mononukleäre-Zellen
NK-Zellen	Natürliche-Killerzellen
NO <sub>2</sub>	Stickstoffdioxid
NOD	Nucleotid-oligomerization domain-Receptors
NR	Non-Responder
NSB	Nabelschnurblut
NSBC	Nabelschnurblutzellen
OR	Odds ratio
p	Signifikanzniveau
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PARSIFAL	Prevention of Allergy- Risk factors for Sensitization in children related to farming and anthroposophic
PASTURE	Protection against Allergy: A Study in Rural Environments
PAX	PreAnalytiX
PBMC	Periphere mononukleäre Zellen
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Personal Computer
PD	Privatdozent
PEACE	Pollution Effects on Asthmatic Children
pg	Pikogramm
PHA	Phytohämagglutinin
PhD	Philosophiae doctor
PI	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat-Ionomycin
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
Prof.	Professor
PRR	Pattern recognition receptors
R	Responder
rpm	Revolutions per minute
RPMI	Zellkulturmedium entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
RSV	Respiratory syncytial virus
s.	Siehe
SAC	Staphylococcus aureus cells
SCID	Severe combined immunodeficiency
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
SS	Schwangerschaft
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
Tc-Zellen	Zytotoxische T-Zellen
TGF	Transforming growth factor
Th-Zellen	T-Helferzellen
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zellen

TZR	T-Zell-Rezeptor
U	Vorsorgeuntersuchung bei Kindern
v.a.	Vor allem
vol.	Volumen
z.B.	Zum Beispiel
$\chi^2$ -Test	Chi-Quadrat-Test nach Pearson

### 7.3 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Übersicht über einige wichtige Zytokine.
- Tabelle 2: Schema für die Blutabnahme aus Nabelschnur bei Geburt
- Tabelle 3: Stimulationsschema
- Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien
- Tabelle 5: Reagenzien
- Tabelle 6: Geräte
- Tabelle 7: Software
- Tabelle 8: Umfang der Studienpopulationen bei Geburt und nach 1 Jahr und der Subpopulation - aufgeteilt nach Bauern und Nicht-Bauern
- Tabelle 9: Anamnestische Angaben der Mütter der Studiensubpopulation (n=108; Gruppe der Bauern- und Nicht-Bauernkinder mit Zytokinwerten sowohl aus dem Nabelschnurblut als auch aus dem venösen Blut ein Jahr nach der Geburt). Aufteilung der Ergebnisse nach dem Bauernstatus.
- Tabelle 10: Anamnestische Angaben der Väter der Studiensubpopulation (n=108; Gruppe der Bauern- und Nicht-Bauernkinder mit Zytokinwerten sowohl aus dem Nabelschnurblut als auch aus dem venösen Blut ein Jahr nach der Geburt). Aufteilung der Ergebnisse nach dem Bauernstatus.
- Tabelle 11: Anamnestische Angaben der Kinder der Studiensubpopulation (n=108; Gruppe der Bauern- und Nicht-Bauernkinder mit Zytokinwerten sowohl aus dem Nabelschnurblut als auch aus dem venösen Blut ein Jahr nach der Geburt). Aufteilung der Ergebnisse nach dem Bauernstatus.
- Tabelle 12: Anamnestische Angaben zu Haushalt und Umgebung der Studiensubpopulation (n=108; Gruppe der Bauern- und Nicht-Bauernkinder mit Zytokinwerten sowohl aus dem Nabelschnurblut als auch aus dem venösen Blut ein Jahr nach der Geburt). Aufteilung der Ergebnisse nach dem Bauernstatus.

