Aus dem medizinischen Zentrum für

Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik

der

Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Harald Renz

DIE HYGIENEHYPOTHESE IM BÄUERLICHEN UMFELD – IMMUNOLOGISCHE MECHANISMEN PRÄNATALER EINFLUSSFAKTOREN IM HINBLICK AUF DIE ZYTOKINEXPRESSION IM NABELSCHNURBLUT

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Markus Zimmermann aus Stuttgart, Bad Cannstatt

Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:

Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent:

Prof. Dr. Harald Renz

Korreferent:

Prof. Dr. Stefan Bauer

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Allergie und Ihre Ursachen 4

1.2 Allergie auf zellulärer Ebene 9

1.2.1 Sensibilisierung 9

1.2.2 Allergische Sofortreaktion 11

1.2.3 Allergische Spätreaktion 13

1.3 Das TH-1/TH-2 Paradigma 14

1.4 Zytokine 16

1.4.1 Interferon γ 16

1.4.2 Interleukin 5 17

1.4.3 Interleukin 10 17

1.4.4 Interleukin 12 18

1.4.5 Tumornekrosefaktor-α 19

1.5 Hypothese 21

1.6 Fragestellungen 22

2. Material und Methoden 23

2.1 Materialübersicht (siehe Punkt 7) 23

2.2 Studiendesign 23

2.3 Proben 24

2.3.1 Probenverarbeitung 25

2.3.2 Einfrieren und Auftauen der Kulturüberstände 26

2.3.3 Probenanalyse mittels Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay–Methode (ELISA) 27

2.4 Statistische Auswertung 29

3. Ergebnisse 31

3.1 Studienpopulation 31

3.2 Prävalenz und Verteilung der Zytokine 33

3.3 Unterschiede zwischen der Bauernkohorte und der Kontrollgruppe bei der Zytokinkonzentration 35

3.4 Soziodemographische Ergebnisse der Gesamtpopulation 37

3.5 Soziodemographische Ergebnisse im Studienland Finnland und Vergleich mit der Gesamtpopulation 40

3.6 Assoziation von soziodemographischen Einflussgrößen und Zytokinkonzentrationen in der Gesamtpopulation 43

3.7 Effekt der Bauernhofexposition und des Konsums von Bauernhofprodukten auf die Zytokinkonzentrationen in der Gesamtpopulation 46

3.8 Effekt der Bauernhofexposition und des Konsums von Bauernhofprodukten auf die Zytokinkonzentration in Finnland 51

4. Diskussion 56

5. Zusammenfassung 71

6. Abstract 73

7. Literaturverzeichnis 75

8. Materialübersicht 93

9. Anhang 95

9.1 Lebenslauf 95

9.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer 96

9.3 Danksagung 97

9.4 Ehrenwörtliche Erklärung 98

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Immunologische und zelluläre Faktoren regulieren die Expression von TH-1- und TH-2-Zellen. 11

Abbildung 2: Interaktionen zwischen CD4+ T-Zellen und B-Zellen und Wirkung von Mastzellen 12

Abbildung 3: Schaubild Stimulation mit PMA/ Ionomycin 25

Abbildung 4: Schaubild Stimulation mit LPS 26

Abbildung 5: Gesamtübersicht Studienpopulation nach Ländern 32

Abbildung 6: Prävalenz und Verteilung der Zytokine 33

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gesamtübersicht Studienpopulation nach Ländern 31

Tabelle 2: Unterschiede zwischen Bauernkohorte und der Kontrollgruppe bei der Zytokinkonzentration 35

Tabelle 3: Soziodemographische Faktoren und bauernhoftypische Verhaltensweise der Studienteilnehmer 38

Tabelle 4: Soziodemographische Faktoren und bauernhoftypische Verhaltensweise der Studienteilnehmer 40

Tabelle 5: Zytokine assoziiert mit Geschlecht des Säuglings in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h..... 43

Tabelle 6: Zytokine assoziiert mit mütterlichem Rauchen während der Schwangerschaft in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h 44

Tabelle 7: Zytokine assoziiert mit mütterlicher Gräserallergie in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h..... 44

Tabelle 8: Zytokine assoziiert mit dem Vorhandensein älterer Geschwister in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h 45

Tabelle 9: : Zytokinkonzentration assoziiert mit Farmerstatus in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h..... 46

Tabelle 10: Zytokinkonzentration assoziiert mit der Häufigkeit des mütterlichen Stallaufenthaltes in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h 47

Tabelle 11: Zytokinkonzentration assoziiert mit der Häufigkeit des mütterlichen Aufenthaltes im Heuschober in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h 47

Tabelle 12: Zytokinkonzentration assoziiert mit der Häufigkeit des mütterlichen Tierkontaktes während der Schwangerschaft in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h 48

Tabelle 13: Zytokinkonzentration assoziiert mit dem Rohmilchkonsum der Mutter in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h..... 48

Tabelle 14: Zytokinkonzentration assoziiert mit dem Konsum der Mutter von nicht entrahmter Milch während der Schwangerschaft in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h..... 49

Tabelle 15: Zytokinkonzentration assoziiert mit dem Konsum der Mutter von Butter aus Rohmilch während der Schwangerschaft in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h..... 49

Tabelle 16: Zytokinkonzentration assoziiert mit dem Konsum der Mutter von Joghurt aus Rohmilch während der Schwangerschaft in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h..... 50

Tabelle 17: Zytokinkonzentration assoziiert mit Farmerstatus in der finnischen Kohorte nach Stimulation mit P/I über 48h 51

Tabelle 18: Zytokinkonzentration assoziiert mit Rohmilchkonsum während der Schwangerschaft in der finnischen Kohorte nach Stimulation mit P/I über 48h..... 52

Tabelle 19: Zytokinkonzentration assoziiert mit der Häufigkeit des mütterlichen Stallaufenthaltes in der finnischen Kohorte nach Stimulation mit P/I über 48h..... 53

Tabelle 20: Zytokinkonzentration assoziiert mit der Häufigkeit des mütterlichen Aufenthaltes im Heuschober in der finnischen Kohorte nach Stimulation mit P/I über 48h 54

Tabelle 21: Zytokinkonzentration assoziiert mit der Häufigkeit des mütterlichen Tierkontaktes während der Schwangerschaft in der finnischen Kohorte nach Stimulation mit P/I über 48h 55

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Antigen presenting cells (Antigen-präsentierende-Zellen)
AD	Atopische Dermatitis
ALEX-study	The Allergy and Endotoxin study
CBMC	Cord blood monoclonal cells
CD	Cluster of differentiation
DC	Dendritische Zellen
ELISA	Enzym-linked-immunosorbent-Assay
FCS	Fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
GMR	Geometric Means Ratio
IFN-γ	Interferon γ
IgE	Immunglobulin der Klasse E
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL	Interleukin
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Children
KI	Konfidenzintervall
LGG	Lactobacillus rhamnosus GG
LPS	Lipopolysaccharide
MHC	Major histocompatibility complex
MPH	Master of Public Health
PASTURE	protection against allergy study in rural environments
PAR	Protease-abhängige Rezeptoren
PARSIVAL	Prevention of Allergy – Risk factors for Sensitation in childern related to farming and anthroposophic lifestyle
PBS	Phosphor buffered saline
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat

Rpm	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSV	Respiratorisches Synzytial-Virus
SEB	Staphylococcus aureus enterotoxin B
Tab.	Tabelle
TCR	T-Cell Receptor
TH	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TNF α	Tumornekrosefaktor α

1. Einleitung

Die Prävalenz von allergischen Erkrankungen im Kindesalter hat besonders in den Industrienationen innerhalb der letzten Jahrzehnte deutlich zugenommen. An den zugrunde liegenden Ursachen und am Verständnis dieser Erkrankungen wird derzeit intensiv geforscht. Besondere Aufmerksamkeit gilt dabei der prä- und auch postnatalen Phase des Neugeborenen, da der Grundstein zur Entwicklung allergischer Erkrankungen wahrscheinlich schon sehr früh gelegt wird. Zu den allergischen Erkrankungen werden insbesondere die allergische Rhinitis (Heuschnupfen), Asthma, atopische Dermatitis und Lebensmittelallergien gerechnet.

Wie die dritte Phase der ISAAC-Studie [7] zeigen konnte, gab es in Deutschland, einer klassischen Industrienation, innerhalb von 5 Jahren für Kinder von 6-7 Jahren einen Anstieg der Prävalenz von Asthma von 9,6% auf 12,8% und für die allergische Rhinitis von 5,4% auf 6,9%. Verglichen mit Indien, (Asthma 6,2% auf 6,8%, Rhinitis von 3,2% auf 3,9%) einem typischen Schwellenland, sind die Werte deutlich höher, was bereits als Hinweis für die von Strachan Ende der 80er Jahre formulierte „Hygienehypothese“ [146] gesehen werden kann. Mit dieser postulierte er einen Zusammenhang von eingeschränkten hygienischen Bedingungen und Haushaltsgröße mit dem verminderten Auftreten allergischer Erkrankungen und legte damit den Grundstein für ein großes Forschungsgebiet dem auch diese Arbeit angehört. Mittlerweile hat diese „Hygienehypothese“ breite Anerkennung gefunden, obwohl sich die Beweisführung zum größten Teil auf epidemiologische Studien stützen. Diese zeigten, dass Kinder, die auf Bauernhöfen aufwachsen, seltener allergische Erkrankungen aufweisen als andere Kinder aus demselben Umfeld.

In diesem Kontext ist die ALEX-Studie (**Al**lergy and **E**ndoto**X**in population) anzuführen, die bei einer Untersuchung von 812 Kindern im Alter von 6-13 Jahren, unter den Nichtbauern-Kindern (n=493) eine erhöhte Prävalenz atopischer Erkrankungen wie Asthma und allergische Rhinitis fand [133]. Als besonders schützend stellten sich der Kontakt zu Tieren und der Konsum von Rohmilch dar.

Einen ähnlichen Effekt konnte die Gruppe um Braun-Fahrländer nachweisen [19] indem sie 1620 Kinder aus dem ländlichen Umfeld anamnestisch befragten und von 404 Kindern Blutproben auf IgE untersuchten. Es lies sich ein besonderer Vorteil für Kinder nachweisen, deren Eltern die volle Arbeitszeit auf einem bäuerlichen Betrieb verbrachten. Weitere Arbeiten konnten diese Tendenzen bestätigen [44, 154, 164].

Um die Ursache dieses Effektes genauer zu ergründen und daraus vorbeugende Empfehlungen für die Vermeidung von Allergien abzuleiten, beziehungsweise Konzepte für Therapieansätze zu erarbeiten, sollen in der PASTURE-Studie (Protection against Allergy-STUdy in Rural Enviroment) schwangere Mütter und ihre neugeborenen Kinder, in zwei Kohorten erfasst werden. Eine Kohorte bestehend aus Schwangeren aus bäuerlichem Umfeld und eine Kohorte bestehend aus Schwangeren aus nichtbäuerlichem Umfeld, welche jedoch aus derselben Region entstammen. Damit ist die PASTURE-Studie die erste Kohortenstudie auf diesem Gebiet.

Zunächst werden die Verhaltensweisen der Mutter während der Schwangerschaft, wie beispielsweise ihre Ernährung oder die Dauer ihrer Stallaufenthalte beobachtet. Daraufhin werden Messungen induzierter Zytokinkonzentrationen im Nabelschnurblut des Nachwuchses vorgenommen, da bereits vorhergehende Studien ein Risiko für atopische Erkrankungen gemessen an Zytokinexpressionen beim Neugeborenen vorhergesagt hatten [101, 136]. In der Folge werden die Kinder bis zu ihrem sechsten Lebensjahr begleitet um die Manifestation möglicher allergischer Erkrankungen beobachten zu können.

Assoziationen zwischen dem Verhalten der Schwangeren und den Zytokinkonzentrationen sollen Hinweise auf allergiefördernde- beziehungsweise mindernde Verhaltensweisen der Mutter geben.

Die Untersuchung wird von der Europäischen Union gefördert und neben Deutschland (Bayern) auch in Finnland, Österreich, der Schweiz und dem Französischen Jura durchgeführt.

Dieser Teilbereich der Studie wird sich mit der Betrachtung der Expression der Interleukine 5, 10 und 12 sowie Interferon-γ (IFN-γ) und Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) nach Stimulation mit PMA/Ionomycin (P/I), LPS (gram-), und SEB im Nabelschnurblut Neugeborener befassen. Die gemessenen Zytokinkonzentrati-

onen werden mit der in Fragebögen erfassten Lebensweise der Mutter während der Schwangerschaft assoziiert. Mögliche Korrelationen werden daraufhin im Kontext der aktuellen Literatur bezüglich ihrer Bedeutung zur Vorhersage allergischer Erkrankungen diskutiert. Zudem werden die Ergebnisse der finnischen mit denen der Gesamtpopulation verglichen und auf Besonderheiten untersucht.

Doch was führt zu allergischen Erkrankungen?

1.1 Allergie und Ihre Ursachen

Zum Formenkreis der allergischen Erkrankungen zählen Heuschnupfen (Synonym: allergische Rhinitis / Rhinokonjunktivitis), Asthma bronchiale und Neurodermitis (Synonym: atopische Dermatitis / atopisches Ekzem). Immunologisch haben diese drei Erkrankungen eine erhöhte Produktion von IgE nach vermehrtem Antigenkontakt gemeinsam [73, 95].

Die Beeinträchtigung durch die Erkrankungen kann individuell sehr variieren und bewegt sich von leichten Atemwegsirritationen bis hin zum potentiell letalen Status asthmaticus [110]. Wie in der Einleitung bereits erwähnt hat die Inzidenz und Prävalenz der atopischen Erkrankungen in den letzten Jahrzehnten, vor allem in den Industrienationen, deutlich zugenommen, was zu einer Reihe von epidemiologischen Studien geführt hat, die sich die Aufklärung dieses Phänomens zum Ziel gemacht haben.

Zunächst konnte Strachan 1989 einen Zusammenhang zwischen der Anzahl an Geschwistern in einer Familie und der Häufigkeit allergischen Erkrankungen nachweisen [146]. Dabei wertete er eine Geburtenkohorte von 17414 britischen Kindern aus die alle in einer definierten Woche im März 1958 geboren wurden. Im Alter von 23 Jahren wurden Selbstauskünfte von den Eltern über mögliche allergische Erkrankungen ihrer Kinder eingeholt. Die daraus gewonnenen Ergebnisse konnte von weiteren Studien bestätigt werden und führten zu der Auffassung, dass ein schützender Effekt vor Allergien durch die von älteren Geschwistern verursachten frühkindlichen Erkrankungen bestand [157]. Die daraus abgeleitete „Hygienetheorie“ gab Anlass zur Untersuchung von Ganztagesbetreuungsstätten. Dort vermutete man ähnliche Effekte die sich durch anschließende Studien auch zeigen ließen. Zusätzlich fiel auf, dass die allergieprotektive Wirkung nicht allein vom Umfeld sondern auch von genetischen Faktoren, wie beispielsweise den allergischen Erkrankungen der Mutter, abhing [25, 72, 94]. Genetische Faktoren werden im letzten Abschnitt eingehend behandelt.

Zur weiteren Aufklärung des Effektes verglichen Studien die Prävalenzen und die Risikofaktoren von Allergien und respiratorischen Symptomen von Ost- und

West-Deutschland vor der Wiedervereinigung 1990. Sie kamen zu dem Ergebnis einer signifikant niedrigeren Prävalenz von Asthma und respiratorischen Symptomen in Ostdeutschland vor 1990, welche sich nach der Wiedervereinigung langsam an das Westniveau angenähert hatten [115]. Studien dazu untersuchten Kinder die nach 1990 geboren wurden, und fanden deutlich steigende Prävalenzraten von Asthma, Heuschnupfen und atopischem Ekzem. Ein Grund dafür mag die „Verwestlichung" des Lebensstils, das heißt vor allem der höhere Hygienestandard, in den neuen Bundesländern gewesen sein und die damit in Zusammenhang stehenden Risiken für Atopie [68]. Renz und Kollegen konnten sogar eine klar TH-2-gewichtete Immunantwort bei allergischen Kindern in Westdeutschland feststellen [131].

Ein weiterer protektiver Effekt im Bezug auf atopische Erkrankungen scheint der nähere Umgang mit Haustieren zu sein. Es wird angenommen, dass dieser Effekt aus einer erhöhten mikrobiologischen Belastung in Haushalten mit Haustieren resultiert [161]. Gestützt wird diese Annahme von der AIRALLERG-Studie, welche ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der mirkobiologischen „Indoor-Belastung" und Allergien gesehen hat. Diese Studie konnte signifikant höhere Level an Endotoxin, einem Zellwandbestandteil von gram-negativen Bakterien, in Haushalten mit Katzen im Vergleich zu Haushalten ohne Katzen feststellen [59, 60]. Dieser Effekt konnte von weiteren Studien bestätigt werden, unklar bleibt jedoch noch die Abhängigkeit von der Art des Haustiers [37, 140, 158].
Drei weitere Studien, die in verschiedenen europäischen Bevölkerungen mit „alternativem Lebensstil" durchgeführt wurden, decken sich mit den Beobachtungen der „Hygienetheorie". Familien, die sich dem anthroposophischen Lebensstil verschrieben hatten, welcher die Ablehnung von Antibiotika und den Konsum von biologisch angebauten (und damit mikrobiell kontaminierten) Nahrungsmitteln beinhaltet, hatten deutlich niedrige Prävalenzraten von Asthma und allergischen Erkrankungen [5, 52, 92]. Diese Beobachtung bestätigte eine weitere Studie, die sich besonders mit der Antibiotikagabe im frühen Lebensalter (0-4 Jahre) beschäftigt hatte [28]. Damit zeigte sich ein protektiver Effekt für

das Unterlassen antibiotischer Behandlungen, und damit eine längere Verweildauer von Bakterien im Organismus.
Des Weiteren zeigte eine Kohortenstudie aus Vororten von Detroit (USA) an der 835 Kinder teilnahmen, dass Kinder, die innerhalb des ersten Lebensjahres an fiebrigen Infekten erkrankt waren, eine signifikant niedrigere Inzidenz von atopischen Erkrankungen hatten. Dabei konnte mit jeder zusätzlichen fiebrigen Episode im ersten Lebensjahr die Wahrscheinlichkeit einer atopischen Erkrankung weiter gesenkt werden [165].
Analog dazu wurde auf Basis der ISAAC Studie herausgefunden, dass die Gabe von Paracetamol (fiebersenkende Arznei) im ersten Lebensjahr das Risiko für Asthma, Rhinokonjunktivitis und atopischem Ekzem im Alter von 6-7 Jahren signifikant erhöhte [9].
Trotz kontroverser Diskussion dieses Artikels in der Fachpresse aufgrund der zentralen Rolle von Paracetamol in der Kinderheilkunde, sind Medikamente bei der frühkindlichen Entwicklung von atopischer Disposition nicht zu vernachlässigen.
Ein anderer protektiver Faktor im Bezug auf allergische Erkrankungen scheint die Infektion mit Parasiten wie beispielsweise Helminthen zu sein. Dies konnte in Studien gezeigt werden, die parasitendurchseuchte Populationen in den Tropen untersuchten. Erklärt wird das durch eine immunsupressive Wirkung der Parasiten durch spezielle Oberflächenproteine [31, 32, 172].
Als Risikofaktor für allergische Erkrankungen konnten einige Studien zeigen, dass die steigende Luftverschmutzung mit Stoffen wie SO_2 [176], CO und NO [175], O_3 und NO_2 zum Anstieg der Asthma-Prävalenz beiträgt. Andere Studien hingegen konnten diese Beobachtungen nicht nachvollziehen. So wurden in einigen osteuropäischen Ländern und in China, die die höchsten Luftverschmutzungsraten weltweit aufweisen, niedrige Prävalenzen für allergisches Asthma gefunden. Dagegen war die Asthma-Prävalenz in Neuseeland sehr hoch, bei gleichzeitig sehr niedriger Luftverschmutzung [7].
Ein weiterer begünstigender Faktor für die Entstehung von allergischen Erkrankungen ist das Rauchen der Eltern, insbesondere der Mutter, wie bisher mehrere Studien darlegen konnten [106, 117, 150].

Gleichzeitig spielen das erhöhte Gestationsalter [108], ein niedriges Geburtsgewicht und Frühreife [61], sowie die Geburt durch Kaiserschnitt [112, 139] eine nicht zu vernachlässigende Rolle als Risikofaktoren für spätere allergische Erkrankungen.
Auch das Stillverhalten der Mutter hat signifikanten Einfluss auf eine spätere atopische Veranlagung des Nachwuchses. So konnten mehrere Kohortenstudien einen deutlichen Vorteil von gestillten Kindern gegenüber ungestillten Kindern belegen. Sogar die Länge der Stillzeit hatte Auswirkungen auf das spätere Atopierisiko [91, 104].
Zudem können manche frühkindlichen Virus-Infektionen wie zum Beispiel RSV und Keuchhusten eine Anfälligkeit für allergische Erkrankungen fördern [13].

Schlussendlich muss man genetische Ursachen für als Risikofaktor in Betracht ziehen. Zunächst ist es erwiesen, dass Nachkommen von Patienten mit allergischen Erkrankungen bereits ein deutlich höheres Risiko haben zu erkranken [100, 108, 122]. Auch Zwillingsstudien weisen auf eine deutliche genetische Komponente für hin. Übereinstimmungsraten bezüglich allergischer Erkrankungen für eineiige Zwillinge wurden auf 72-86% geschätzt, während für zweieiige Paare die Übereinstimmung nur bei 21-23% lag [26, 93, 143].
Dafür gibt es mehrere Erklärungsansätze. Beispielsweise gibt es Polymorphismen in den Genen der Oberflächenproteine, die zu einer Durchlässigkeit von epithelialen Barrieren (z.B. Schleimhäute im gastrointestinalen oder respiratorischem Trakt) führen und somit das Durchtritt von Allergenen begünstigen. Diese eigentlich harmlosen Substanzen werden durch das entzündlich aktivierte Umfeld der Epithelläsion fälschlicherweise als bedrohlich eingestuft und mit einer entsprechenden Immunantwort bekämpft [30].
Ein weiterer genetischer Faktor sind Polymorphismen in Genen der Toll-Like-Rezeptoren (TLR). Diese Rezeptorfamilie dient der Erkennung von pathogenen Substanzen wie Lipopolysacchariden, einem Zellwandbestandteil, oder fremder DNA. Im besonderen Fokus stehen dabei „TLR 2“ und „TLR 4“.
„TLR 2“ ist Bestandteil einer Kaskade zur Erkennung von Membranbausteinen von gramnegativen und grampositiven Bakterien. Innerhalb der bereits oben genannten ALEX-Studie konnte eine Signifikanz zwischen einem bestimmten

Polymorphismus (TLR2-16934) und dem Auftreten von Asthma und atopischer Dermatitis festgestellt werden [47].
Der Rezeptor „TLR 4“ hingegen erkennt ausschließlich Lipopolysaccharide (LPS) welche ein Membranbestandteil von gramnegativen Bakterien sind. Eine schwedische Arbeitsgruppe untersuchte einen Polymorphismus des „TLR 4“ (Asp299Gly) zusammen mit dem CD 14/-159 Polymorphismus und konnte über die Bestimmung von Zytokinen (IL-12, IL-10, IFN-γ) ein deutlich erhöhtes Risiko für extrinsisches Asthma aufzeigen [49].
Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass schon die erste Erkennung von pathogenen Stoffen durch TLR´s bereits ausschlaggebend für die weitere Informationsverarbeitung und -Bewertung des Antigens ist.

Nicht zu von der Hand zu weisen ist eine psychische Komponente bei der Entstehung von Atopie, die mit Sicherheit nicht allein ursächlich, jedoch modulierend allergische Reaktionen beeinflussen kann.

Nach diesen zahlreichen epidemiologischen Hinweisen für die Ursachen von allergischen Erkrankungen, soll im Folgenden auf die Abläufe auf zellulärer Ebene eingegangen werden.

1.2 Allergie auf zellulärer Ebene

Unter dem Begriff Allergie versteht man die immunologische Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ I (nach Coombs und Gell, auch Soforttyp oder anaphylaktischer Typ), das heißt eine Reaktion des Immunsystems auf ein ansonsten harmloses, nicht pathogenes Antigen. Das Antigen wird in diesem Zusammenhang als Allergen bezeichnet [110].
Der Ablauf der Typ I Überempfindlichkeitsreaktion lässt sich in 3 Phasen unterteilen: die Sensibilisierung, die allergische Sofortreaktion und die allergische Spätreaktion [153].

1.2.1 Sensibilisierung

Als Sensibilisierung bezeichnet man den ersten Kontakt des Immunsystems mit einem Allergen. Dieser erfolgt häufig an mukosalen Oberflächen, wie z.B. in den Atemwegen. Das Allergen wird meist von dendritischen Zellen als Antigen-präsentierende Zellen (APCs) über Toll-Like-Rezeptoren (TLR) erkannt, aufgenommen und in die ableitenden, regionalen Lymphknoten transportiert, wo es über den Major Histocompatibility Complex-II (MHC-II) präsentiert wird [132]. Das so präsentierte Allergen wird von Allergen-spezifischen $CD4^+$ T-Helferzellen (TH-Zellen) über ihren Antigenrezeptor (T Cell Receptor, TCR) erkannt [36,127].
In Abhängigkeit von der Bindungsstärke des Allergens an den TCR und von dem umgebenden Zytokinmilieu differenzieren sich die naiven TH-Zellen in TH-1- oder TH-2-Zellen. Bindet ein Antigen mit hoher Affinität an den TCR und liegen in der Umgebung die Zytokine Interleukin (IL)-12 und IL-18 vor, die von APCs und T-Zellen gebildet werden, so differenzieren sich antigenspezifische naive TH-Zellen vorwiegend zu TH-1-Zellen [75]. TH-1-Zellen produzieren nach ihrer Aktivierung Zytokine wie Interferon-γ (IFN-γ), IL-2 und Tumornekrosefaktor-α (TNF-α), welche unter anderem die Entstehung von TH-2 Zellen hemmen [109, 119]. Überwiegt im umgebenden Milieu das Zytokin IL-4, das von TH-2-Zellen, eosinophilen Granulozyten und Mastzellen gebildet wird, und bindet das

Antigen nur schwach an den TCR, so differenzieren sich die Antigen-spezifischen naiven TH-Zellen bevorzugt in TH-2-Zellen [142]. TH-2-Zellen produzieren nach ihrer Aktivierung Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-13 [109, 119].

Bei einer Allergie differenzieren allergenspezifische naive TH-Zellen nach Präsentation des Allergens durch APCs in TH-2-Zellen. Diese induzieren durch die Sekretion von IL-4 und IL-13 die IgE-Produktion der allergenspezifischen B-Zellen. Dies geschieht über zwei Signale. Zum einen binden IL-4 und IL-13 an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der B-Zellen, was über den JAK/STAT-Signalweg zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Signaltransduktor und Aktivator der Transription-6 (STAT-6) führt [167]. Zum anderen exprimieren die aktivierten TH-2-Zellen den CD40-Liganden (CD40L), der eine kostimulatorische Bindung mit dem CD40-Molekül auf B-Zellen eingeht, was zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappa-B führt [33]. Durch diese beiden Signale werden die B-Zellen aktiviert, wechseln den Isotyp der von ihnen produzierten Antikörper von IgM zu IgE und differenzieren sich zu Plasmazellen. Das produzierte IgE gelangt in den Blutkreislauf und bindet an den hochaffinen Fc-Rezeptor-I (Fc-R-I) auf Mastzellen und an den niedrigaffinen Fc_{ε}-Rezeptor-II (Fc-R-II, CD23), der auf Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten, Thrombozyten und Makrophagen exprimiert wird [23]. Die eigentliche allergische Reaktion tritt also erst nach einem zweiten Kontakt mit dem Allergen in Form einer allergischen Sofortreaktion auf.

Wie die folgende Abbildung zeigt haben neben Zytokinen auch noch andere Faktoren einen Einfluss auf die Differenzierung in TH-1-oder TH-2-Zellen: Den TH-1-Phänotyp fördert die Anwesenheit bakterieller DNA, die reich an Cytosin-phosphatidyl-Guanosin (CpG)-Motiven ist. Der TH-2-Phänotyp wird durch die Präsenz des Transkriptionsfaktors GATA-3, c-maf, Prostaglandin E2 (PGE2) und Stickoxid gefördert. IL-10 und Transforming Growth Factor- β (TGF- β) inhibieren sowohl die TH-1- als auch die TH-2 Zellantwort. (grüne Pfeile: stimulierende Effekte; rote Pfeile: inhibierende Effekte)

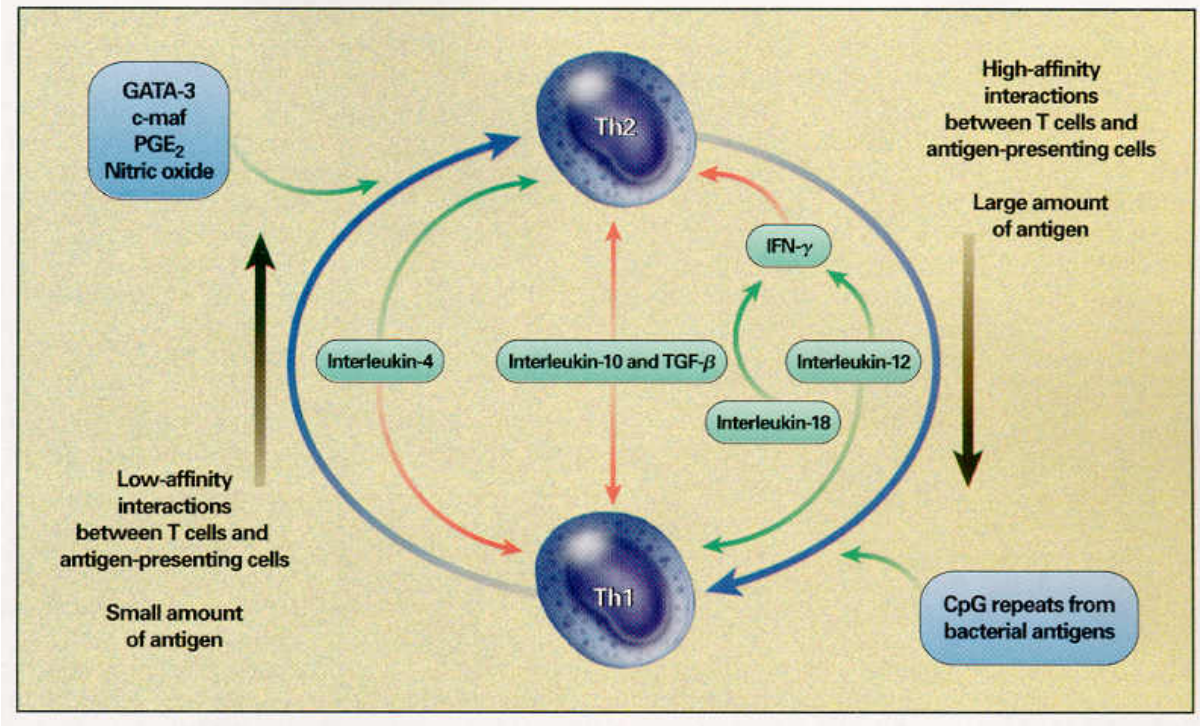

Abbildung 1: Immunologische und zelluläre Faktoren regulieren die Expression von TH-1- und TH-2-Zellen [85]

1.2.2 Allergische Sofortreaktion

Nach der Sensibilisierung löst ein weiterer Allergenkontakt eine allergische Sofortreaktion aus. Dabei bindet das Allergen an spezifische IgE-Antikörper, die an Fc-R-I auf Mastzellen oder basophilen Granulozyten gebundenen sind. Die Rezeptoren werden kreuzvernetzt, wodurch (z.B. im Fall von allergischem Asthma) die Mastzellen aktiviert werden und primäre und sekundäre Mediatoren freisetzen, die eine Vasodilatation, eine erhöhte Gefäßpermeabilität und eine Konstriktion der glatten Muskulatur bewirken [85, 86].

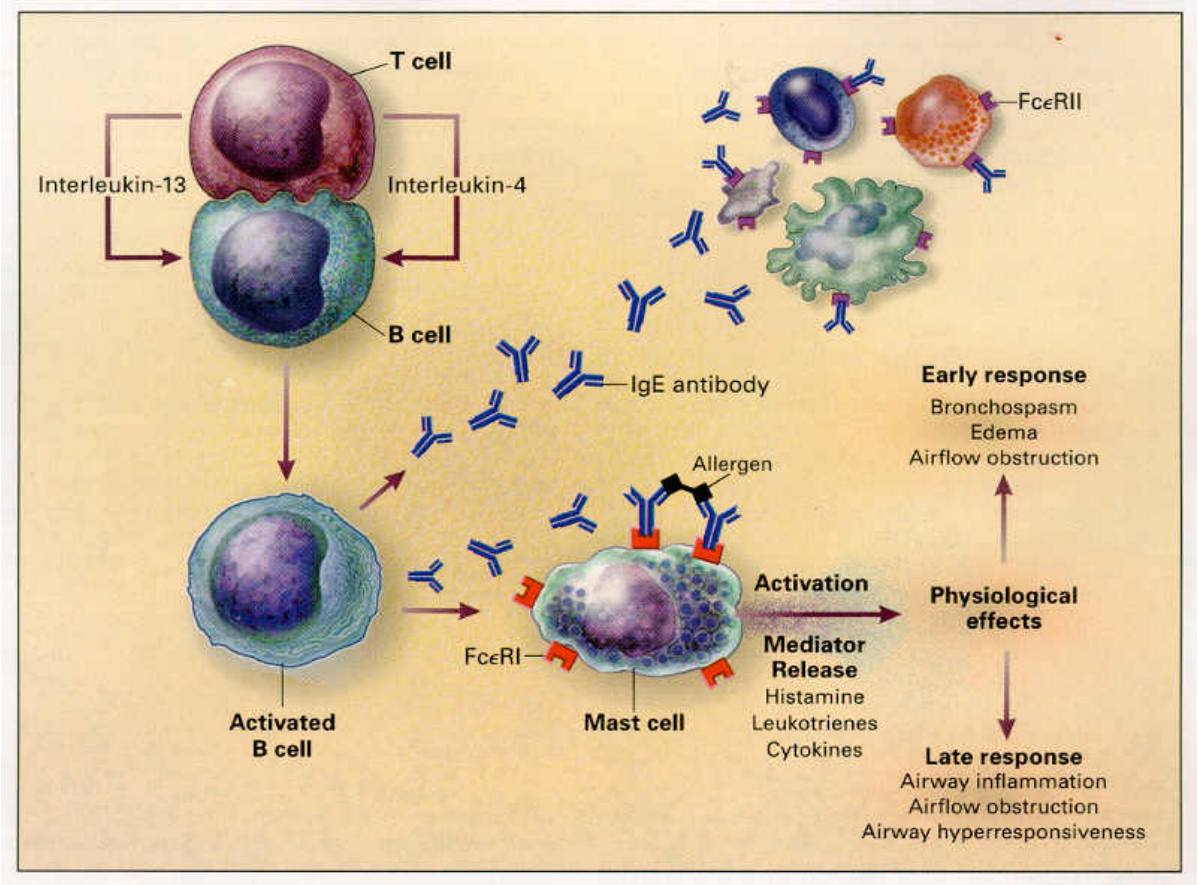

Abbildung 2: Interaktionen zwischen CD4+ T-Zellen und B-Zellen und Wirkung von Mastzellen [23]

Primäre Mediatoren werden nach der Aktivierung der Mastzellen aus vorgeformten Granula freigesetzt und wirken innerhalb von Minuten. Zu ihnen gehört u.a. Histamin, ein kurzlebiges, vasoaktives Amin, das zu einer sofortigen Erhöhung der lokalen Durchblutung und Gefäßpermeabilität führt. Aus den vorgeformten Granula werden außerdem eine Reihe von Proteasen, z.B. Tryptase und Chymase, freigesetzt, die Bindegewebe abbauen und so zur Zellschädigung führen [153]. Tryptase aktiviert außerdem Protease-abhängige Rezeptoren (PARs) auf Endothel- und Epithelzellen, wodurch eine Effektorkaskade induziert wird. Diese beinhaltet die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen, die selektiv eosinophile und basophile Granulozyten rekrutieren [74].

1.2.3 Allergische Spätreaktion

Abhängig von der Menge des Allergens können die in der allergischen Sofortreaktion freigesetzten Zytokine IL-4 und IL-13 sowohl die TH-2-Zellen als auch die B-Zellen in einem aktivierten Zustand halten, was zu einer kontinuierlichen Produktion von IgE führt. Die TH-2-Zellen sezernieren außerdem IL-3 und IL-5. Diese Zytokine fördern die Proliferation und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten, die in das Gewebe rekrutiert werden. Ihre Ansammlung im Gewebe und nachhaltige Aktivierung sind charakteristisch für eine chronische, allergische Entzündung und verantwortlich für die auftretenden Gewebeschädigungen. Die Ansammlung von eosinophilen Granulozyten und auch neutrophilen Granulozyten im Gewebe ist gefolgt von einer Infiltration durch CD4+ T-Zellen und basophile Granulozyten, was zu der typischen Zusammensetzung des allergischen Zellinfiltrats führt [18, 173].