- Tabelle 13: Anamnestische Angaben zur Haustierhaltung in der Studiensubpopulation (n=108; Gruppe der Bauern- und Nicht-Bauernkinder mit Zytokinwerten sowohl aus dem Nabelschnurblut als auch aus dem venösen Blut ein Jahr nach der Geburt). Aufteilung der Ergebnisse nach dem Bauernstatus.
- Tabelle 14: Darstellung der Mediane, 25.- und 75. Perzentilen der ZytokinKonzentrationen im Nabelschnurblut und im peripher-venösen Blut der Kinder nach 1 Jahr (alle Kinder)
- Tabelle 15: Darstellung der Mediane, 25.- und 75. Perzentilen der ZytokinKonzentrationen im Nabelschnurblut und im peripher-venösen Blut der Kinder nach 1 Jahr (Bauernkinder)
- Tabelle 16: Darstellung der Mediane, 25.- und 75. Perzentilen der ZytokinKonzentrationen im Nabelschnurblut und im peripher-venösen Blut der Kinder nach 1 Jahr (Nicht-Bauernkinder)
- Tabelle 17: Responderraten in n/N im Nabelschnurblut und peripher-venösen Blut aller Kinder nach einem Jahr, getrennt nach Zytokinen und Stimulantien
- Tabelle 18: Entwicklung des Geburts-Responderstatus aller Kinder nach einem Jahr, getrennt nach Zytokinen und Stimulantien
- Tabelle 19: Entwicklung der Studienpopulation (N'=108) vom Geburts-Non-Responder zum Responder nach einem Jahr, getrennt nach Zytokinen und Stimulantien
- Tabelle 20: Gruppe der Non-Responder bei Geburt (NR), die nach 1 Jahr Responder (R) sind - Aufteilung nach verschiedenen mütterlichen Faktoren
- Tabelle 21: Gruppe der Non-Responder bei Geburt (NR), die nach 1 Jahr Responder (R) sind - Aufteilung nach verschiedenen kindlichen Faktoren
- Tabelle 22: Gruppe der Non-Responder bei Geburt (NR), die nach 1 Jahr Responder (R) sind - Aufteilung nach verschiedenen Faktoren der Umgebung
- Tabelle 23: Berechnung der Odds Ratio (OR), des 95% Konfidenzintervalls (95% KI) und des p-Werts mit binärer logistischer Regression
- Tabelle A.1: Zytokinwerte der Bauern der Subpopulation bei Geburt
- Tabelle A.2: Zytokinwerte der Nicht-Bauern der Subpopulation bei Geburt
- Tabelle A.3: Zytokinwerte der Bauern der Subpopulation nach 1 Jahr
- Tabelle A.4: Zytokinwerte der Nicht-Bauern der Subpopulation nach 1 Jahr

- Tabelle A.5: Responderraten in n/N im Nabelschnurblut und im venösen Blut nach 1 Jahr (Bauern)
- Tabelle A.6: Responderraten in n/N im Nabelschnurblut und im venösen Blut nach 1 Jahr (Nicht-Bauern)
- Tabelle A.7: Gruppe der Non-Responder bei Geburt (NR), die nach 1 Jahr Responder (R) sind: Mutter
- Tabelle A.8: Gruppe der Non-Responder bei Geburt (NR), die nach 1 Jahr Responder (R) sind: Kind
- Tabelle A.9: Gruppe der Non-Responder bei Geburt (NR), die nach 1 Jahr Responder (R) sind: Umwelt

## 7.4 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Einfluss der verschiedenen Zytokine auf die Ausreifung der naiven TH0-Zelle, auf die Beziehungen der TH1- und TH2-Zellen untereinander und zu anderen Zellen des Immunsystems.
- Abbildung 2: Studiendesign
- Abbildung 3: Studienpopulation
- Abbildung 4: Darstellung der Boxplots zu signifikanten und tendenziell signifikanten Unterschieden der Mediane in Abhängigkeit vom Bauernstatus
- Abbildung A.1: Boxplot mit Ausreißer zu IL-10 (Stimulation mit SEB, 48h-Wert)
- Abbildung A.2: Boxplot mit Ausreißer zu IFN- $\gamma$  (Stimulation mit PI, 48h-Wert)

## 7.5 Ergänzende Ergebnistabellen

### 7.5.1 Boxplots mit Ausreißern

Abb. A.1: Boxplot mit Ausreißer zu IL-10 (Stimulation mit SEB, 48h-Wert):