Die Akkumulation von eosinophilen Granulozyten im Gewebe resultiert aus der selektiven Interaktion zwischen den Adhäsionsmolekülen α4β1-Integrin (auch Very Late Antigen (VLA)-4 genannt) und Vascular-Cell Adhesion Molecule (VCAM), sowie der Rekrutierung durch die CC-Chemokine Eotaxin (CCL11), RANTES (CCL5), Macrophage Inflammatory Protein 1α (MIP 1α, CCL3), Monocyte Chemotactic Protein (MCP)-3 (CCL7) und MCP-4 (CCL13). Zudem ist unter dem Einfluss von IL-5, IL-3 und Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) ihr Überleben verlängert (beziehungsweise ihre Apoptose verzögert). Außerdem führt lokales IL-5 dazu, dass sich die im Gewebe eintreffenden Vorläufer von eosinophilen Granulozyten differenzieren [41, 85].

Bei abschließender Betrachtung der zellulären Vorgänge einer Allergie wird deutlich wie wichtig die Rolle der informationsleitenden Zytokine ist. Ihre Konzentrationen Bestimmen die Prägung der T-Zellen und bestimmen damit die Art der Immunantwort. Aus diesem Grund werden die Konzentrationen von Schlüsselzytokinen in dieser Arbeit gemessen.

1.3 Das TH-1/TH-2 Paradigma

Grundlage zur Erklärung der Hygienehypothese ist das als ursächlich gesehene TH-1/TH-2-Paradigma. Es betrachtet IFN-γ produzierende TH-1-Zellen als Gegenspieler der TH-2-Zellen. Da TH-2-Zellen in der Pathophysiologie von allergischen Reaktionen wie dem allergischen Asthma bronchiale eine zentrale Rolle spielen, wird entsprechend dem TH-1/TH-2-Paradigma TH-1-Zellen ein protektiver Effekt bei allergischen Reaktionen zugeordnet. Es besteht die Hypothese, dass die Inhibition einer allergischen Reaktion auf inhalative Antigene durch eine frühzeitige Differenzierung der Immunantwort in Richtung einer TH-1-Immunantwort erreicht wird. Dazu gibt es verschiedene Beobachtungen.

Beispielsweise senkt eine Infektion mit Mycobakterium Bovis die allergeninduzierte pulmonale Eosinophilie und bronchiale Hyperreagibilität durch die Hemmung von IL-4 und IL-5 [69]. Das heißt, dass mikrobielle DNA wie bereits im oberen Abschnitt erwähnt zu einer Ausprägung der TH-1 Immunität führt.

Außerdem wird die allergieprotektive Rolle der TH-1 Immunität durch Studien zu TH-1 dominierten Autoimmunerkrankungen demonstriert. Dabei zeigt sich das Patienten mit Rheumatoider Arthritis [4] oder Kinder mit Typ 1 Diabetes [76] ein deutlich niedrigeres Risiko haben atopischen Erkrankungen zu entwickeln. Analog dazu haben Kinder die frühzeitig atopische Symptome zeigen später geringere Tendenzen einen Typ 1 Diabetes (autoimmune Genese) zu entwickeln [42].

Dass das TH-1/TH-2 Paradigma sehr viel komplexer ist als zunächst angenommen zeigen jedoch auch diese Befunde: So konnte in einem Mausmodell für allergisches Asthma, der Transfer von allergenspezifischen TH-1-Zellen die durch TH-2-Zellen induzierte bronchiale Hyperreagibilität und pulmonale Entzündung nicht hemmen [65]. Außerdem kann eine hohe TH-1-Cytokinexpression in der Lunge eine Verstärkung der allergischen Entzündung hervorrufen [130].

Trotzdem kann für die menschliche Entwicklung folgendes Modell angenommen werden: Während der Schwangerschaft komm es zunächst zu einer Verschiebung der T-Helferzellpopulation der Mutter mit vermehrter Produktion der TH-2-Zytokine und verminderter Produktion der TH-1-Zytokine. Diese Verschiebung

des Zytokinmusters ist wahrscheinlich für eine erfolgreiche Schwangerschaft essentiell, da TH-1-Zytokine wie IL-2 und IFN-γ die Schwangerschaft gefährden [98, 163]. Das heißt, bei Neugeborenen ist die Zytokinproduktionskapazität zunächst durch ein TH-2-Zytokinmuster charakterisiert [123, 124]. Das TH-2-Zytokinmuster der Neugeborenen bildet sich bei Nicht-Atopikern innerhalb der ersten 2 Lebensjahre zurück [124, 170]. Neugeborene, die später eine atopische Erkrankung entwickeln, zeigen eine verminderte Expression des Zytokins IFN-γ, welches die Differenzierung vom TH-0 Zellen zu TH-1-Zellen fördert. Bei ihnen persistiert das TH-2-Zytokinmuster.

Um mögliche Änderungen in den Zytokinprofilen frühzeitig feststellen zu können, und daraus Rückschlüsse auf die Entwicklung von allergischen Krankheiten zu ziehen, werden in dieser Arbeit TH-1 und TH-2 spezifische Zytokine im Nabelschnurblut Neugeborener gemessen, um einen Grundstein für die Weiterbeobachtung der Kohorten über die folgenden sechs Jahre zu legen.

1.4 Zytokine

Zytokine sind kleine Proteine (etwa 25 kDa) die von verschiedenen Zellen sezerniert werden, meistens als Reaktion auf einen Stimulus. Sie bewirken Zellantworten durch die Bindung an hochspezifische Rezeptoren. Ihre Wirkung entfalten sie autokrin, indem sie ihre sezernierende Zelle beeinflussen, parakrin, indem sie das direkte Umfeld beeinflussen, und endokrin, indem sie weit entfernt liegende Zellen erreichen, was jedoch von ihrer Möglichkeit in den Blutstrom zu gelangen und ihrer Halbwertszeit im Blut abhängt [110].

In dieser Arbeit werden die Konzentrationen von fünf verschiedenen Zytokinen in stimuliertem Nabelschnurblut gemessen, die im Folgenden einzeln erläutert werden.

1.4.1 Interferon γ

Interferon-γ (IFN-γ), ist ein homodimeres Glykoprotein bestehend aus 143 Aminosäuren, welches hauptsächlich von aktivierten $CD4^+$, $CD8^+$ T-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) produziert wird und deshalb als besonders wichtiges Zytokin des angeborenen und erworbenen Immunsystems gilt. Zu den vorrangigen Eigenschaften von IFN-γ gehört die Aktivierung von Makrophagen, und dabei insbesondere die Induktion der Enzymsynthese zur Abtötung phagozytierter Mikroben.

Darüber hinaus führt IFN-γ zu einer gesteigerten Expression von MHC-I-Molekühlen auf den meisten Zellen sowie von MHC-II-Molekühlen auf Antigen-präsentierenden Zellen. Außerdem beschleunigt es die intrazelluläre Antigenprozessierung.

Eine weitere grundlegende Eigenschaft, ist die Förderung der Differenzierung von T-und B-Lymphozyten. Dabei stimuliert IFN-γ naive T-Zellen zur Differenzierung in Richtung TH-1-Zelle und hemmt die Differenzierung von TH-2-Zellen. Gleichzeitig kommt es zur Förderung eines Isotypenwechsels der B-Zellen zu

den Immunglobulinunterklassen IgG2a und IgG3 und zur parallelen Hemmung des Isotypenwechsels von IgG1 zu IgE. Damit wirkt es chronisch allergischen Erkrankungen entgegen [110, 129, 149].

1.4.2 Interleukin 5

Interleukin 5 (IL-5) ist ein Homodimer der aus 115 Aminosäuren besteht und hauptsächlich von aktivierten TH-2 Zellen und aktivierten Mastzellen ausgeschüttet wird. Seine Aufgabe besteht in der Induzierung des Wachstums eosinophiler Zellen und deren Differenzierung, um eine effektive Parasitenneutralisation zu gewährleisten [27, 174].

Darüber hinaus wirkt IL-5 synergistisch mit IL-4 und IL-10, und fördert damit die TH-2-vermittelte allergische Reaktion durch Aktivierung eosinophiler Zellen im Gewebe. Auch basophile Zellen werden durch Il-5 aktiviert und somit die Bildung von Histamin gefördert, welches eine bedeutende Rolle für die lokale Gewebsreaktion bei allergischen Reaktionen spielt [12, 71, 87].

Bestärkt werden diese Beobachtungen durch Il-5 Knockoutmäuse, die trotz Sensibilisierung gegen Antigene bei deren Applikation keine Eosinophilie zeigten [54, 89]. Dieses Zytokin ist damit ein Vertreter der TH-2-Immunantwort.

1.4.3 Interleukin 10

Interleukin 10 (IL-10) ist ein Monomer aus 160 Aminosäuren. Zunächst wurde es als Faktor identifiziert, der vorwiegend von TH-2-Zellen produziert wird und die Zytokinproduktion von TH-1-Zellen hemmt [50].

Darüber hinaus hat man festgestellt, dass es auch von wenigen TH-1-Zellen [40], regulatorischen T-Zellen, aktivierten Makrophagen, einigen aktivierten B-Zellen und von nicht-lymphatischen Zellen z.B.: Keratinozyten hergestellt wird [145].

Bei Lymphozyten führt IL-10 zur Hemmung der TH-1 Immunantwort, indem es die Proliferation, Aktivierung und Zytokinsynthese von TH-1 und natürlichen Killerzellen unterdrückt [96]. Allerdings kann IL-10 auch die Zytokinproduktion von TH-2-Lymphozyten hemmen [40].

Dabei führt es zur Hemmung der Mastzellen [6, 137] und eosinophilen Granulozyten und deren Zytokinproduktion [148]. Des Weiteren findet eine Hemmung der antigenpräsentierenden Zellen statt, die sich vor allem auf die Reifung der Zellen [22], die Expression von MHC Klasse II Rezeptor und deren kostimulatorische Faktoren [38, 51, 107] und die Hemmung der TH-2-Zellaktivierung [62] auswirkt.

Da sowohl proinflammatorische Zytokine des TH-1 wie auch des TH-2 Typs die IL-10 Freisetzung erhöhen [35, 80], stellt die Ausschüttung von IL-10 einen Faktor dar, der eine anhaltende und überschießende Entzündung verhindern kann.

In einem Mausmodell einer asthmaähnlichen Immunreaktion bilden IL-10 Knockoutmäuse mehr IFN-γ und IL-12, aber weniger IL-5 als die Wildtyp-Mäuse und entwickeln eine geringere Entzündung in den Atemwegen [171]. In einem anderen Modellversuch wurde dagegen eine erhöhte Produktion von IL-4, IL-5 und IFN-γ und eine erhöhte Sterblichkeit bei den IL-10 Knockout-Mäusen beobachtet [62]. Die Bedeutung von IL-10 bei atopischen Erkrankungen des Menschen ist bislang nicht ausreichend geklärt. Verschiedene Arbeitsgruppen beobachteten bei atopischer Dermatitis eine normale [144] oder gesteigerte [116] IL-10 Produktion. Für das Asthma bronchiale wurden widersprüchliche wohl auch je nach Schweregrad differierende, teilweise erhöhte [134], unveränderte [151] und erniedrigte [17] IL-10 Werte beschrieben.

1.4.4 Interleukin 12

Interleukin 12 (IL-12) ist ein Heterodimer der aus zwei kovalent gebundenen Polypeptidketten besteht, von denen eine 197 Aminosäuren (p35) und die andere 306 Aminosäuren (p40) lang ist. Die p35-Untereinheit wird von vielen verschiedenen Zelltypen, z. B. T- und B-Lymphozyten, von NK-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen produziert. Die p40-Kette wird hauptsächlich durch aktivierte Monozyten und B-Zellen gebildet, so dass diese die wichtigste Quelle des kompletten Zytokins darstellen.

Die Hauptwirkung von IL-12 bezieht sich auf die Stimulation von NK-Zellen und ist damit ein wichtiger Regulator der zellvermittelten Immunantwort. Dazu indu-

ziert er synergistisch die Transkription von IFN-γ und IL-2 und verstärkt die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen. Zusammen mit IFN-γ stimuliert er die Differenzierung von naiven $CD4^+$T-Zellen zum TH-1-Subset.
Letztlich stimuliert IL-12 die Differenzierung der $CD8^+$ T-Zellen in reife und funktionell aktive zytotoxische T-Lymphozyten [110].
Diese Interleukin begünstigt somit die TH-1-Immunantwort.

1.4.5 Tumornekrosefaktor-α

Der Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) ist ein Trimer mit je 157 Aminosäuren. Er ist ein bedeutender Faktor der Wirtsabwehr gegen gramnegative Bakterien [64]. Die aktive Komponente der gramnegativen Bakterien sind die Lipopolysaccharide (LPS), die aus der bakteriellen Zellwand stammen.
TNF-α wurde ursprünglich als Mediator entdeckt, der zur Tumornekrose führt, und der im Serum von Tieren, die mir LPS behandelt wurden, anzutreffen ist [66]. Bei niedrigen Konzentrationen stimuliert LPS die Funktion der mononukleären Phagozyten und wirkt (nur bei der Maus) als polyklonaler Aktivator der B-Zellen. Beides Antworten, die zur Elimination eindringender Bakterien führen.
Hohe Konzentrationen von LPS führen zur Gewebsschädigung, zu einer breiten, intravaskulären Koagulation und zum Schock, der oft im Tod endet. Man weiß, dass TNF-α einer der hauptsächlichsten Mediatoren dieser Wirkung ist [67, 70, 162].
Die wichtigsten Produzenten von TNF-α sind die LPS-aktivierten mononukleären Phagozyten, obwohl auch antigenstimulierte T-Zellen, aktivierte NK-Zellen und aktivierte Mastzellen dieses Protein sezernieren können. IFN-γ erhöht die TNF-α Synthese von LPS-stimulierten mononukleären Phagozyten.
Dies bedeutet dass TNF-α sowohl ein Mediator der natürlichen als auch der erworbenen Immunität ist und eine wichtige Verbindung zwischen der Immunantwort und der akuten Entzündung darstellt. Bei der vom mononukleären Phagozyten sezernierten TNF-α Form handelt es sich um ein 51 kD schweres Homotrimer. Durch seine pyramidale Form kann es gleichzeitig an mehreren Rezeptoren binden [110]

Man findet TNF-Rezeptoren auf fast allen Zelltypen, die bis heute untersucht wurden. Die biologische Wirkung von TNF-α und LPS kann man am besten als Funktion ihrer Konzentration verstehen.

1.5 Hypothese

Diese Arbeit hat zum Ziel mögliche Zusammenhänge zwischen der mütterlichen Exposition im bäuerlichen Umfeld während der Schwangerschaft und Zytokinproduktionskapazitäten im Nabelschnurblut Neugeborener zu untersuchen, welche als Hinweise auf die Entwicklung von allergischen Erkrankungen zu späterer Lebenszeit dienen sollen.

Es wird vermutet, dass eine vermehrte Exposition der Mutter gegenüber dem bauernhofspezifischen Umfeld eine verminderte Allergieanfälligkeit, und damit verbunden ein spezifisches Zytokinmuster im Nabelschnurblut des Nachwuchses fördert.

Zur Prüfung dieser These wird eine Kohorte Neugeborener aus dem bäuerlichen sowie eine Kohorte Neugeborener aus dem nichtbäuerlichen Umfeld bezüglich der Zytokinproduktionskapazität von Nabelschnurblutzellen betrachtet und miteinander verglichen.

In einer Untergruppenanalyse soll am Beispiel der finnischen Kohorte überprüft werden, ob länderspezifische Effekte, die z.B. auf dem Vorhandensein von landestypischen bäuerlichen Expositionen oder besonderen Umweltfaktoren, zu veränderten Effekten im Vergleich zur Gesamtpopulation führen.

Die Ergebnisse sollen zur Prüfung bisheriger Arbeiten auf diesem Feld dienen und zusätzliche Erkenntnisse sammeln, welche zu einer verbesserten Prävention von allergischen Erkrankungen beitragen sollen.

Aus der oben formulierten Hypothese lassen sich die folgenden Forschungsfragen ableiten:

1.6 Fragestellungen

- Lassen sich signifikante Unterschiede im Muster, der Zytokine IL-5, IL-10, IL-12, TNF-α und IFN-γ im induzierten Nabelschnurblut neugeborener Kinder aus dem bäuerlichen bzw. nichtbäuerlichen Umfeld nachweisen?

- Sind Zusammenhänge zwischen der mütterlichen Exposition während der Schwangerschaft gegenüber bauernhoftypischen Situationen und den induzierten Zytokinkonzentrationen im Nabelschnurblut nachweisbar?

- Sind, im Bezug auf einzelne Variablen, Unterschiede zwischen der Gesamtpopulation und der finnischen Studienpopulation nachweisbar?

- Lassen sich Faktoren identifizieren, die diese Zusammenhänge und Unterschiede begründen?

2. Material und Methoden

2.1 Materialübersicht (siehe Punkt 7)

2.2 Studiendesign

Die PASTURE Studie ist als eine Geburtskohortenstudie angelegt. Die Teilnehmer wurden in ländlichen Gebieten von insgesamt fünf europäischen Ländern rekrutiert. Dazu zählten Deutschland (insbesondere Oberbayern), die östliche Schweiz, Österreich (insbesondere die Gegend um Salzburg), Zentralfinnland (insbesondere die Gegend um Kuopio) und Frankreich (insbesondere die Gegend um Besancon).

Zu Beginn wurden in diesen fünf Gebieten gesunde schwangere Frauen im dritten Trimenon aus dem bäuerlichen und dem nichtbäuerlichen Umfeld im Zeitraum von August 2002 und März 2005 für die Studie gewonnen. Dazu wurden Krankenhäuser kontaktiert, Krankenversicherungen befragt, Schwangerschaftsvorbereitungskurse besucht und Werbung im lokalen Rundfunk geschaltet. Das bäuerliche Umfeld wurde durch Ein- und Ausschlusskriterien klar definiert. Dazu gehörten die Fütterung von Tieren, das „Ausmisten“ von Stallungen, das Melken von Kühen oder das Einsammeln von Eiern in Hühnerställen. Aber auch der Abstand zur nächsten größeren Stadt (über 30.000 Einwohner) oder die industriellen Anlagen in den Wohnorten wurden in die Auswahl miteinbezogen.

Insgesamt wurden 1133 Familien in die Studie aufgenommen (Deutschland: 254, Schweiz: 242, Österreich: 220, Finnland: 214, Frankreich: 203). Sie wurden anhand Fragebögen, welche auf der ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) Studie, der ALEX (Allergy and Endotoxin) Studie und der PARSIVAL (Prevention of Allergy – Risk factors for Sensitation in children related to farming and anthroposophic lifestyle) Studie, basierten, kontinuierlich zur Lebensweise Ihrer Kinder befragt. Dies geschah anhand von Interviews die bei zwei Hausbesuchen (während der Schwangerschaft und zwei Monate nach der Geburt) erhoben wurden, und anhand wöchentlicher Berichte, in denen unter anderem der Gesundheitszustand, die Ernährung der Kinder und die Aufenthaltsdauer im Stall erfasst wurden. Die Interviews umfassten allergi-

sche Vorerkrankungen der Eltern, und verschiedene bauernspezifische Expositionen, wie den Kontakt zu Nutztieren, die verbrachte Zeit in Heuschobern und Ställen und den Konsum von Rohmilch. Darüber hinaus wurden mehrere Störgrößen wie das Rauchen der Eltern während der Schwangerschaft oder die Familiengröße berücksichtigt.
Die Nabelschnurproben wurden direkt nach der Geburt von eingewiesenen Hebammen gewonnen und bei 4°C innerhalb von 27 Stunden in das nahe gelegene Studienzentrum gebracht. Die teilnehmenden Eltern wurden über die weitere Verwendung der Nabelschnurproben informiert und aufgeklärt. Außerdem wurden, nach einem standardisierten Protokoll, Staubproben von den mütterlichen Matratzen genommen.
Die gesamte Studie wurde in jedem Land von der zuständigen Ethikkommission genehmigt, und die Eltern über alle Vorgehensweisen aufgeklärt.

2.3 Proben

Aus den fünf Zentren wurden insgesamt 749 Nabelschnurblutproben gewonnen. Das entsprach nur etwa 69% der Gesamtpopulation war darin begründet, dass Hebamen zum Teil die Entnahme des Nabelschnurblutes vergaßen. In anderen Fällen gab es Transportprobleme oder die Blutproben erreichten ihr Ziel in einem bereits koagulierten Zustand oder waren hämolysiert.
Von den einwandfreien Blutproben stammten 147 Proben aus Deutschland, 178 aus der Schweiz, 105 aus Österreich, 195 aus Finnland und 124 aus Frankreich. 18 Proben wurden aufgrund Überschreitung der vorgeschriebenen Transportzeit (27h) von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Weitere 41 Proben mussten wegen erfolgloser Blutbildauswertung und Leukozytenstandardisierung ausgeschlossen werden. Zudem mussten die französischen Proben wegen einer überdurchschnittlich hohen Zahl an Nullwerten aus der Statistik genommen werden. Ebenfalls wurden die Messungen für IL-12 aufgrund einer hohen Anzahl von Nullwerten nicht in die statistische Analyse eingeschlossen.

2.3.1 Probenverarbeitung

Aus den an den studienteilnehmenden Instituten gewonnenen Blutproben, wurden vor Ort jeweils 8 Kulturen angelegt. Dabei wurde das heparinisierte Blut im Verhältnis 1:8 mit RPMI Zellkulturmedium mit Antibiotika, Anitmykotika (beides von Gibco, Karlsruhe) und 10% FCS-Lösung (PAA, Cölbe) versetzt.

Mit einem Milliliter gelösten Blutzellen pro Proband wurde je eine Stimulation mit Medium, PMA (5ng/ml) und Ionomycin (1 µg/ml; beides von Sigma, Deisenhofen), LPS (0,1 µg/ml; freundlicherweise von den Herren Prof. Holst und Prof. Brade, Borstel bereitgestellt) und SEB (0,1 µg/ml; Sigma, Deisenhofen) durchgeführt und diese 24 Stunden bzw. 48 Stunden bei 5% CO_2 bei 37°C inkubiert.

Im Anschluss wurden die Proben zentrifugiert und die gewonnen Überstände bei -80° Celsius tiefgefroren.

Zur Messung der Zytokinkonzentration wurden die Kulturüberstände an das Biomedizinische Forschungszentrum des Instituts für Klinische Chemie und Molekularer Diagnostik der Philipps-Universität Marburg weitergeleitet.

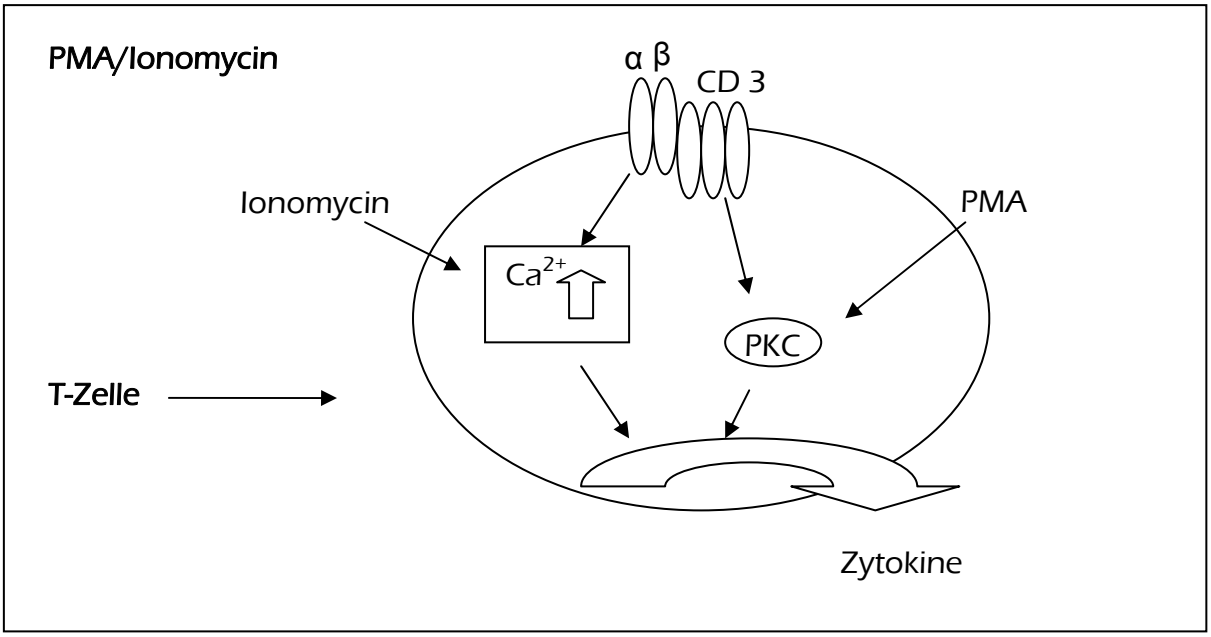

Abbildung 3: Schaubild Stimulation einer Nabelschnurblutzelle mit PMA/ Ionomycin(frei nach [110])

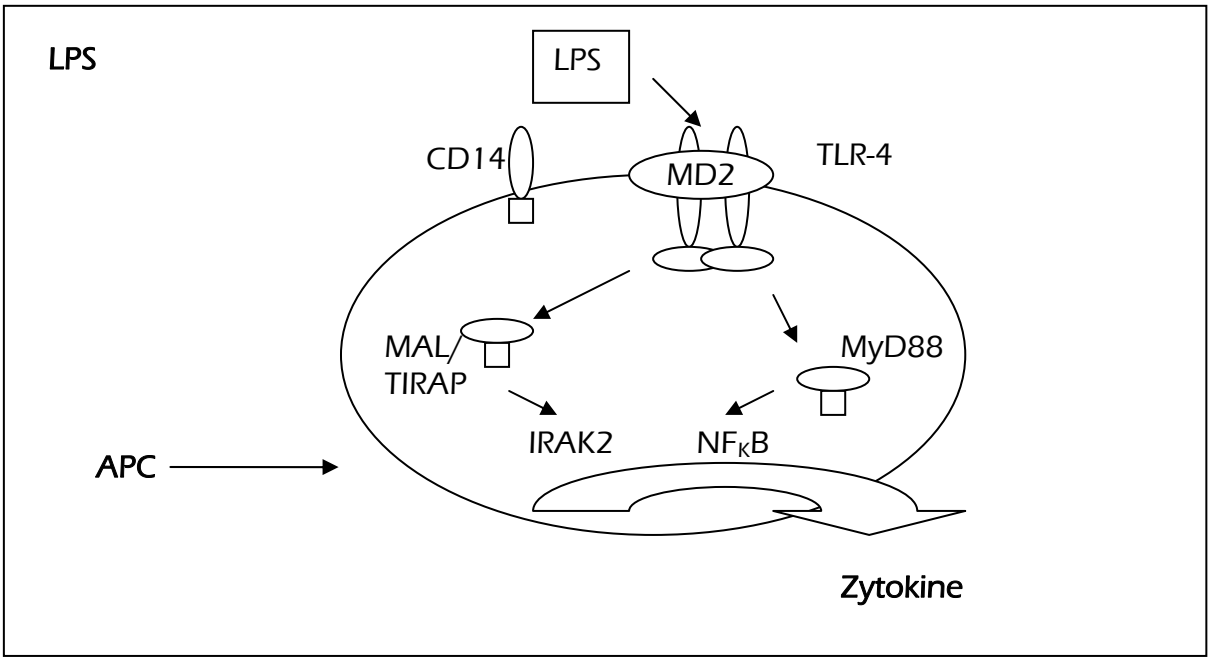

Abbildung 4: Schaubild Stimulation einer Nabelschnurblutzelle mit LPS (frei nach [110])

Um die Möglichkeit eventueller Nachmessungen zu haben, wurden die in den studienteilnehmenden Instituten gewonnen Kulturüberstände, in zwei Portionen zu je 300µl aliquotiert.

2.3.2 Einfrieren und Auftauen der Kulturüberstände

Da es beim Einfrieren und Auftauen von Kulturüberständen in Abhängigkeit von der Verarbeitungsdauer erfahrungsgemäß zu einem Verlust an Zytokinen kommt, wurde hierbei auf zügiges Arbeiten geachtet. Alle Schritte erfolgten auf Eis in einer Styropor- Kiste.

Von den isolierten CBMC-Überständen wurden jeweils zwei Aliquots zu je 300µl unverdünnt bei -70°C in beschrifteten Sortierkartons eingefroren.

Das Auftauen der Seren erfolgte bei 4°C im Kühlschrank über Nacht (13h).

2.3.3 Probenanalyse mittels Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay–Methode (ELISA)

Die Messungen der Zytokinkonzentrationen in den Kulturüberständen wurden mit kommerziell erhältlichen ELISA OptEIA™-Kits für humanes IL-5 (Indikator für TH-2 Immunität), IL-10 (Indikator für T-regulatorische Aktivität), IL-12 (Förderung der TH-1 Effektorzellentwicklung), IFN-γ (Indikator für TH-1 Immunität) und TNF-α (unspezifischer Entzündungsmarker) nach Anleitung des Herstellers (BD Biosciences, San Diego, Kalifornien USA) durchgeführt.
Zur Vorbeschichtung der 384-Well-Mikrotiterplatten (Nunc GmbH Deutschland, Wiesbaden) wurden 50 µl des im jeweiligen Kit enthaltenen zytokinspezifischen Fangantikörpers (Capture-Antibody) pro Kavität eingesetzt. Nachfolgend mussten die Platten für 15 Stunden bei 4°C im Kühlschrank inkubiert werden.
Dann wurden die Kavitäten der Platte dreimalig mit Waschpuffer (PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) + 0,1% Tween 20 (Sigma Biochemica, Deisenhofen)) ausgespült und im Anschluss auf saugfähigem Mehrzweckpapier ausgeschlagen. Dieser Vorgang war nach jedem der Waschschritte zu wiederholen.
Das Abblocken der überschüssigen Fangantikörper wurde mit 100 µl PBS + 10% FCS (endotoxinfreies Fetal Calf Serum (FCS) Gold, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) pro Kavität durchgeführt, und eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rütteltisch (350 rpm) inkubiert.
Nach dreimaligem Auswaschen der Platten wurde die Verdünnungsreihe des mitgelieferten Standards sowie die Zellkulturüberstände mit 50 µl / Kavität aufgetragen und für 2 Stunden auf dem Rütteltisch (350 rpm bei Raumtemperatur) inkubiert. Zur Bestimmung der Standardkurve wurde die Standardreihe zweifach auf die Platte aufgetragen und der Mittelwert beider zur Konzentrationsbestimmung herangezogen. Als Ausgangsstandards wurden für die Zytokine IL-5, IL-10 und IL-12 500 pg/ml, für IFN-γ und TNF-α 1000 pg/ml vom Hersteller festgelegt. Diese wurde in einer Verdünnungsreihe mit PBS + 10% FCS sechsfach im Verhältnis 1:2 verdünnt. Zwei Kavitäten wurden als Bezugsleerwert (Blank) nur mit PBS + 10% FCS beschickt. Zur Bestimmung der IL-5 und IL-12-Konzentrationen wurden die Zellkulturüberstände nicht verdünnt. Für die Kon-

zentrationsbestimmung der Zytokine IL-10, IFN-γ und TNF-α wurden die Kulturüberstände 1:10 und 1:50 verdünnt gemessen

Das im Kulturüberstand enthaltene Zytokin bindet während der Inkubation proportional zu seiner Konzentration an den Fangantikörper. Durch anschließendes dreimaliges Waschen wurden unspezifisch gebundene Stoffe entfernt.

Ein biotinylierter Zweitantikörper (Detection-Antibody) wurde mit dem Enzymreagenz (Avidin-horseradish peroxidase conjugate) in PBS+ 10% FCS vermischt und die Platten mit 50 μl/ Kavität beschickt.

Es folgte eine einstündige Inkubation auf dem Rütteltisch (350 rpm bei Raumtemperatur). Danach wurde erneut durch einen Waschvorgang die Entfernung der ungebundenen Reste garantiert.

Im letzten Schritt wurde in alle Kavitäten, einschließlich des Blank, für 20 Minuten 200 μl POD Substrat (BM Blue, Roche Diagnostics Corporation, Mannheim, Deutschland) gegeben und der Ansatz im Dunkeln inkubiert. Das Substrat POD wird durch die Peroxidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 2 M Schwefelsäure (H_2SO_4) gestoppt. Die Farbintensität ist proportional zu der Zytokinkonzentration und wurde in einem ELISA-Reader bei 450 nm Referenzwellenlänge gemessen.

Im Bezug zum Standard und den Leerwerten konnte mit der Software (Magellan 5) die Zytokinkonzentration gemessen werden.

Da die Stimulation mit LPS und SEB keine signifikanten Unterschiede zwischen der Bauern- und Nicht-Bauern-Kohorte erbrachte, wurde nur die PMA/Ionomycin Stimulation für weitere statistische Auswertungen verwendet.

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte im Statistischen Institut der Universität Ulm durch Gisela Büchele, MPH, Universität Ulm, Abteilung für Epidemiologie. Die einzelnen Zytokinkonzentrationen (nach PMA/Ionomycin-Stimulation) wurden auf die Leukozytenzahl standardisiert. Um eine hinreichende Annäherung der positiven Werte an Normalverteilung zu erreichen wurde eine Log-Transformation (base 1, after adding 10) vorgenommen. Um auf Assoziation zwischen den Zytokinkonzentrationen und den demographischen Variablen, sowie den typischen Bauernhofexpositionen prüfen zu können, wurde das multivariate Tobit-Regressions- Modell (Procedure QLIM in SAS®, SAS Institute Inc., SAS OnlineDoc 9.1.3., 2006) verwendet. Die Anwendung des Tobit Modells ist sinnvoll für kontinuierliche Variablen mit vielen unter Abrissgrenze liegenden („left censored“) zensierten Werten und ist ein geeignetes Verfahren diese Werte bei der Kalkulation adäquat zu berücksichtigen. Im Bezug auf die vorausgesetzte Einflussnahme auf die Werte unterhalb der Nachweisgrenze, wendet dieses Modell eine lineare Regression auf eine latent abhängige Variable an, indem die maximale Wahrscheinlichkeit geschätzt wird. Die Auswertung der demographischen Daten erfolgte für bivariate Verteilungen mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests.

Für multivariate Verteilungen wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Die Zytokinkonzentrationen im Nabelschnurblut wurden durch eine Bivariatanalyse mit verschiedenen Expositionsvariablen (Bauernstatus, Aufenthalt der Mutter im Stall während der Schwangerschaft, Aufenthalt der Mutter in Heuschobern während der Schwangerschaft, Kontakt der Mutter zu Stalltieren während der Schwangerschaft und Konsum der Mutter von Rohmilch während der Schwangerschaft) assoziiert. Signifikante Assoziationen wurden mit Hilfe des Trend-Tests Two-sided Wilcoxon-Test bestimmt. Die "Geometric Means Ratio (GMR)“ mit einem Konfidenzintervall von 95% wurde berechnet durch Exponentierung der Koeffizienten und der Grenzen des Konfidenzintervalls. Alle angewendeten Modelle wurden für Studienzentrum und Bauernstatus adjustiert und, wenn notwendig, auch für Geschlecht, mütterliches Rauchen, elterlicher Ausbildungsgrad, Anzahl der älteren Geschwister, mütterliches Alter, mütterliche Asthma-, Heuschnup-

fen- und Neurodermitisanamnese. Die untersuchten Analysen werden als signifikant betrachtet bei einem p-Wert von 0,05 oder kleiner, p-Werte kleiner als 0,0001 zeigen hochsignifikante Assoziationen an. Ab einem p-Wert von 0,1 liegt eine Borderline-Signifikanz vor. Diese darf nicht als Signifikanz im klassischen Sinne, sondern als Hinweis auf mögliche Zusammenhänge und Motivation für weiterführende Studien mit höheren Fallzahlen gesehen werden.

Die Berechnungen für das Studienland Finnland wurden als bivariate Analyse durchgeführt. Hier lässt sich kritisieren, dass die Vergleichbarkeit mit den Daten der Gesamtpopulation, die mit dem Tobbit Regressionsmodell gerechnet wurden, abnimmt. Da die bivariate Analyse allerdings adjustiert durchgeführt wurde ist dieser Einflussfaktor etwas gemindert. Alle statistischen Berechnungen wurden durchgeführt mit SAS 9.1.3 (SAS Institute Inc, Cary, NC).

3. Ergebnisse

3.1 Studienpopulation

Insgesamt wurden für die PASTURE-Studie 1133 Familien rekrutiert. Davon kamen 220 aus Österreich 214 aus Finnland, 203 aus Frankreich, 254 aus Deutschland und 242 aus der Schweiz. Im Verlauf der Schwangerschaft und Geburt der Kinder schieden mehrere Familien im Rahmen der Ausschlusskriterien aus. Dazu gehörten eine verkürzte Schwangerschaftsdauer, schwere Chromosomenaberrationen, fehlerhafte oder vergessene Nabelschnurblutgewinnung, und mangelhafte Beantwortung der Fragebögen. Die französischen Familien wurden aus messtechnischen Gründen von der statistischen Auswertung ausgeschlossen.
Dies führte zu einer auswertbaren Population von 625 Familien. Davon wurden 299 Familien (47,8%) der Bauerngruppe und 326 Familien (52,2%) der Kontrollgruppe zugeteilt. Die Aufteilung der Familien nach Studienländern zeigt folgende Tabelle.

Land	**Kontrollen**		**Bauern**		**Total**
	N	%	n	%	n
Österreich (A)	57	54,29%	48	45,71%	105
Schweiz (C)	96	53,93%	82	46,07%	178
Deutschland (G)	81	55,10%	66	44,90%	147
Finnland (S)	92	47,18%	103	52,82%	195
Total	**326**	**52,16%**	**299**	**47,84%**	**625**

Tabelle 1: Gesamtübersicht Studienpopulation nach Ländern

Die geographische Verteilung der Studienländer wird durch die folgende Abbildung 6 dargestellt.