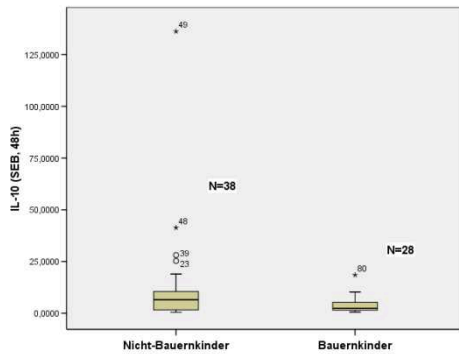


Abb. A.2: Boxplot mit Ausreißer zu IFN- $\gamma$  (Stimulation mit PI, 48h-Wert):

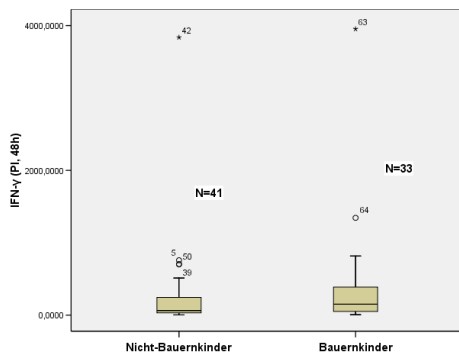


Abb. A.1 und A.2: Höhe der Mediane (in pg/ml) der Zytokine bei Geburt, die signifikante Unterschiede bzw. Trends bezüglich des Bauern-Status aufweisen.

Die Daten liegen als Boxplots vor (Strich: Median, Boxen: IQR (Interquartilabstand), T-bars: range, \* und  $\circ$ : Ausreißer). Die Unterschiede beider Gruppen wurden mittels MWU-Test berechnet.

## 7.5.2 Responderraten in n/N im Nabelschnurblut und im venösen Blut nach einem Jahr nach Bauernstatus getrennt

Tab. A.5: Responderraten in n/N im Nabelschnurblut und im venösen Blut nach 1 Jahr (Bauern)

Zytokin	Stimulans	Responder bei Geburt in n/N (%)	Responder nach 1 Jahr in n/N (%)
<b>IL-5</b>	<b>LPS</b>	4/46 (8,7)	24/46 (52,2)
	<b>SEB</b>	8/46 (17,4)	36/46 (78,3)
	<b>PI</b>	29/47 (61,7)	45/47 (95,7)
<b>IL-10</b>	<b>LPS</b>	42/45 (93,3)	45/46 (97,8)
	<b>SEB</b>	32/44 (72,7)	44/46 (95,7)
	<b>PI</b>	20/42 (47,6)	43/46 (93,5)
<b>IL-12</b>	<b>LPS</b>	5/46 (10,9)	15/46 (32,6)
	<b>SEB</b>	7/46 (15,2)	23/44 (52,3)
	<b>PI</b>	12/46 (26,1)	31/46 (67,4)
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>LPS</b>	20/45 (44,4)	18/46 (39,1)
	<b>SEB</b>	26/46 (56,5)	39/45 (86,7)
	<b>PI</b>	40/47 (85,1)	45/46 (97,8)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>LPS</b>	33/46 (71,7)	43/46 (93,5)
	<b>SEB</b>	19/46 (41,3)	37/46 (80,4)
	<b>PI</b>	38/47 (80,9)	44/46 (95,7)

Tab. A.5: Responderraten in n/N im Nabelschnurblut und peripher-venösen Blut der Kinder nach 1 Jahr, getrennt nach Zytokinen und Stimulantien – **nur Bauern**