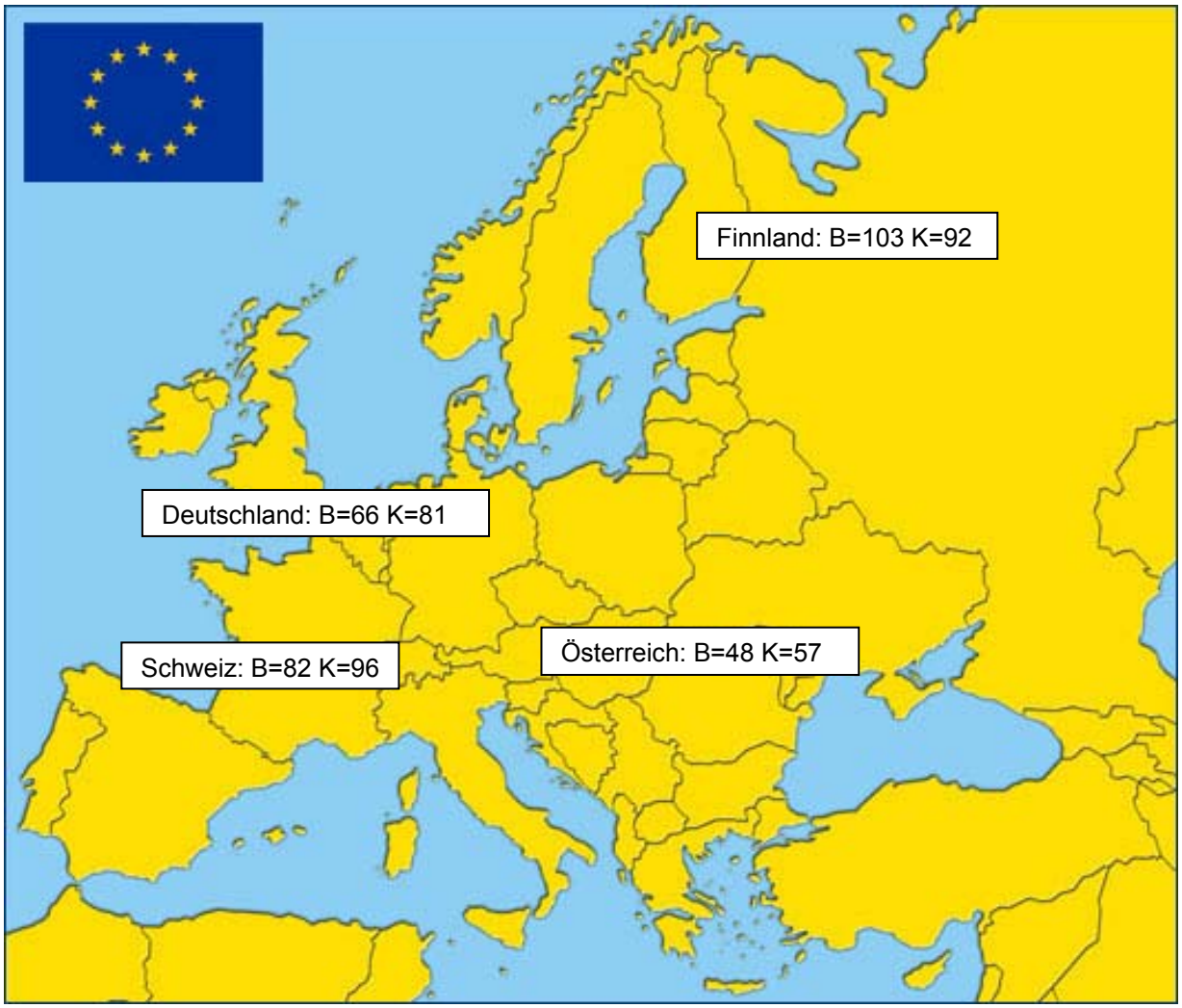

Abbildung 5: Gesamtübersicht Studienpopulation nach Ländern (B :Bauernkohorte, K: Kontrollkohorte)

3.2 Prävalenz und Verteilung der Zytokine

Die aussagekräftigsten Messergebnisse ließen sich nach Stimulation der Nabelschnurblutproben mit PMA + Ionomycin nach 48h Inkubation erzielen. Alle weiteren Stimulationen wurden aufgrund mangelnder Assoziationen von der statistischen Auswertung ausgenommen.

Nachfolgende Graphik veranschaulicht den prozentualen Anteil der Proben, in dem Zytokinkonzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze detektiert werden konnten. Dabei ergaben sich für alle Studienzentren ähnliche Ergebnisse:

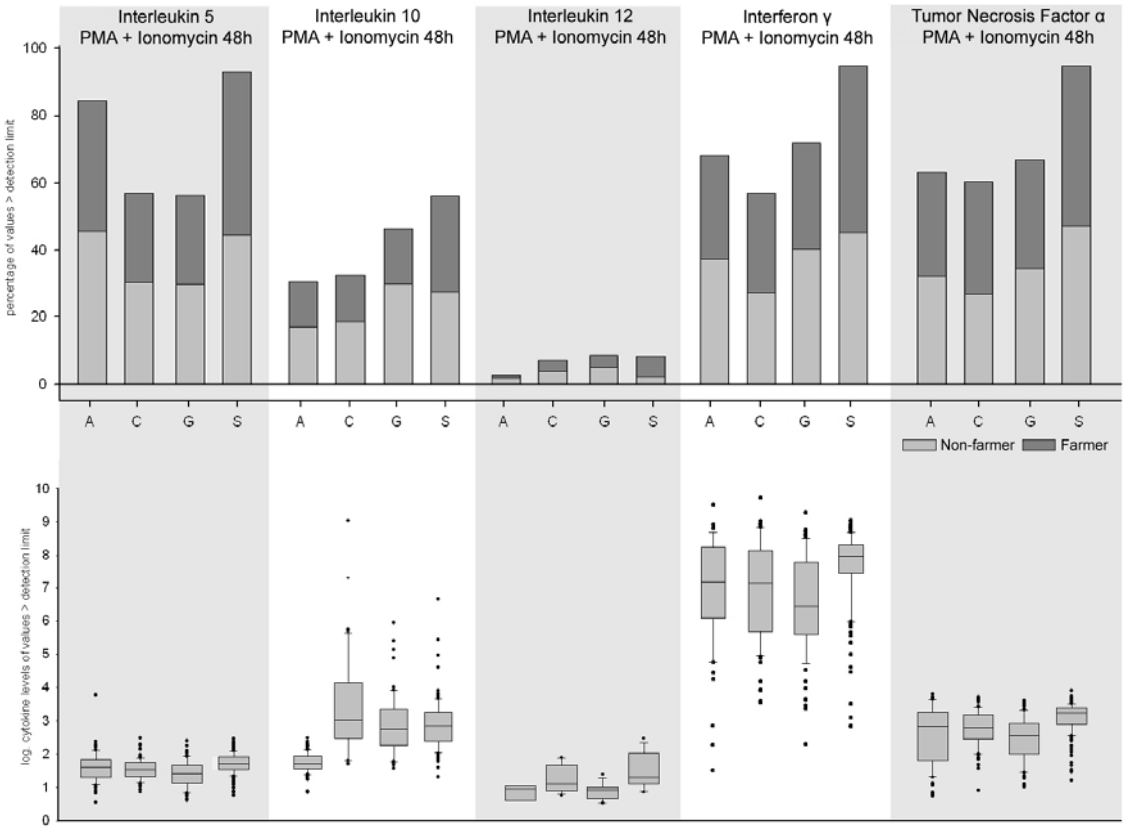

Abbildung 6: Prävalenz und Verteilung der Zytokine

Obere Graphik: *Verteilung der Zytokinkonzentrationen nach PMA + Ionomycin-Stimulation des Nabelschnurblutes nach 48 Stunden Inkubation; Bauern (schwarzer Balkenabschnitt); Nicht-Bauern (grauer Balkenabschnitt); Gesamthöhe der Balken: Prozentsatz der Proben über der Nachweisgrenze*

A: Österreich; C: Schweiz; G: Deutschland; S: Finnland

Untere Graphik: *Boxplots der Messergebnisse*

IL-5 ließ sich im überwiegenden Teil der Proben nachweisen (55%-90%). Die Abweichung der Einzelproben vom Medianwert, wie im Boxplot erkenntlich, ist äußerst gering. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Bauern- und der Nicht-Bauernpopulation ist nicht erkennbar.

Verglichen damit war IL-10 in deutlich weniger Proben nachweisbar (30% (Österreich)-55% (Finnland)) Die Validität der IL-10-Messung fällt deutlich geringer aus, wie in der Boxplot-Darstellung an einem vergrößerten Interquartilsabstand zu erkennen ist. Die Verteilung zwischen Bauern und Nicht-Bauern ist nahezu ausgewogen. Lediglich bei den deutschen Proben fällt ein Übergewicht der messbaren IL-10-Konzentrationen bei den Nicht-Bauern auf.

IL-12 war nur in einem geringen Anteil der Proben nachweisbar (3% (Österreich)- 5% (Finnland)), wobei die Streuung der Messwerte sehr gering ausfällt. Der Anteil der detektierbaren Proben ist unter den Studienpopulationen ungleich verteilt. Während bei den österreichischen Proben die Nicht-Bauernproben überwiegen, liegen bei den finnischen Proben deutlich mehr Bauernproben über der Nachweisgrenze. Aufgrund der geringen Anzahl von Messwerten über der Nachweisgrenze wurde das Zytokin IL-12 von der statistischen Auswertung ausgeschlossen.

IFN-γ war in einem äußerst hohen Prozentsatz der Proben nachweisbar (60% (Schweiz)-98% (Finnland)). Die Messwerte zeigen eine sehr ausgeprägte Streuung um den Median. Die Verteilungen unter den Bauern und den Nicht-Bauern ist ausgeglichen.

TNF-α konnte in beiden Populationen gleich häufig nachgewiesen werden (60% (Österreich)-97% (Finnland)). Die Validität der Messungen ist gut, was sich in der Boxplot-Darstellung erkennen lässt.

Insgesamt zeichnen sich die Messergebnisse studienzentrenübergreifend durch ähnliche Mediane sowie, mit Ausnahme von IFN-γ, durch eine geringe Streubreite aus.

3.3 Unterschiede zwischen der Bauernkohorte und der Kontrollgruppe bei der Zytokinkonzentration

Bei dem Vergleich der beiden Kohorten bezüglich ihrer Unterschiede bei den Zytokinkonzentrationen fallen folgende Ergebnisse auf. Zunächst zeigt sich, dass sich, über alle Zytokine gesehen, die „fehlenden Werte“ um die Zehnprozentmarke bewegen. Die Anzahl an Proben unter der Nachweisgrenze waren besonders bei den Zytokinen IL-10 und Il-12 erhöht. Beim Zytokin IL-12 haben die Werte von 86,8% der Proben unter der Nachweisgrenze in der Kontrollgruppe und 84,6% in der Bauernkohorte zu einem Ausschluss des Zytokins aus der statistischen Analyse geführt.

	Kontrollen		**Bauern**		**p-Wert**
	n	%	n	%	
IFN-γ					
fehlende Werte	23	7,1	24	8,0	
unter Nachweisgrenze	87	26,7	67	22,4	
unter Median	123	37,7	90	30,1	
über Median	93	28,5	118	39,5	**0,012**
TNF-α					
fehlende Werte	42	12,9	38	12,7	
unter Nachweisgrenze	88	27,0	59	19,7	
unter Median	99	30,4	102	34,1	
über Median	97	29,8	100	33,4	**0,064**
IL-5					
fehlende Werte	10	3,1	10	3,3	
unter Nachweisgrenze	90	27,6	75	25,1	
unter Median	112	34,4	108	36,8	
über Median	114	35,0	106	34,8	0,700
IL-10					
fehlende Werte	29	8,9	33	11,0	
unter Nachweisgrenze	163	50,0	157	52,5	
unter Median	68	20,9	54	18,4	
über Median	66	20,3	55	18,1	0,380
IL-12					
fehlende Werte	23	7,1	25	8,4	
unter Nachweisgrenze	283	86,8	253	84,6	
unter Median	11	3,4	10	3,3	
über Median	9	2,8	11	3,7	0,530

Tabelle 2: Unterschiede zwischen Bauernkohorte und der Kontrollgruppe bei der Zytokinkonzentration

Besondere Unterschiede bei den nachweisbaren Zytokinen ließen sich bei den Zytokinen IFN-γ und TNF-α zeigen. Dabei wiesen beim Zytokin IFN-γ die Feten aus Bauernfamilien signifikant mehr Messwerte über Median, als die Feten aus der Kontrollgruppe auf. Eine ähnliche Tendenz wurde beim Zytokin TNF-α nachgewiesen die jedoch nur grenzsignifikant war. Alle weiteren Zytokine zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kohorten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die Zytokine IFN-γ und TNF-α ein „Bauernhofeffekt“, also eine kohortenspezifische Konzentrationserhöhung, gezeigt werden kann. Die nun folgenden Assoziationen der Zytokinkonzentrationen mit einzelnen soziodemographischen Ergebnissen und bauernhofspezifischen Gewohnheiten und Tätigkeiten werden die Bestandteile dieses Effektes tiefergehend beleuchten.

3.4 Soziodemographische Ergebnisse der Gesamtpopulation

Die folgende Tabelle zeigt die Auswertung der soziodemographischen Gesichtspunkte beider Studienkohorten.

Gesamtpopulation	Kontrollen	Bauern	p-Wert
Geschlecht von Neugeborenen (ja/nein)	170 (52,15%)	146 (49,3%)	0,3700
Schwangerschaftswoche bei Geburt (Median, Min-Max)	40 (35-43)	40 (36-43)	0,9600
Geburtsgewicht (Median, Min-Max)	3445 (1990-4850)	3550 (1900-5100)	**0,0002**
Mütterliches Alter in Jahren (Median, Min-Max)	31 (19-44)	31,2 (21-48)	0,0740
Mütterlicher BMI in kg/qm (Median, Min-Max)	22,5 (16-37)	23,6 (18-44)	**<0,0001**
Rauchen der Eltern (ja/nein)	226 (69,3%)	160 (53,5%)	**<0,0001**
Mütterliches Rauchen während der Schwangerschaft (ja/nein)	60 (18,4%)	18 (6,0%)	**<0,0001**
Niedrige Bildung der Eltern (ja/nein)	146 (44,7%)	175 (58,5%)	**0,0006**
Mutter ist erstgebärend (ja/nein)	153 (46,9%)	70 (23,4%)	**<0,0001**
Geburt durch Kaiserschnitt	56 (17,1%)	44 (14,3%)	0,3700
Atopische Vorerkrankung der Mutter (ja/nein)	162 (49,6%)	124 (41,4%)	**0,0393**
Atopische Vorerkrankung des Vaters (ja/nein)	155 (47,5%)	101 (33,7%)	**0,0002**
Rohmilchkonsum während der Schwangerschaft (ja/nein)	41 (12,5%)	221 (73,9%)	**<0,0001**
falls ja, nicht gekochte Milch (ja/nein)	33 (80,5%)	184 (83,6%)	0,6200
falls ja, nicht entrahmte Milch (ja/nein)	34 (82,9%)	183 (82,8%)	0,9800
Butterkonsum aus bäuerlicher Erzeugung während der Schwangerschaft (mindestens ein mal pro Woche) (ja/nein)	5 (1,5%)	40 (13,4%)	**<0,0001**
Joghurtkonsum aus bäuerlicher Erzeugung während der Schwangerschaft (mindestens einmal pro Woche) (ja/nein)	8 (2,5%)	37 (12,4%)	**<0,0001**
Durchschnittszeit die während der Schwangerschaft im Tierstall verbracht wurde in Stunden (Median, Min-Max)	0 (0-19,4)	11,3 (0-60,7)	**<0,0001**
Durchschnittszeit die während der Schwangerschaft im Heuspeicher verbracht wurde in Stunden (Median, Min-Max)	0 (0-19,4)	1,2 (0-42)	**<0,0001**
Kontakt zu Nutztieren (mindestens einige Male im Monat)			
Kontakt zu Kühen	64 (19,6%)	266 (88,9%)	**<0,0001**
Kontakt zu Schweinen	14 (4,2%)	63 (21,0%)	**<0,0001**
Kontakt zu Geflügel	42 (12,8%)	95 (31,7%)	**<0,0001**
Kontakt zu Schafen/Ziegen	26 (7,9%)	63 (21,0%)	**<0,0001**

Tabelle 3: Soziodemographische Faktoren und bauernhoftypische Verhaltensweise der Studienteilnehmer

Diese Tabelle ist eine Auswahl aus den 158 Punkten der ausgegeben Fragebögen, die einen besonders aussagefähigen Vergleich der beiden Populationen möglich machen. Die Teilnehmer beider Kohorten zeigen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Geschlechterverteilung. Während für das Gestationsalter (in abgeschlossenen Schwangerschaftswochen) der Neugeborenen kein signifikanter Zusammenhang zur Kohortenzugehörigkeit festzustellen ist (bedingt auch durch die Ausschlusskriterien), liegt das durchschnittliche Geburtsgewicht der Neugeborenen der Bauernkohorte hochsignifikant über dem der Kinder der Kontrollgruppe.

Die Mütter beider Kohorten unterscheiden sich nicht hinsichtlich ihres Alters, jedoch bezüglich ihres BMIs: Der durchschnittliche BMI der Bauernmütter liegt über dem der Kontrollgruppe ($p<0,0001$). Bei den Müttern der Bauernkohorte handelt es sich außerdem weniger häufig um Erstgebärende als bei den Müttern der Kontrollgruppe.

Die Bauerkohorte zeichnet sich überdies durch einen hochsignifikant niedrigeren Bildungsgrad der Eltern aus.

Elterliches Rauchen, sowie Rauchen der Mutter während der Schwangerschaft wird weniger häufig in den Bauernfamilien beobachtet ($p<0,0001$).

Studienteilnehmer der Bauernpopulation weisen seltener eine positive elterliche Asthmaanamnese auf, vor allem bezüglich der väterlichen Anamnese ergeben sich dabei hochsignifikante Unterschiede.

Mütter der Bauernkohorte nahmen während der Schwangerschaft deutlich häufiger Rohmilch zu sich als Schwangere der Kontrollgruppe (73,9% vs. 12,5%; $p<0,0001$). Diese Milch wurde in beiden Gruppen vor allem in ungekochter und nicht entrahmter Form konsumiert.

Neben der rohen Kuhmilch wird innerhalb der Bauernfamilien auch vermehrt daraus hergestellte Butter sowie Jogurt konsumiert ($p<0,0001$).

Schwangere Mütter der Bauernkohorte verbrachten durchschnittlich mehr Zeit in Tierställen und Heuschobern als Schwangere der Kontrollgruppe ($p<0,0001$), und hatten hochsignifikant häufiger Kontakt zu Vieh (Kühe, Schweine, Geflügel, Schafe und Ziegen).

Der Vergleich zeigt, dass Basisdaten wie kindliches Geschlecht, mütterliches Alter und Schwangerschaftswochen in beiden Kohorten gleich verteilt sind und somit einen Vergleich der beiden Kohorten möglich machen. In vielen weiteren Bereichen differieren die beiden Kohorten voneinander was bereits Hinweise für einen „Bauernhofeffekt“ bergen könnte.

3.5 Soziodemographische Ergebnisse im Studienland Finnland und Vergleich mit der Gesamtpopulation

Die Gesamtheit der Studienpopulation verteilt sich auf vier teilnehmende Länder. Diese sind Österreich, Schweiz, Deutschland und Finnland. Jedes Land ist in eine Kontrollgruppe und die zu untersuchende Bauerngruppe unterteilt.
Im Folgenden wird sich der Fokus auf das Studienland Finnland richten. Wie sich der oben stehenden Tabelle (Tab. 1) entnehmen lässt, besteht die zur statistischen Rechnung zugelassene Studienpopulation in Finnland aus 195 Teilnehmern, wovon 92 Personen zur Kontrollgruppe und 103 Personen zur „Bauerngruppe“ gehören. Die Soziodemographischen Daten dieser Population zeigt die folgende Tabelle.

Finnland	**Kontrollen n=92 (47,18%)**		**Bauern n=103 (52,82%)**		**p-Wert**
	n	%	n	%	
Geschlecht von Neugeborenen ja/nein	45	48,9	47	45,6	0,5873
Rauchen der Eltern ja/nein	77	83,7	77	74,7	0,1262
Mütterliches Rauchen während der S. ja/nein	19	20,6	11	10,6	**0,0541**
Hohe Bildung	58	63,0	73	70,8	0,2453
Niedrige Bildung	34	36,9	30	29,1	0,8052
Einzelkindhaushalte	21	22,8	22	21,3	
Mehrkinderhaushalte	71	77,1	81	78,6	
Mütterliche atopische Vorerkrankungen ja/nein	55	59,7	56	54,3	0,4464
Väterliche atopische Vorerkrankungen ja/nein	47	51,0	51	49,5	0,6392
Rohmilchkonsum während S. ja/nein	5	5,4	56	54,3	**<0,0001**
Kontakt zu Farmtieren währen der S. ja/nein					
Katzen	15	16,3	78	75,7	**<0,0001**
Hunde	41	44,5	60	58,2	**0,0471**
Kühe	5	5,4	89	86,4	**<0,0001**
Schafe	2	2,1	6	5,8	0,1994
Schweine	0	0	5	4,8	**0,0323**
Geflügel	2	2,1	8	7,7	0,0771
Geburt durch Kaiserschnitt	11	11,9	14	13,5	0,7574

Tabelle 4: Soziodemographische Faktoren und bauernhoftypische Verhaltensweise der Studienteilnehmer

Die Verteilung des Geschlechtes ist, wie in der Gesamtpopulation, in beiden Gruppen ausgewogen. Ebenfalls ist der Anteil der rauchenden Eltern in beiden Gruppen ähnlich hoch und lässt mit Werten zwischen 75% und 84% auf eine

sehr hohe Raucherquote schließen. Grundsätzlich hat Finnland im europäischen Vergleich mit durchschnittlich 25% [84] eine relativ geringe Raucherquote. Die Studienpopulation hebt sich damit von der finnischen Gesamtbevölkerung deutlich ab. Hier zeigt sich auch der erste Unterschied zur Gesamtstudienpopulation, welche ein signifikantes Übergewicht der Raucher in der Kontrollgruppe aufweist. Gleichzeitig sind die Prozentsätze in der Gesamtpopulation deutlich niedriger.

Die hohen Werte der finnischen Population sinken bei Befragung der schwangeren Mütter auf 21% in der Kontrollgruppe und auf 11% in der Bauerngruppe. Dieser Unterschied ist mit einem p-Wert von 0,054 quasi signifikant, und weißt auf eine höhere Belastung des Nachwuchses der Kontrollgruppe hin. Ein ähnliches Bild zeigt sich in der Gesamtpopulation. Hier ist die erhöhte Tabakrauchbelastung in der Kontrollgruppe noch deutlicher (p: <0,0001)

Das Bildungsniveau der teilnehmenden Familien war in beiden Gruppen ähnlich verteilt. Der Anteil an höher gebildeten Familien überwog in beiden Populationen. Genauso verhielt sich die Anzahl der Kinder im Haushalt. In der Kontrollgruppe überwog, wie in der Bauerngruppe der Anteil an Mehrkinderhaushalten.

In diesen Punkten weißt die Gesamtpopulation deutliche Unterschiede auf. Das Bildungsniveau ist in der Bauerngruppe der Gesamtpopulation signifikant niedriger. Die Anzahl der Mehrkinderhaushalte hingegen ist in der Kontrollgruppe deutlich niedriger.

Mehr als die Hälfte aller Mütter in beiden finnischen Gruppen hat bereits unter einer Krankheit des atopischen Formenkreises gelitten, während die väterliche Seite in beiden Gruppen nur etwa zur Hälfte atopisch vorbelastet war.

In der Gesamtpopulation konnte hingegen signifikant gezeigt werden, dass eine Mehrheit von Müttern und Vätern der Kontrollgruppe eine atopische Anamnese aufwies.

Die beiden finnischen Kohorten unterscheiden sich besonders in dem Punkt „Rohmilchkonsum während der Schwangerschaft“. In der Kontrollgruppe konsumierten nur 5,47 % der Mütter Rohmilch während der Schwangerschaft. In der Bauerngruppe hingegen konsumierten mehr als die Hälfte (54,3%) der Mütter Rohmilch während der Schwangerschaft. Dieser Unterschied ist signifikant und zeigt sich auch in gleicher Deutlichkeit in der Gesamtpopulation.

Der Kontakt zu sämtlichen bauernhoftypischen Tieren, wie Katzen, Hunde, Kühe, Schafe, Schweine und Geflügel, während der Schwangerschaft war bei Frauen aus der Bauerngruppe, erwartungsgemäß, signifikant erhöht. Das gleiche Bild bot sich in der Gesamtpopulation hochsignifikant.
Bei der Art der Geburt überwog bei beiden Gruppen deutlich die natürliche Geburtsform im Gegensatz zum Kaiserschnitt.
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Kohorten auf finnischer Ebene ähnlicher sind als in der Gesamtpopulation, was eine statistische Beschreibung eines bauernhofspezifischen Effektes schwerer gestalten dürfte. Als besondere Unterschiede stellten sich das mütterliche Rauchen, der Rohmilchkonsum und Tierkontakt heraus. Darüber hinaus fielen die hohen Raucherquoten und die hohen Werte für mütterliche Atopie bei der Bauerngruppe auf.

3.6 Assoziation von soziodemographischen Einflussgrößen und Zytokinkonzentrationen in der Gesamtpopulation

Die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen bestimmten demographischen Faktoren und den im Nabelschnurblut gemessenen Konzentrationen der Zytokine IL-5, IL-10, IFN-γ und TNF-α erfolgte nach Adjustierung nach Studienzentrum, Bauerstatus und wenn notwendig nach Geschlecht, mütterlichem Rauchen, Anzahl der Geschwister, mütterlichem Alter bei Geburt des Kindes sowie mütterlicher Asthma- und Gräserallergieanamnese. (siehe Tab 5,6,7,8)
Männliche Neugeborene beider Kohorten zeigten signifikant erhöhte TNF-α-Spiegel nach Stimulation (p=0,019). Für alle weiteren Zytokine ist kein signifikanter Zusammenhang mit dem Geschlecht zu erkennen.

Zytokin	Adjustment	GMR	KI	p-Wert
IL5	Unadj	1,05	(0,91, 1,23)	0,500
IL10	Unadj	0,97	(0,75, 1,26)	0,850
IFN-γ	Unadj	1,11	(0,82, 1,51)	0,490
TNF-α	**Unadj**	**1,40**	**(1,06, 1,85)**	**0,019**

Tabelle 5: Zytokine assoziiert mit Geschlecht des Säuglings in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h

Mütterliches Rauchen während der Schwangerschaft wirkte sich auf die IL-5-Konzentration der Kinder hochsignifikant mindernd aus. Auch die weiteren Zytokine sind tendenziell gemindert, dieses jedoch nicht signifikant. Eine positive Heuschnupfenanamnese (Gräserallergie) der Mutter hingegen, ging mit einer Konzentrationssteigerung von IL-5 einher. (p=0,0012). Alle weiteren Zytokine zeigten keine signifikanten Assoziationen.

Zytokin	Adjustment	GMR	KI	p-Wert
IL5	**Unadj**	**0,64**	**(0,51, 0,81)**	**0,00024**
IL10	Unadj	0,8	(0,54, 1,20)	0,290
IFN-γ	Unadj	0,68	(0,43, 1,08)	0,110
TNF-α	Unadj	0,74	(0,48, 1,15)	0,190

Tabelle 6: Zytokine assoziiert mit mütterlichem Rauchen während der Schwangerschaft in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h

Zytokin	Adjustment	GMR	KI	p-Wert
IL5	**Unadj**	**1,36**	**(1,11, 1,55)**	**0,001**
IL10	Unadj	0,92	(0,70, 1,23)	0,590
IFN-γ	Unadj	1,31	(0,94, 1,83)	0,110
TNF-α	Unadj	0,92	(0,67, 1,26)	0,600

Tabelle 7: Zytokine assoziiert mit mütterlicher Gräserallergie in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h

Hat das Neugeborene ältere Geschwister lassen sich signifikant erhöhte IL-10- sowie IFN-γ-Werte nachweisen. Auch das proinflammatorische Zytokin TNF-α ist tendenziell erhöht, jedoch nicht signifikant. Dies geht mit der der Annahme von Strachan [146] einher, der bereits den Zusammenhang von älteren Geschwistern und Allergieprotektion darstellen konnte.

Zytokin	Adjustment	GMR	KI	p-Wert
IL5	Unadj	0,93	(0,75, 1,15)	0,500
IL10	**Unadj**	**1,37**	**(1,02, 1,83)**	**0,035**
IFN-γ	**Unadj**	**1,60**	**(1,04, 2,46)**	**0,033**
TNF-α	Unadj	1,13	(0,82, 1,54)	0,460

Tabelle 8: Zytokine assoziiert mit dem Vorhandensein älterer Geschwister in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h

3.7 Effekt der Bauernhofexposition und des Konsums von Bauernhofprodukten auf die Zytokinkonzentrationen in der Gesamtpopulation

Die Konzentrationen der Zytokine IL-5, IL-10, IFN-γ und TNF-α wurden mit typischen Bauernhofexpositionen sowie mit dem Konsum von Bauernhofprodukten assoziiert. Dabei wurden eine Adjustierung nach Studienzentrum, Bauernstatus und wenn notwendig nach Geschlecht, mütterlichem Rauchen, Anzahl der Geschwister, mütterlichem Alter bei Geburt des Kindes sowie mütterlicher Asthma- und Heuschnupfenanamnese vorgenommen. Außerdem erfolgte für einzelne Werte eine zusätzliche gegenseitige Adjustierung (siehe Tab. 11,12,15,16).
Neugeborene der Bauernkohorte weisen signifikant höhere TNF-α und IFN-γ-Konzentrationen und niedrigere IL-5 und IL-10 Konzentrationen auf als Kinder der Kontrollgruppe. (Tab. 2) Nach Adjustierung um die o.g. Faktoren kommt es zu einer Signifikanzminderung des „Bauernhofeffekts“, was für eine effektive Auswahl der Adjustierungsfaktoren spricht.

Zytokin	Adjustment	GMR	KI	p-Wert
IL5	adj	0,99	(0,85, 1,16)	0,94
IL10	adj	0,85	(0,66, 1,10)	0,22
IFN-γ	adj	1,22	(0,90, 1,65)	0,2
TNF-α	**adj**	**1,34**	**(1,01, 1,78)**	**0,039**

Tabelle 9: : Zytokinkonzentration assoziiert mit Bauernstatus in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h

Dazu zählt der Aufenthalt der Schwangeren in Tierställen, der nach Adjustierung mit keinen signifikanten Konzentrationserhöhungen einhergeht. Dies zeigt die effektbeeinflussende Wirksamkeit der adjustierten Parameter. Hingegen zeigt der Aufenthalt in Heuschobern, der sich signifikant positiv auf die Produktionskapazität von TNF-α auswirkt, seinen Einfluss auf das proinflammatorische

Zytokin. Nach gegenseitiger Adjustierung bleibt die Assoziation von TNF-α und dem Aufenthalt im Heuschober nicht mehr signifikant bestehen, sodass von ein effektbeeinflussender Faktor an der gegenseitigen Adjustierung teilgenommen haben muss und so als Störgröße in die Assoziation eingeht.

Zytokin	Adjustierung	GMR	KI	p-Wert
IL5	adj	1,2	(0,97, 1,48)	0,096
IL10	adj	0,99	(0,69, 1,43)	0,960
IFN-γ	adj	1,28	(0,83, 1,98)	0,260
TNF-α	adj	1,41	(0,94, 2,12)	0,096

Tabelle 10: Zytokinkonzentration assoziiert mit der Häufigkeit des mütterlichen Stallaufenthaltes in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h

Zytokin	Adjustierung	GMR	KI	p-Wert
IL5	adj	1,03	(0,95, 1,12)	0,520
IL10	adj	0,91	(0,76, 1,07)	0,250
IFN-γ	adj	1,18	(1,00, 1,41)	0,056
TNF-α	**adj**	**1,19**	**(1,03, 1,38)**	**0,022**
TNF-α	gegenseitig adj	1,13	(0,98, 1,31)	0,083

Tabelle 11: Zytokinkonzentration assoziiert mit der Häufigkeit des mütterlichen Aufenthaltes im Heuschober in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h

Deutlich signifikante konzentrationssteigernde Effekte auf das Zytokin IFN-γ, sowie auf TNF-α, hatte der Kontakt der Mutter mit Nutztieren während der Schwangerschaft. Auch nach gegenseitiger Adjustierung bleiben die Effekte des Tierkontaktes signifikant.

Zytokin	Adjustierung	GMR	KI	p-Wert
IL5	adj	0,97	(0,89, 1,07)	0,580
IL10	adj	0,95	(0,81, 1,10)	0,480
IFN-γ	**adj**	**1,28**	**(1,08, 1,52)**	**0,0052**
IFN-γ	gegenseitig **adj**	**1,16**	**(1,00, 1,34)**	**0,0460**
TNF-α	**adj**	**1,29**	**(1,10, 1,51)**	**0,0021**
TNF-α	gegenseitig **adj**	**1,26**	**(1,10, 1,46)**	**0,0013**

Tabelle 12: Zytokinkonzentration assoziiert mit der Häufigkeit des mütterlichen Tierkontaktes während der Schwangerschaft in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h

Der Genuss von roher Bauernmilch während der Schwangerschaft führte zu einer signifikanten Konzentrationserhöhung von IFN-γ, jedoch nur wenn diese nicht-entrahmt konsumiert wurde.

Für den Konsum von abgekochter Bauernmilch waren keine Effekte nachweisbar.

Zytokin	Adjustierung	GMR	KI	p-Wert
IL5	adj	1,08	(0,88, 1,32)	0,460
IL10	adj	0,94	(0,67, 1,31)	0,700
IFN-γ	adj	1,24	(0,83, 1,86)	0,300
TNF-α	adj	1,01	(0,70, 1,47)	0,940

Tabelle 13: Zytokinkonzentration assoziiert mit dem Rohmilchkonsum der Mutter in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h

Zytokin	Adjustierung	GMR	KI	p-Wert
IL5	adj	1,09	(0,90, 1,31)	0,390
IL10	adj	1,23	(0,90, 1,68)	0,200
IFN-γ	**adj**	**1,45**	**(1,00, 2,1)**	**0,047**
TNF-α	adj	1,32	(0,94, 1,86)	0,110

Tabelle 14: Zytokinkonzentration assoziiert mit dem Konsum der Mutter von nicht entrahmter Milch während der Schwangerschaft in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h

Zytokin	Adjustierung	GMR	KI	p-Wert
IL5	adj	1,28	(0,94, 1,74)	0,120
IL5	gegenseitig **adj**	**1,55**	**(1,13, 2,11)**	**0,0063**
IL10	adj	0,9	(0,52, 1,56)	0,710
IFN-γ	**adj**	**4,74**	**(2,63, 8,56)**	**<0,0001**
IFN-γ	gegenseitig **adj**	**4,97**	**(2,71, 9,12)**	**<0,0001**
TNF-α	**adj**	**2,43**	**(1,39, 4,23)**	**0,0017**
TNF-α	gegenseitig **adj**	**2,49**	**(1,38, 4,50)**	**0,0025**

Tabelle 15: Zytokinkonzentration assoziiert mit dem Konsum der Mutter von Butter aus Rohmilch während der Schwangerschaft in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h

Hatte die Mutter während der Schwangerschaft aus der Bauernmilch jedoch selbst erzeugte Butter verzehrt, konnten im Nabelschnurblut der Neugeborenen erhöhte Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IFN-γ (p<0,0001) und TNF-α (p=0,0025) gemessen werden. Nach gegenseitiger Adjustierung blieben diese Effekte erhalten. Zusätzlich zeigte sich eine signifikante Konzentrationserhöhung von IL-5.

Zytokin	Adjustierung	GMR	KI	p-Wert
IL5	**adj**	**0,55**	**(0,39, 0,76)**	**0,0003**
IL5	gegenseitig **adj**	**0,49**	**(0,35, 0,68)**	**<0,0001**
IL10	**adj**	**0,53**	**(0,30, 0,96)**	**0,037**
IL10	gegenseitig **adj**	**0,51**	**(0,29, 0,91)**	**0,023**
IFN-γ	adj	0,72	(0,39, 1,35)	0,310
IFN-γ	gegenseitig **adj**	**0,44**	**(0,23, 0,82)**	**0,0094**
TNF-α	adj	0,62	(0,34, 1,13)	0,120
TNF-α	gegenseitig **adj**	**0,36**	**(0,19, 0,68)**	**0,0016**

Tabelle 16: Zytokinkonzentration assoziiert mit dem Konsum der Mutter von Joghurt aus Rohmilch während der Schwangerschaft in der Gesamtpopulation nach Stimulation mit P/I über 48h

Der Konsum von Joghurt aus hauseigener Herstellung ging mit einer signifikanten Erniedrigung der Konzentration von IL-5 und IL-10 einher, auch nach gegenseitiger Adjustierung. Für die proinflammatorischen Zytokine IFN-γ und TNF-α zeigte sich nach gegenseitiger Adjustierung ebenfalls eine signifikante Konzentrationsabnahme.