**Tab. A.6: Responderraten in n/N im Nabelschnurblut und im venösen Blut nach 1 Jahr (Nicht-Bauern)**

<b>Zytokin</b>	<b>Stimulans</b>	<b>Responder bei Geburt in n/N (%)</b>	<b>Responder nach 1 Jahr in n/N (%)</b>
<b>IL-5</b>	<b>LPS</b>	3/55 (5,5)	17/51 (33,3)
	<b>SEB</b>	15/57 (26,3)	39/51 (76,5)
	<b>PI</b>	37/57 (64,9)	49/54 (90,7)
<b>IL-10</b>	<b>LPS</b>	49/55 (89,1)	52/54 (96,3)
	<b>SEB</b>	46/54 (85,2)	49/52 (94,2)
	<b>PI</b>	38/53 (71,7)	49/53 (92,5)
<b>IL-12</b>	<b>LPS</b>	8/55 (14,5)	20/52 (38,5)
	<b>SEB</b>	8/54 (14,8)	19/50 (38,0)
	<b>PI</b>	9/54 (16,7)	38/51 (74,5)
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>LPS</b>	23/55 (41,8)	24/56 (42,9)
	<b>SEB</b>	39/56 (69,6)	46/55 (83,6)
	<b>PI</b>	45/56 (80,4)	52/55 (94,5)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>LPS</b>	40/53 (75,5)	47/55 (85,5)
	<b>SEB</b>	22/53 (41,5)	37/53 (69,8)
	<b>PI</b>	47/53 (88,7)	50/55 (90,9)

Tab. A.6: Responderraten in n/N im Nabelschnurblut und peripher-venösen Blut der Kinder nach 1 Jahr, getrennt nach Zytokinen und Stimulantien – **nur Nicht-Bauern**

### 7.5.3 Untersuchung möglicher Einflußfaktoren auf die Entwicklung des Responderstatus der Non-Responder bei Geburt – tendenziell signifikante Ergebnisse bis $p < 0,01$

Tab. A.7: Mutter

Mutter		LPS		SEB		PI		
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	
<b>Allgemeine Daten</b>								
<b>Erste SS der Mutter</b>								
	Ja	<b>IL-12</b>	21,4% (6/28)	0,062	26,9% (7/26)	0,067	-	-
	Nein		42,3% (22/52)		48,9% (23/47)		-	
<b>Gewicht vor der SS</b>								
	Bis 60 kg	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	-	-	56,3% (9/16)	0,058	-	-
	61 - 80 kg		-		86,7% (26/30)		-	
	Über 80 kg		-		60,0% (3/5)		-	
<b>Anzahl der eigenen Kinder</b>								
	1	<b>IL-12</b>	61,5% (16/26)	0,079	-	-	-	-
	2		28,6% (4/14)		-		-	
	3 und mehr		28,6% (2/7)		-		-	
<b>Geschwisterzahl bei Geburt</b>								
	0	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	-	-	42,9% (3/7)	0,077	-	-
	1-2		-		75,0% (21/28)		-	
	3 und mehr		-		87,5% (14/16)		-	



		<b>LPS</b>		<b>SEB</b>		<b>PI</b>	
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert
<b>Medizinische Vorgeschichte</b>							
<b>Jemals Asthma</b>							
Ja	<b>IL-12</b>	-	-	-	-	100,0% (10/10)	0,056*
Nein		-		-		70,5% (43/61)	
<b>&gt; 5 Schachteln Zigaretten im Leben geraucht</b>							
Ja	<b>IL-12</b>	-	-	-	-	87,0% (20/23)	0,099
Nein		-		-		68,8% (33/48)	
<b>Jemals juckender Hautausschlag &lt; 6 Mon.</b>							
Ja	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	-	-	61,9% (13/21)	0,084	-	-
Nein		-		83,3% (25/30)		-	
<b>Ernährung, Infektionen und Medikamenteneinnahme in Schwangerschaft</b>							
<b>Antibiotikaeinnahme in SS</b>							
Ja	<b>IL-5</b>	11,1% (1/9)	0,082*	55,6% (5/9)	0,087*	40,0% (2/5)	0,04*
Nein		42,7% (32/75)		82,3% (51/62)		87,1% (27/31)	

		<b>LPS</b>		<b>SEB</b>		<b>PI</b>	
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert
<b>Ernährung, Infektionen und Medikamenteneinnahme in Stillzeit</b>							
<b>Allergiebeschwerden</b>							
Ja	<b>IL-5</b>	20,0% (3/15)	0,09	-	-	50,0% (3/6)	0,086*
Nein		43,8% (28/64)		-		85,7% (24/28)	
<b>Verzicht auf koffeinhaltige Getränke</b>							
Ja	<b>IL-12</b>	51,4% (19/37)	0,01	-	-	83,3% (25/30)	0,092
Nein		22,2% (8/36)		-		64,7% (22/34)	
<b>Verzicht auf scharfe Gewürze</b>							
Ja	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	26,9% (7/26)	0,1	-	-	-	-
Nein		50,0% (11/22)		-		-	
<b>Verzicht auf blähende Speisen</b>							
Ja	<b>IL-5</b>	44,6% (25/56)	0,073	-	-	-	-
Nein		22,7% (5/22)		-		-	
<b>Einnahme von Schmerzmitteln</b>							
Ja	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	18,8% (3/16)	0,069	-	-	-	-
Nein		45,5% (15/33)		-		-	
<b>Erkältung ohne Fieber</b>							
Ja	<b>IL-12</b>	-	-	-	-	66,7% (12/18)	0,095*
Nein		-		-		93,3% (14/15)	

		<b>LPS</b>		<b>SEB</b>		<b>PI</b>	
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert
<b>Hoftätigkeiten</b>							
<b>Stallarbeit im 2. SS-Trimenon</b>							
Bis 3d/Woche	<b>IL-12</b>	71,4% (5/7)	0,07*	-	-	-	-
Über 3d/Woche		25,9% (7/27)		-	-	-	-
<b>Hoftätigkeit seit Geburt des Kindes</b>							
Ja	<b>IL-5</b>	50,0% (17/34)	0,097	-	-	-	-
Nein		32,0% (16/50)		-	-	-	-
<b>Scheunenarbeit im 1. SS-Trimenon</b>							
0 Tage/Woche	<b>IL-5</b>	64,3% (9/14)	0,068	-	-	-	-
Bis 3 Tage/Woche		18,2% (2/11)		-	-	-	-
Mehr als 3 Tage/Woche		50,0% (4/8)		-	-	-	-
<b>Hofaufenthalt von Nicht-Bäuerinnen in der SS</b>							
Wenige min.	<b>IL-5</b>	25,0% (3/12)	0,092	60,0% (6/10)	0,068	-	-
1-2 Std.		37,5% (6/16)		100,0% (11/11)		-	-
> 2 Std.		70,0% (7/10)		80,0% (8/10)		-	-
<b>Hofaufenthalt von Nicht-Bäuerinnen in den letzten 3 Jahren vor der SS</b>							
Nie	<b>IL-5</b>	100,0% (8/8)	0,094	-	-	-	-
< 1x/Monat		60,0% (6/10)		-	-	-	-
Mind. 1x/Mon.		100,0% (5/5)		-	-	-	-
Mind. 1x/Woche		83,3% (15/18)		-	-	-	-

		<b>LPS</b>		<b>SEB</b>		<b>PI</b>	
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert
<b>Hoftätigkeit im 1. Lebensjahr des Kindes</b>							
Ganztags	<b>IL-12</b>	-	-	71,4% (5/7)	0,1	-	-
Halbtags		-		25,0% (2/8)		-	
Weniger als halbtags		-		41,7% (5/12)		-	
Überhaupt nicht		-		83,3% (5/6)		-	
<b>Stallaufenthalt im 3.-4. Lebensmonat des Kindes</b>							
Ja	<b>IL-12</b>	-	-	-	-	65,0% (13/20)	0,064*
Nein		-		-		100,0% (10/10)	
Ja	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	-	-	84,2% (16/19)	0,078*	-	-
Nein		-		40,0% (2/5)		-	

**Tab. A.8: Kind**

<b>Kind</b>		<b>LPS</b>		<b>SEB</b>		<b>PI</b>	
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert
<b>Erkrankungen</b>							
<b>Art der verabreichten Medikamente bis zum 2. Lebensmonat</b>							
Schulmedizin und Homöopathie/Naturheilkunde	<b>IL-5</b>	32,1% (9/28)	0,066*	-	-	-	-
Nur Homöopathie/Naturheilkunde		80,0% (4/5)		-		-	