3.8 Effekt der Bauernhofexposition und des Konsums von Bauernhofprodukten auf die Zytokinkonzentration in Finnland

Dieser Abschnitt befasst sich mit den Assoziationen zwischen Zytokinkonzentrationen im Nabelschnurblut Neugeborener Kinder und Bauernhofspezifischen Variablen in der finnischen Studienpopulation. Dabei muss jeweils zwischen den farmadjustierten Werten („f_adj.“) die nur für „Farming“ adjustiert sind und den volladjustierten Werten („adj.“) unterschieden werden, die zusätzlich für Geschlecht, mütterliches Rauchen während der Schwangerschaft, Anzahl älterer Geschwister, mütterliches Alter, und mütterliche Atopie adjustiert sind. Grundsätzlich ist der Wert „f_adj.“ anzunehmen, außer er weicht vom Wert „adj.“ Um mehr als 15% ab, dann ist der Wert „adj.“ zu verwenden.

Zytokin	Adjustierung	GMR	KI	p-Wert
IL5	f_adj	0,95	(0,81; 1,11)	0,48816
IL5	adj	0,99	(0,85; 1,16)	0,94208
IL10	f_adj	1,04	(0,74; 1,46)	0,84292
IL10	adj	0,96	(0,67; 1,36)	0,79993
IFN-γ	f_adj	0,90	(0,67; 1,2)	0,46765
IFN-γ	adj	0,97	(0,73; 1,29)	0,83180
TNF-α	f_adj	0,89	(0,68; 1,16)	0,39986
TNF-α	adj	0,93	(0,71; 1,22)	0,60031

Tabelle 17: Zytokinkonzentration assoziiert mit Bauernstatus in der finnischen Kohorte nach Stimulation mit P/I über 48h

Die Tabelle 17 zeigt über alle Zytokine keine signifikanten Assoziationen mit dem Bauernstatus in Finnland. Erkennbar ist hier jedoch eine Abnahme der Signifikanz mit der Adjustierung. Die Messungen in der Gesamtpopulation ergaben allerdings für das Zytokin TNF-α eine Signifikanz in Assoziation mit dem Bauerstatus.

Die folgende Tabelle zeigt die Assoziation zwischen den gemessenen Zytokinen und dem Konsum von Rohmilch während der Schwangerschaft.

Zytokin	Adjustierung	GMR	KI	p-Wert
IL5	f_adj	1,05	(0,73; 1,52)	0,77576
IL5	adj	0,96	(0,69; 1,34)	0,81707
IL10	f_adj	0,43	(0,17; 1,07)	0,06949
IL10	adj	0,44	(0,18; 1,09)	0,07541
IFN-γ	f_adj	1,41	(0,74; 2,67)	0,29578
IFN-γ	adj	1,19	(0,65; 2,18)	0,57312
TNF-α	f_adj	1,27	(0,7; 2,28)	0,43117
TNF-α	adj	1,24	(0,69; 2,22)	0,47169

Tabelle 18: Zytokinkonzentration assoziiert mit Rohmilchkonsum während der Schwangerschaft in der finnischen Kohorte nach Stimulation mit P/I über 48h

Besonders auffällig ist in dieser Tabelle die Borderline-Signifikanz von erniedrigtem IL 10 und dem Rohmilchkonsum die sich auch durch weitere Adjustierung kaum verändert. Dieser Effekt kann in der Gesamtpopulation nicht gezeigt werden. Hier konnten erst signifikante Zusammenhänge bei der Betrachtung der nichtentrahmten Milch bei IFN-γ gefunden werden. Insgesamt ist ein Zusammenhang von Bauernmilchkonsum und erniedrigtem IL-10 eher nicht zu erwarten gewesen. Mit möglichen Gründen befasst sich die Diskussion.

Die folgende Tabelle zeigt die Assoziation zwischen dem Stallaufenthalt und den gemessenen Zytokinen.

Zytokin	Adjustierung	GMR	KI	p-Wert
IL5	f_adj	1,19	(0,92; 1,55)	0,18674
IL5	adj	1,18	(0,93; 1,5)	0,18330
IL10	f_adj	1,01	(0,58; 1,77)	0,96892
IL10	adj	1,03	(0,59; 1,79)	0,91727
IFN-γ	f_adj	1,57	(0,96; 2,56)	0,06922
IFN-γ	adj	1,59	(1,01; 2,52)	0,04611
TNF-α	f_adj	1,82	(1,19; 2,8)	0,00605
TNF-α	adj	1,74	(1,14; 2,68)	0,01097

Tabelle 19: Zytokinkonzentration assoziiert mit der Häufigkeit des mütterlichen Stallaufenthaltes in der finnischen Kohorte nach Stimulation mit P/I über 48h

Tabelle 19 weist eine deutliche Signifikanz bei der Assoziation des mütterlichen Stallaufenthaltes mit den Zytokinen TNF-α und IFN-γ auf. Diese Werte zeigen einen erhöhten Plasmaspiegel der genannten Zytokine im Nabelschnurblut der Neugeborenen und würden für eine Gewichtung des Zytokinmilieus in Richtung TH-1 Zellantwort sprechen. In der Gesamtpopulation ist dieser Zusammenhang zwar nicht zu erkennen, jedoch zeigen sich dort für TNF-α und IFN-γ deutliche Signifikanzen für den Kontakt zu Nutztieren, welcher inhaltlich der Variable Stallaufenthalt nahe steht.

Die nächste Tabelle betrachtet nun einen ähnlichen Faktor in Finnland mit übereinstimmenden Signifikanzen.

Zytokin	Adjustierung	GMR	KI	p-Wert
IL5	f_adj	0,80	(0,63; 1,02)	0,07403
IL5	adj	0,80	(0,64; 0,99)	0,04282
IL10	f_adj	1,12	(0,64; 1,96)	0,68568
IL10	adj	1,15	(0,66; 2)	0,61969
IFN-γ	f_adj	1,06	(0,65; 1,72)	0,81807
IFN-γ	adj	0,99	(0,63; 1,56)	0,97917
TNF-α	f_adj	0,80	(0,54; 1,17)	0,24688
TNF-α	adj	0,79	(0,54; 1,16)	0,23401

Tabelle 20: Zytokinkonzentration assoziiert mit der Häufigkeit des mütterlichen Aufenthaltes im Heuschober in der finnischen Kohorte nach Stimulation mit P/I über 48h

Aus dieser Tabelle lassen sich keine signifikanten Konzentrationserhöhungen für die Zytokine TNF-α und IFN-γ erkennen, jedoch ist das Zytokin IL-5 nach Adjustierung signifikant erniedrigt. Auch dieses Ergebnis legt den Schluss einer in Richtung TH-1 verschobenen Immunantwort im Nabelschnurblut des Neugeborenen nahe. In der Gesamtpopulation ist hingegen die Konzentration von TNF-α signifikant erhöht, was die Ergebnisse der Studienpopulation unterstützt, und ebenfalls für ein TH-1 gewichtetes Zytokinmilieu spricht.

Die letzte Tabelle spiegelt ein ähnliches Bild wider. Sie demonstriert die Assoziation der Zytokine mit der Häufigkeit des mütterlichen Tierkontaktes während der Schwangerschaft.

Zytokin	Adjustierung	GMR	KI	p-Wert
IL5	f_adj	0,97	(0,82, 1,15)	0,75031
IL5	adj	1,01	(0,85, 1,19)	0,92868
IL10	f_adj	0,71	(0,49, 1,04)	0,07709
IL10	adj	0,65	(0,44, 0,98)	0,03775
IFN-γ	f_adj	1,01	(0,74, 1,39)	0,94886
IFN-γ	adj	1,26	(0,92, 1,73)	0,15423
TNF-α	f_adj	1,32	(0,98, 1,76)	0,06544
TNF-α	adj	1,30	(0,96, 1,74)	0,08491

Tabelle 21: Zytokinkonzentration assoziiert mit der Häufigkeit des mütterlichen Tierkontaktes während der Schwangerschaft in der finnischen Kohorte nach Stimulation mit P/I über 48h

Hier zeigt sich für das Zytokin TNF-α eine grenzwertig signifikante Erhöhung der Konzentration, während sich für das Zytokin IL-10 eine signifikante Erniedrigung der Konzentration zeigt. Diese Variable zeigt in der Gesamtpopulation ebenfalls signifikant erhöhtes TNF-α. Darüber hinaus eine signifikante Erhöhung von IFN-γ, jedoch keine signifikante Assoziation für IL-10. Die Ergebnisse für TNF-α und IFN-γ gehen konform mit den bereits gezeigten Assoziationen der oberen Tabellen. Der signifikant erniedrigte IL-10 Wert wird in der folgenden Diskussion näher behandelt.

Abschließend kann man feststellen, dass die Assoziationen mit einzelnen bauernhofspezifischen Variablen deutliche Hinweise auf ein Übergewicht von TH-1 spezifischen Zytokinen gegeben haben, und damit Hinweise auf einen protektiven Effekt, des Bauerhofumfeldes liefern.

4. Diskussion

Die Untersuchung von Nabelschnurblutproben im Rahmen der PASTURE-Studie hat die Möglichkeit geschaffen, Zusammenhänge zwischen der Expression einzelner Zytokine im Neugeborenenblut und dem Lebensstil der Mutter während der Schwangerschaft zu erkennen. Die untersuchten Zytokine IL-5, Il-10, Il-12, TNF-α und IFN-γ, stehen dabei repräsentativ für die TH-1 Prägung, TH-2 Prägung, regulatorische, entzündungsfördernde sowie auch antientzündliche Prozesse.
Das Zytokin Il-12 wurde aufgrund einer hohen Anzahl von Werten unterhalb der Nachweisgrenze (siehe Tab. 2) nicht in die statistische Analyse eingeschlossen.
Zur Induktion der Zytokinproduktion in den Nabelschnurblutzellen, hat sich im Verlauf der Messungen PMA/Ionomycin als bestmöglichste Substanz ergeben.
Neben der Analyse der Zytokinmuster von Neugeborenen der Gesamtkohorte, möchte diese Arbeit auf die Unterschiede zwischen der finnischen Population und der Gesamtstudienpopulation eingehen.

In der Gesamtschau zeigt die Auswertung unserer Daten, dass die Entwicklung des fetalen Immunsystems deutliche Assoziationen mit der Lebensweise der Mutter während der Schwangerschaft zeigt. Damit bestätigt sie ähnliche Ergebnisse aus bereits vorangegangenen Studien [7, 133].
Bei der Analyse der Daten wurde deutlich, dass zu den wichtigsten zytokinassoziierten bauernhofspezifischen Expositionen während der Schwangerschaft der Kontakt zu verschiedensten Nutztieren und die Zeit, die im Heuschober oder in den Stallungen verbracht wurde, zu zählen sind. Diese Expositionen konnten mit einer signifikanten Steigerung der Konzentration der Zytokine IFN-γ und insbesondere TNF-α assoziiert werden. Die Zytokine IL-5 und IL-10 zeigten ebenfalls Zusammenhänge mit der bauernhofspezifischen mütterlichen Lebensweise, die jedoch zum Teil nicht wie erwartet korrelierten und die nicht an allen Studienzentren beobachtet werden konnten. Insgesamt zeigten sich damit deutliche Unterschiede zwischen der Bauern- und Nichtbauernkohorte.

Bei der Analyse möglicher Assoziation den Zytokins **IFN-γ** mit den soziodemographischen Faktoren in der Gesamtpopulation, fiel eine signifikante Assoziation zum Vorhandensein von Geschwistern auf. Dieses Ergebnis stimmt mit dem bereits von Strachan [146] gezeigten „Geschwister-Effekt“ überein, bei dem Kinder mit älteren Geschwistern deutlich niedrige Allergieraten aufwiesen. Erklärt wurde dies von Strachan mit einer höheren mikrobiellen Belastung, der die jüngeren Kinder durch die Erkrankungen ihrer älteren Geschwister ausgesetzt waren. Im Falle der Neugeborenen wäre eine mikrobielle Belastung der Mutter durch die Geschwister denkbar, die während der Schwangerschaft transplazentar auf den Feten wirkt [43, 48, 147].

Mittlerweile haben jedoch mehrere Studien gezeigt, dass der „Geschwister-Effekt“ zwar epidemiologisch eindeutig besteht [155], ursächlich jedoch nicht nur auf frühkindliche Infektionen zurückzuführen ist [34]. Wie die Studie von Benn zeigte, blieb der Geschwistereffekt trotz Adjustierung um den Faktor „Infektionen“ bestehen [10]. Die Autoren weisen auf andere wichtige Merkmale von Großfamilien, wie den Besitz von Haustieren hin. Auch Umzüge in frühem Lebensalter, eine eher unspezifische Variable, werden als protektiv beschrieben. Die Ergebnisse zeigen, dass eine vollständige Erklärung des Effektes also weiterhin aussteht [105]. Die hier gemessenen Daten bestätigten jedoch seine Existenz.

Untersucht man die IFN-γ-Konzentrationen in Bezug auf bauernhofspezifische Variablen, korreliert diese in der Gesamtpopulation signifikant mit häufigem Kontakt zu Nutztieren. Die finnische Population weist in diesem Zusammenhang zwar eine ähnliche Tendenz, jedoch keine Signifikanz auf. Vermutlich ist ein Grund dafür die niedrigere Fallzahl der finnischen Population.

In der finnischen Population fielen dagegen signifikant erhöhte Werte für IFN-γ bei längeren mütterlichen Stallbesuchen auf. Vergleicht man die Aufenthaltsdauer der finnischen Mütter während der Schwangerschaft mit den anderen Studienländern, fällt auf, dass sie sich durchschnittlich am längsten im Stall und Silageanlagen aufhielten [156]. Zudem waren in Finnland die Mütter deutlich häufiger in bäuerliche Arbeitsprozesse, unter anderem die Reinigung von Stallanlagen, während der Schwangerschaft involviert, als in allen anderen Teilnehmerländern. Dies könnten Faktoren sein, die zu signifikanten Konzentrati-

onserhöhungen in der finnischen Kohorte auch bei niedrigeren Fallzahlen geführt haben. Damit zeigt sich die hohe Bedeutung des mütterlichen Stallaufenthaltes.

Beide Komponenten, sowohl der Kontakt zu Nutztieren als auch der mütterliche Aufenthalt im Stall, assoziieren mit erhöhter Produktionskapaziät für das Zytokin IFN-γ beim Feten. Erklären ließe sich dieses Phänomen mit der erhöhten mikrobiellen Belastung durch das bäuerliche Umfeld im Rahmen der Hygienehypothese [146, 168], wie auch schon 2005 von Roponen beschrieben [135].

Nach Debarry und Kollegen kommen für diesen Effekt vor allem zwei Stallkeime [39] in Betracht. Bei der Untersuchung von Kuhstallstaub konnten sie *Acinetobacter lwoffii*, einen gramnegativen Hautkeim, der häufig auf Säugetieren gefunden wird, und *Lactococcus lactis*, einen grampositiven Keim, der vor allem mit der Gärung von Silage assoziiert ist, identifizieren. Im Mausmodell konnten durch eine intranasale Applikation der genannten Bakterien in ovalbuminsensibilisierte Tiere deutlich verringerte Raten an eosinophilen Zellen in der bronchoalveoläre Lavage nachgewiesen werden. Ein weiteres Zeichen für die Wirksamkeit der Bakterien war die Histologie des Lungenparenchyms der behandelten Tiere, welches kaum entzündlich verändert war und sich damit praktisch nicht von dem der Kontrollgruppe zu unterscheiden war.

Auch Blümer konnte im Mausmodell mit einer perinatalen Gabe des Keimes Lactobacillus rhamnosus GG (LGG) ähnliche Erfahrungen machen. Bei Nachkommen von pränatal oder perinatal LGG-applizierten Müttern waren, verglichen mit Mäusen von nichtbehandelten Müttern, allergische Entzündung der Atemwege sowie Becherzellhyperplasien deutlich reduziert. Blümer diskutiert als hauptsächlichen Grund für die Beeinflussung der Nachkommen die Übertragung von proinflammatorischen Zytokinen über die Plazenta [16].

Der Kuhstallstaub, aus dem die Bakterien gewonnen wurden, ist auch in dieser Studie von besonderer Bedeutung, da der größte Teil der Tierkontakte der Schwangeren durch die Rinderhaltung entstand. Dieses Phänomen war in allen Studienländern zu beobachten, da die Milchwirtschaft in den meisten beobachteten Höfen einen hohen Stellenwert hatte [156].

Analog zu Staub aus Kuhställen hängen auch Endotoxine gramnegativer Bakterien im Hausstaub signifikant mit erhöhter Produktionskapazität für IFN-γ zu-

sammen, wie Gereda zeigen konnte [57]. Zudem wies Gehring auf Basis der ISAAC II Daten nach, dass die Endotoxinkonzentrationen in Wohnräumen invers mit der Entstehung von Asthma bei Kindern in Verbindung steht [56].
Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass auch die von uns beobachteten erhöhten IFN-γ-Kapazitäten im Nabelschnurblut einen ursächlichen Bezug zum mikrobiellen Umfeld und der späteren Entwicklung von atopischen Krankheiten haben könnten.
Die Tatsache, dass eine erhöhte Produktionskapazität für IFN-γ auch mit einer verminderten Allergieanfälligkeit einhergeht, ist bereits in mehreren Studien festgestellt worden. Diese haben gezeigt, dass hohe IFN-γ Kapazitäten bei Geburt invers mit „Giemen“ [63] oder Atopie im ersten Lebensjahr [111] und Asthma im sechsten Lebensjahr [101] assoziiert sind. Weitere Studien zeigten, dass insbesondere Menschen, die unter atopischen Erkrankungen leiden, oder eine positive familiäre atopische Anamnese aufweisen, niedrige Level an IFN-γ zeigten [29, 121, 122, 159]. Erniedrigte IFN-γ-Spiegel, können auf eine beeinträchtigte TH-1-Antwort zurückzuführen sein. Diese kann durch eine frühe Neutralisation der TH-1 Zellen durch IL-4 [97, 125], oder von unreifen antigenpräsentierende Zellen, und somit einem Mangel an IL-12, einem Induktor der TH-1 Zellen, beeinflusst werden.
Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass durch monoklonale Nabelschnurblutzellen induzierte IFN-γ Spiegel, invers mit IgE Spiegeln im Nabelschnurblut und dem Auftreten atopischer Erkrankungen assoziiert sind [88, 120]. Dies könnte im Umkehrschluss darauf hinweisen, dass IFN-γ als Zytokin der TH-1-gewichteten Immunantwort, als ein Faktor in einem multifaktoriellen Zusammenhang, tendenziell mit geringerem Auftreten von atopischen Erkrankungen vergesellschaftet ist.