		<b>LPS</b>		<b>SEB</b>		<b>PI</b>	
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert
<b>Bindehautentzündung/Entzündung des Tränenkanals bis zum 2. Lebensmonat</b>							
Ja	<b>IL-12</b>	-	-	-	-	57,9% (11/19)	0,067*
Nein		-		-		80,8% (42/52)	
<b>Hautausschlag in der 1. Lebenswoche</b>							
Ja	<b>IL-12</b>	61,5% (8/13)	0,053*	-	-	-	-
Nein		29,9% (20/67)		-		-	
<b>Hautausschlag im Windelbereich ab dem 2. Lebensmonat</b>							
Ja	<b>IL-5</b>	46,3% (25/54)	0,078	-	-	-	-
Nein		26,7% (8/30)		-		-	
Ja	<b>IL-12</b>	-	-	-	-	80,9% (38/47)	0,093
Nein		-		-		62,5% (15/24)	
<b>Ernährung</b>							
<b>Nahrungsmittel zur Allergievorbereitung vermieden</b>							
Ja	<b>IL-12</b>	-	-	-	-	86,2% (25/29)	0,093*
Nein		-		-		58,3%(7/12)	
<b>Nahrungsmittel auf Arztempfehlung hin vermieden</b>							
Ja	<b>IL-12</b>	-	-	-	-	58,3% (7/12)	0,093*
Nein		-		-		86,2% (25/29)	

		<b>LPS</b>		<b>SEB</b>		<b>PI</b>	
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert
<b>Abgekochte Kuhmilch vom Hof</b>							
<b>getrunken ab dem 2. Lebensmonat</b>							
Ja	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	-	-	57,1% (4/7)	0,093*	-	-
Nein		-		88,5% (23/26)		-	
<b>Fisch vermieden im 1. Lebensjahr</b>							
Ja	<b>IL-5</b>	28,6% (8/28)	0,065	-	-	-	-
Nein		55,0% (11/20)		-		-	
<b>Kuhmilch direkt vom Hof getrunken im 1. Lebensjahr</b>							
Ja	<b>IL-5</b>	-	-	66,7% (16/24)	0,072	-	-
Nein		-		85,1% (40/47)		-	
Ja	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	-	-	57,1% (4/7)	0,093*	-	-
Nein		-		88,5% (23/26)		-	
<b>Nüsse vermieden im 1. Lebensjahr</b>							
Ja	<b>IL-12</b>	-	-	-	-	84,4% (27/32)	0,087*
Nein		-		-		55,6% (5/9)	
Ja	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	-	-	87,5% (14/16)	0,063*	-	-
Nein		-		40,0% (2/5)		-	

		<b>LPS</b>		<b>SEB</b>		<b>PI</b>	
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert
<b>Umweltkontakte</b>							
<b>Leben auf Bauernhof im 1. Lebensjahr</b>							
Ja	<b>IL-5</b>	50,0% (19/38)	0,068	-	-	-	-
Nein		30,4% (14/46)		-		-	
<b>Nutzung einer Daunen-/Federdecke</b>							
Ja	<b>IL-5</b>	-	-	-	-	100,0% (12/12)	0,07*
Nein		-		-		70,8% (17/24)	
<b>Nutzung einer Naturfaserdecke</b>							
Ja	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	-	-	42,9% (3/7)	0,06*	-	-
Nein		-		79,5% (35/44)		-	
<b>Renovierung/neue Möbel im Vorjahr bis zum 2. Lebensmonat</b>							
Ja	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	-	-	65,6%(21/32)	0,096*	-	-
Nein		-		89,5% (17/19)		-	
<b>Regelmäßiger Heukontakt im 1. Lebensjahr</b>							
Ja	<b>IL-12</b>	66,7% (6/9)	0,059*	-	-	-	-
Nein		31,0% (22/71)		-		-	

		<b>LPS</b>		<b>SEB</b>		<b>PI</b>	
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert
<b>Stallaufenthalt bis zum 2. Lebensmonat</b>							
Ja	<b>IL-12</b>	-	-	30,8% (4/13)	0,072	-	-
Nein		-		63,2% (12/19)		-	
<b>Durchschnittliche Stallaufenthaltszeit im 2. Lebensmonat</b>							
0d/Woche	<b>IL-5</b>	54,5% (12/22)	0,093	83,3% (15/18)	0,026	-	-
Bis 3d/Woche		25,0% (2/8)		44,4% (4/9)		-	
Über 3d/Woche		83,3% (5/6)		100,0% (6/6)		-	
0d/Woche	<b>IL-12</b>	40,9% (9/22)	0,087	-	-	-	-
Bis 3d/Woche		50,0% (4/8)		-		-	
Über 3d/Woche		0,0% (0/7)		-		-	



**Tab. A.9: Umwelt**

Umwelt		LPS		SEB		PI	
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert
<b>Bauernhofeigenschaften</b>							
<b>Grascops als Tierfutter bis zum 2. Lebensmonat</b>							
	Ja	<b>IL-5</b>	61,9% (13/21)	0,091	-	-	-
	Nein		33,3% (5/15)		-	-	-
<b>Sägemehl als Einstreu im 1. Lebensjahr</b>							
	Ja	<b>IL-5</b>	60,0% (12/20)	0,086	-	-	-
	Nein		31,3% (5/16)		-	-	-
<b>Langes Stroh als Einstreu im 1. Lebensjahr</b>							
	Ja	<b>IL-5</b>	60,0% (12/20)	0,086	-	-	-
	Nein		31,3% (5/16)		-	-	-
<b>Futtermehl als Tierfutter im 1. Lebensjahr</b>							
	Ja	<b>IL-12</b>	-	-	-	40,0% (2/5)	0,091*
	Nein		-		-	81,8% (18/22)	
<b>Saures Gras als Einstreu im 1. Lebensjahr</b>							
	Ja	<b>IL-12</b>	63,6% (7/11)	0,067*	-	-	-
	Nein		28,0% (7/25)		-	-	-

		<b>LPS</b>		<b>SEB</b>		<b>PI</b>	
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert
<b>Andere Art von Einstreu im 1. Lebensjahr (kein Rindenmulch, Sägemehl, Hobelspäne, langes Stroh, gehäckseltes Stroh, saures Gras aus Feuchtwiesen)</b>							
Ja	<b>IL-5</b>	83,3% (5/6)	0,081*	-	-	-	-
Nein		40,0% (12/30)		-	-	-	-
<b>Anzahl Milchkühe auf Hof in SS</b>							
Bis 30	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	18,8% (3/16)	0,054*	-	-	-	-
Über 30		66,7% (4/6)		-	-	-	-
<b>Anzahl sonstiger Rinder auf Hof in SS</b>							
Bis 30	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	18,8% (3/16)	0,054*	-	-	-	-
Über 30		66,7% (4/6)		-	-	-	-
<b>Bauernstatus</b>							
Ja	<b>IL-5</b>	50,0% (19/38)	0,068	-	-	-	-
Nein		30,4% (14/46)		-	-	-	-
Ja	<b>IL-12</b>	-	-	51,5% (17/33)	0,1	-	-
Nein		-		32,5% (13/40)		-	-
<b>Wohnumgebung</b>							
<b>Komposthaufen auf Grundstück</b>							
Ja	<b>IL-5</b>	29,3% (12/41)	0,066	68,8% (22/32)	0,058	-	-
Nein		48,8% (21/43)		87,2% (34/39)		-	-

		<b>LPS</b>		<b>SEB</b>		<b>PI</b>	
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert
<b>Entfernung des Komposthaufens</b>							
< 10 m	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	-	-	91,7% (11/12)	0,069*	-	-
> 10 m		-		50,0% (6/12)		-	
<b>Misthaufen in Wohnungsnähe</b>							
Ja	<b>IL-5</b>	49,0% (25/51)	0,023	-	-	91,3% (21/23)	0,073*
Nein		24,2% (8/33)		-		61,5% (8/13)	
<b>Entfernung des Misthaufens</b>							
< 10 m	<b>IL-12</b>	33,3% (4/12)	0,069	-	-	-	-
10-50 m		34,4% (11/32)		-		-	
> 50 m		83,3% (5/6)		-		-	
<b>Haustiere</b>							
<b>Mutter hat Haustiere</b>							
Ja	<b>IL-12</b>	26,7% (12/45)	0,076	-	-	-	-
Nein		45,7% (16/35)		-		-	
<b>Katze als Haustier im 1. Lebensjahr</b>							
Ja	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	48,0% (12/25)	0,099	-	-	-	-
Nein		25,9% (7/27)		-		-	
<b>Katze im Kinderschlafzimmer im 1. Lebensjahr</b>							
Ja	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	-	-	100,0% (12/12)	0,074*	-	-
Nein		-		60,0% (3/5)		-	

		<b>LPS</b>		<b>SEB</b>		<b>PI</b>	
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert
<b>Katze in Wohnung während SS</b>							
Nie	<b>IL-12</b>	50,0% (2/4)	0,088	-	-	-	-
Gelegentlich		22,2% (2/9)		-		-	
Häufig		0,0% (0/12)		-		-	
Meistens		11,1% (1/9)		-		-	
<b>Katze in der Wohnung im 1. Lebensjahr</b>							
Keine Katze	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	26,9% (7/26)	0,056	-	-	-	-
Nie		14,3% (1/7)		-		-	
Gelegentlich		25,0% (1/4)		-		-	
Häufig		60,0% (6/10)		-		-	
Meistens		80,0% (4/5)		-		-	
<b>Kontakt zu Geschwistern</b>							
<b>Geschwister besuchen</b>							
<b>Kindergarten</b>							
Ja	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	-	-	100,0% (9/9)	0,054*	-	-
Nein		-		61,5% (8/13)		-	
<b>Kontakt zu anderen Kindern bis zum 2. Lebensmonat (mind. 1x/Woche)</b>							
Ja	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	25,0% (7/28)	0,062	-	-	-	-
Nein		50,0% (12/24)		-		-	

		<b>LPS</b>		<b>SEB</b>		<b>PI</b>	
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert
<b>Im Haus lebende Kinder von 0-12 Jahren</b>							
	<b>IL-12</b>						
1 Kind		21,2% (7/33)	0,009	26,7% (8/30)	0,063	-	-
2 Kinder		57,1% (16/28)		57,7% (15/26)		-	
3 Kinder und mehr		26,3% (5/19)		41,2% (7/17)		-	
	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>						
1 Kind		54,5% (12/22)	0,066	-	-	-	-
2 Kinder		21,1% (4/19)		-		-	
3 Kinder und mehr		27,3% (3/11)		-		-	
<b>Heizart</b>							
<b>Heizen mit Holz oder Kohle</b>							
Ja	<b>IL-12</b>	-	-	-	-	67,4% (29/43)	0,084
Nein		-		-		85,7% (24/28)	
		<b>LPS</b>		<b>SEB</b>		<b>PI</b>	
		NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert	NR-R in % und n/N	p-Wert
<b>Einzelraumheizung</b>							
Ja	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	-	-	66,7% (10/15)	0,07*	-	-
Nein		-		94,4% (17/18)		-	

Tabellen A.7-A.9: Gruppe der Non-Responder bei Geburt (NR), die nach 1 Jahr Responder (R) sind - Aufteilung nach verschiedenen Charakteristika und Ermittlung der tendenziell signifikanten p-Werte durch Chi<sup>2</sup>-Test ( $\chi^2$ ) (p<0,1). Bei einer erwarteten Häufigkeit von < 5 wurde der Exakte Test nach Fisher angewendet

## **7.6 Erklärung über eigenständige Abfassung der Arbeit**

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 und 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. E. v. Mutius betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 23.05.2011

---

Christine Adderson-Kisser