Grundsätzlich muss erwähnt werden, dass die Konzentrationen von IFN-γ und TNF-α auch durch den Geburtverlauf beeinträchtigt werden können [126]. Vorangegangene Studien zeigten, dass der vaginale Geburtsweg erheblich mehr Stress für das Neugeborene bedeutet und die IFN-γ- und TNF-α-Spiegel erhöht, als die Entbindung über einen Kaiserschnitt [21, 102]. Theoretisch könnte daher

die Geburtsform als Confounder für die Zytokinkonzentrationen im Nabelschurblut fungieren. Innerhalb der PASTURE-Kohorte konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten bezüglich der Geburtsformen bei Bauern und Nichtbauern (siehe Tab. 3 und 4) ermittelt werden, und es ist daher nicht von einer Beeinflussung unserer Ergebnisse durch diesen Faktor auszugehen.

Ein weiterer hochsignifikanter Zusammenhang besteht zwischen der Produktionskapazität von IFN-γ des Feten und dem Rohmilchkonsum der Mutter in der Gesamtpopulation. Dies jedoch nur, wenn die Milch vor dem Genuss nicht entrahmt worden ist. Dieser Effekt verstärkt sich, betrachtet man die Assoziation zwischen dem mütterlichen Konsum von aus Rohmilch hergestellter Butter und der Produktionskapazität für IFN-γ im Nabelschnurblut. Er nimmt also mit der Verdichtung der Milch zu. Für selbst hergestellten Joghurt konnte ein solcher Effekt nicht gefunden werden. Daten der PARSIVAL-Studie konnten bereits zeigen, dass der Konsum von Milchprodukten aus Bauernproduktion invers mit dem Auftreten allergischer Erkrankungen assoziiert war [160].

Interessanterweise konnte im Rahmen der PASTURE-Studie nachgewiesen werden, dass die Konzentrationen von Endotoxinen in abgepackter Industriemilch deutlich höher war, als in der unpasteurisierten Milch auf den Höfen. Erklärt wird dies, mit einem dort besonders fachmännischen Umgang mit Frischmilch. Der immunmodulatorische Effekt der Milch muss also einer weiteren Ursächlichkeit neben der mikrobiellen Belastung unterworfen sein [55].

Diskutiert werden Fettsäuremuster, die sich besonders in der naturbelassenen Rohmilch finden. Es wird angenommen, dass Milchprodukte aus alpinen Regionen, aufgrund besonderer Linolsäurekonzentrationen der dortigen Pflanzenwelt, ein weites Spektrum an ungesättigten Fettsäuren, insbesondere konjugierte Linolsäuren beinhalten [90]. Im Tiermodell konnten hier bereits Zusammenhänge zwischen in Milch enthaltenen Linolsäuren und reduzierten allergischen Atemwegsentzündungen gesehen werden [79, 83]. Gleichwohl stützen würde diese Annahme, dass in der finnischen Kohorte keine Signifikanzen bezüglich des mütterlichen Milchkonsums festgestellt wurden. Möglicherweise ist hier ein Zusammenhang mit dem nichtalpinen Futter der Milchkühe zu sehen.

Ein weiterer Aspekt ist die genetische Betrachtung des mütterlichen Milchkonsums. Besitzt das Kind einen besonderen Polymorphismus am Gen für CD14, ist der schützende Effekt des Milchkonsums deutlich erhöht. Dabei spielt höchstwahrscheinlich die milchinduzierte vermehrte Expression von CD14 eine wichtige Rolle [11].
Aus diesen Beobachtungen der Fettsäuren definitive Rückschlüsse auf die klinische Umsetzung zu ziehen, ist noch zu früh. Weitere Studien werden die Rolle der einzelnen Fettsäuremuster tiefergehend beleuchten müssen.
Abschließend fällt in der Gesamtkohorte eine signifikant niedrige Rate an atopischen Vorerkrankungen der Väter in der Bauernkohorte auf (Tab. 3). Dies geht mit einer signifikanten Erhöhung der Produktionskapazität für IFN-γ in der Bauernkohorte (Tab. 2) einher und könnte, unter der Annahme einer atopiemodulierenden Wirkung des IFN-γ, ein Hinweis für eine genetische Komponente bei der Produktionskapazität für Zytokine sein. Ein ähnlicher Effekt konnte sich mütterlicherseits nicht nachweisen lassen, da die Raten an vorbekannter Atopie in den Kohorten nahezu gleich verteilt waren.
Zusammenfassend erhärtet sich der Verdacht, dass eine erhöhte Kapazität zur Produktion von IFN-γ, als Zeichen einer TH-1-gewichteten Immunantwort, die Anfälligkeit für allergische Erkrankungen reduzieren kann.

Ein ähnliches Bild zeigt sich beim **Zytokin TNF-α**. Bei der Betrachtung der Assoziation des Zytokins mit der Variable „Tierkontakt“ findet sich in der finnischen Population ein tendenziell, jedoch nicht signifikant erhöhter Wert für das Zytokin. In der Gesamtpopulation hingegen sind signifikant erhöhte Werte für TNF-α und IFN-γ in Assoziation mit der Variable „Tierkontakt“ gemessen worden.
Für die Variable „Stallaufenthalt der Mutter“ konnte in der finnischen Kohorte eine hochsignifikante Assoziation mit der Produktionskapazität des Feten für TNF-α und IFN-γ gezeigt werden. Dieser Effekt zeigte sich in der Gesamtpopulation nicht. Hierbei spielen möglicherweise die bereits oben erwähnten häufigen Stallaufenthalte der finnischen Mütter eine wichtige Rolle.

Für die Variable „Heuschoberaufenthalt“ konnte dagegen in der Gesamtpopulation eine signifikante Erhöhung in der Kapazität für TNF-α festgestellt werden, die sich in der finnischen Population hingegen nicht nachweisen lies.
Die signifikant erhöhten TNF-α Kapazitäten können mehrere Ursachen haben. Zunächst wirkt ein erhöhter Spiegel von IFN-γ induzierend auf die TNF-α Produktion in mononukleären Phagozyten [110] (S. 370). Damit bedingen bereits die erhöhten IFN-γ Werte eine TNF-α Konzentrationserhöhung.
Des Weiteren wurden bei männlichen Säuglingen in der Gesamtpopulation signifikant erhöhte Produktionskapazitäten für TNF-α nachgewiesen. Das heißt, dass bereits die unterschiedlichen Geschlechter spezifische Zytokinmuster aufweisen. Diese wurden jedoch bei den Assoziationen der weiteren Variablen adjustiert.
Ein weiterer wichtiger Stimulus ist die bereits erwähnte erhöhte mikrobielle Belastung in der Bauernkohorte. Der durch typische Bauerhofarbeiten vermehrte Kontakt der Mutter mit gramnegativen Bakterien, und damit dem Zellwandbestandteil LPS wirkt sich immunmodulierend auf den Nachwuchs aus [58]. LPS-Kontakt der Mutter kann transplazentar eine vermehrte Induktion der TNF-α Produktion im Fetus hervorrufen. Studien zum aktiven Transport verschiedener Allergene über die Plazenta bestätigen, dass der Durchtritt dieser Allergene wie LPS in das kindliche Blutkreislaufsystem über die Plazenta möglich ist [48, 147].

Problematisch dabei anzusehen ist, dass hohe Intrauterine LPS-Konzentrationen für den intrauterinen fetalen Tod, die intrauterine Retardierung und neurologische Defizite verantwortlich gemacht werden. Als Hauptmediator für diese Fruchtschädigungen wurde im Mausmodell TNF-α identifiziert. Ning konnte jedoch zeigen, dass eine niedrig dosierte LPS Exposition der Mutter während der Schwangerschaft, einen starken Anstieg der fetalen TNF-α Werte unter LPS-Belastung, und damit eine Fruchtschädigung, verhindert [113]. Es scheint hier zu einem Gewöhnungseffekt zu kommen, der den Fetus vor übermäßiger TNF-α Produktion schützt. Da diese kontinuierliche LPS-Exposition im ländlichen Umfeld natürlicherweise gegeben ist, erhält man neben dem aller-

gieprotektiven Effekt, eine Reduktion des Risikos für die oben genannten Schwangerschaftsrisiken.
Diese Ergebnisse gewinnen vor allem vor dem Hintergrund der Beobachtungen von Macabaus et al. an Bedeutung [101]. Sie hatte bei 407 Kindern die Produktionskapazität für die Interleukine 4,5,6,10,12 und 13, IFN-γ und TNF-α im Nabelschnurblut gemessen und mit dem klinischen Auftreten allergischer Erkrankungen nach 6 Jahren verglichen. Dabei fand sie Zusammenhänge von hohen TNF-α Kapazitäten im Nabelschnurblut und verringerter Anfälligkeit für allergische Erkrankungen zum Endpunkt.
Eine finnische Studie zeigte zudem, dass bei Kindern mit Kuhmilchallergie die unstimulierte Produktionskapazität im Nabelschnurblut für TNF-α (und IFN-γ) deutlich supprimiert war [118]. In der Folge konnte beschrieben werden, dass ein Mangel an TNF-α-produzierenden Zellen in der Muttermilch signifikant häufiger bei Müttern mit an Kuhmilchallergie erkrankten Kindern auftrat [78].
Somit lassen unsere Ergebnisse im Kontext der aktuellen Literatur [177], den Schluss einer allergieprotektiven Wirkung von erhöhten Produktionskapazitäten für TNF-α im Nabelschnurblut zu.

Das **Zytokin IL-5**, als Induktor eosinophiler Granulozyten, und damit Teil der TH-2-Immunantwort, war in der Gesamtpopulation signifikant im Nabelschnurblut von Neugeborenen erhöht, deren Müttern eine Gräserallergie in der Anamnese angaben. Dieses Ergebnis deckt sich mit anderen Studien, die ebenfalls eine Erhöhung der Produktionskapazität für IL-5 beim Nachwuchs von Hochrisikopatienten feststellen konnten [124, 166].
Gleichzeitig konnten für den mütterlichen Aufenthalt im Heuschober während der Schwangerschaft in der finnischen Population signifikante Assoziationen mit einer erniedrigten IL-5-Produktion im Fetus gezeigt werden. Diese Beobachtung stimmt mit den oben genannten Studien überein, da die erniedrigten IL-5 Spiegel auf eine verminderte TH-2 Antwort hindeuten, und somit für einen TH-1 fördernden Effekt sprechen, der sich bei der Assoziation mit weitern Zytokinen und Heuschoberumgebung bereits gezeigt hat.

Besonders bemerkenswert ist, dass dieser Effekt in einem Studienland wie Finnland zu signifikanten Ergebnissen geführt hat, da dort die niedrigsten Aufenthaltszeiten in Heuschobern gemeldet wurden [156].
Ursächlich ist der Effekt wahrscheinlich auf ein mikrobielles Umfeld in den Heuschobern zurückzuführen, das eine überwiegend zelluläre Antwort fördert. Aus einer Vielzahl der dort vorkommenden Bakterien, isolierten Vogel et al. die besonders vorherrschende Art *Bacillus licheniformis* [152]. Während der Untersuchungen auf allergieprotektive Effekte des Bakteriums wurde eine Stimulation der Dendritischen Zellen (DC), durch das Bakterium, zur IL-12 Produktion beobachtet. Zudem zeigte die Invitro-Stimulation der DCs eine Erhöhung der Konzentration von IFN-γ. Diese führte zu einer Supprimierung des TH-2 Weges [14, 109]. Nach intranasaler Applikation des Bakteriums in ovalbuminsensibilisierte Mäuse zeigten sich eine reduzierte Anzahl von eosinophilen Zellen in der bronchoalveolären Lavage und eine verminderte Anzahl von schleimproduzierenden Becherzellen in der Lungenhistologie im Vergleich zur Kontrollgruppe. Darüber hinaus kommt auch Barlan in seinem Übersichtsartikel zu dem Schluss, dass Bakterien der Gattungen Bacillus und Mycobakterium eine positive immunmodulatorische Wirkung haben. Er macht jedoch weniger die T-Helferzellprägung, als die regulatorischen T-Zellen für diesen Effekt verantwortlich [8]. Auf den weiteren Einfluss regulatorischer T-Zellen wird im Rahmen des Zytokins IL-10 eingegangen.
Diese mikrobiologischen Befunde erhärten die Annahme, dass eine Reihe von stallungs- und heuschoberassoziierten Bakterien, wie auch die schon oben genannten *Actinobacter Iwoffii* und *Lactococcus lactis*, möglicherweise synergistischen und allergieprotektiven Einfluss auf das menschliche Immunsystem haben.

Weitergehend konnte in der Gesamtpopulation eine signifikante Erniedrigung der IL-5 Konzentrationen im induzierten Nabelschnurblut von Neugeborenen feststellt werden, deren Mütter während der Schwangerschaft geraucht hatten. Laut aktueller Studienlage führt mütterliches Rauchen während der Schwangerschaft zu signifikant erhöhen Raten von „kindliches Giemen“ und Asthma des Kindes [77, 101, 128]. Damit wäre eine überwiegende TH-2 Antwort im Nabel-

schnurblut zu erwarten gewesen, was zu einer vermehrten Produktionskapazität von IL-5 hätte führen müssen, wenn man eine pränatalen Beeinflussung durch Zigarettenrauch eruieren würde. Diese Beobachtung steht also im Gegensatz zu den Ausführungen des letzten Abschnitts.
Bei genauer Betrachtung der Studien fällt auf, dass diese Assoziationen zwar für „kindliches Giemen“ und Asthma feststellbar sind, nicht jedoch für atopische Erkrankungen, Rhinitis und Ekzeme. Mütterliches Rauchen scheint also die fetale Entwicklung besonders pulmonal deutlich zu beeinflussen, jedoch kein eindeutiges Bild in der von uns beobachteten Zytokinexpression zu erzeugen.
Bei Analyse der soziodemographischen Daten der finnischen Studienpopulation fällt auf, dass in beiden Kohorten deutlich mehr Eltern rauchen als in der Gesamtpopulation. Auch der prozentuale Anteil an rauchenden Frauen in der Schwangerschaft ist höher als in der Gesamtpopulation (siehe Tab.3/4). Gleichzeitig fällt eine deutlich erhöhte Atopierate der Eltern in den finnischen Kohorten auf. Möglicherweise könnte dies ein soziodemographisches Indiz für eine atopiefördernde Wirkung des Rauchens sein.

Ein weiterer deutlicher Zusammenhang in der Gesamtpopulation bietet sich bei der Betrachtung der **IL-10** Konzentration im Nabelschnurblut im Bezug auf die Anzahl der Kinder im Haushalt. Neugeborene mit älteren Geschwistern wiesen eine signifikant höhere Konzentration an IL-10 im induzierten Nabelschnurblut als Erstgeborene auf. Die erhöhten Produktionskapazitäten für IL-10 stehen im Einklang mit der derzeitigen Studienlage, denn das Zytokin, welches überwiegend von „natürlichen $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen“ (T-reg) und „induzierbaren IL-10 sezernierenden regulatorischen T-Zellen“ produziert wird, inhibiert grundsätzlich entzündliche Prozesse [169]. Davon ist sowohl die TH-1- als auch die TH-2-Antwort betroffen. Im Vordergrund steht hier jedoch die Supprimierung des TH-2-Weges [141] über die Hemmung der Mastzellen [6, 137] und von eosinophilen Granulozyten und deren Zytokinproduktion [148]. Des Weiteren findet eine Hemmung der antigenpräsentierenden Zellen statt, die sich vor allem auf die Reifung der Zellen [22], die Expression von MHC Klasse II Rezeptor und deren ko-stimulatorische Faktoren [38, 51, 107] und die Hemmung der TH-2-Zellaktivierung [62] auswirkt.

Damit können unsere Ergebnisse, zumindest in Teilen, die Auffassung bestärken, dass, wie auch schon von Akdis und Kollegen postuliert [3], hohe Kapazitäten für IL-10 im Nabelschnurblut einen schützenden Effekt vor der Gefahr, eine atopische Krankheit zu entwickeln, haben. Im Umkehrschluss zeigten neuere Studien, dass wenn die Anzahl an regulatorischen T-Zellen bei Nachwuchs von atopischen Müttern deutlich reduziert ist, damit wahrscheinlich eine ausreichende Suppression des TH-2 Weges postnatal ausbleibt [141].
In diesem Kontext gibt es bereits therapeutische Anätze, die sich den Effekt von IL-10 zu nutze machen. Dazu wird im lokal entzündeten Gewebe die IL-10 Produktion induziert. Damit konnte im Mausmodell die Hyperreagibilität der Luftwege durch Applikation von IL-10-produzierenden regulatorischen T-Zellen gemindert werden [1]. Bisher sind diese Ansätze jedoch nur im Tierversuch erprobt worden.
Doch auch die Wirkweise einer Desensibilisierungstherapie, die man schon seit Jahrzehnten am Menschen praktiziert, erklärt man sich über einen erhöhten IL-10 Spiegel bei Treg-Proliferation. Dabei wurde bisher vor allem die Desensibilisierungstherapie gegen Bienengift untersucht. Es zeigte sich, dass hohe Spiegel von IL-10, die unter der Therapie von peripheren monoklonalen Blutzellen (T-reg, B-Zellen) sezerniert wurden und für eine Anergie bei peripheren T-Zellen verantwortlich waren [2, 114].

Bei weiterer Betrachtung der Ergebnisse in der Subpopulation Finnland fällt eine Erniedrigung der Produktionskapazität des Fetus für IL-10 bei Rohmilchkonsum der Mutter und bei häufigem Tierkontakt während der Schwangerschaft auf. Diese Beobachtungen stehen zunächst im Gegensatz zu den Erkenntnissen des letzten Absatzes. Die Erniedrigung der Kapazität bei Rohmilchkonsum, wäre mit der bereits besprochenen verminderten Endotoxinbelastung der Rohmilch zu erklären [55]. Vor allem aber bei vermehrtem Tierkontakt wäre eine Proliferation von regulatorischen T-Zellen und somit eine erhöhte Produktionskapazität für IL-10 zu erwarten gewesen. Wie Caramalho in ihrer Arbeit zeigen konnte, können T-regs aufgrund ihrer „Toll-like-Rezeptoren“ (TLR) für beispielsweise LPS (TLR-4) durch die Anwesenheit dieses Bakterienwandbestandteiles proliferieren bzw. ihre Überlebenszeit verlängern [24]. Es gibt also Hin-

weise für eine Vermehrung von regulatorischen T-Zellen unter mikrobieller Belastung. Aus diesem Grund wäre auch eine Erhöhung der Produktionskapazität für IL-10 im Nabelschurblut zu erwarten gewesen.
Dass dies jedoch nicht nachweisbar war zeigt, dass die Bewertung von IL-10 Kapazitäten im Nabelschnurblut mit Vorsicht durchzuführen ist, und der prognostischem Wert der Konzentration für spätere Atopie niedriger zu gewichten ist als die bereits besprochenen Zytokine IFN-γ und TNF-α.
Das heißt jedoch nicht, dass regulatorische T-Zellen bei der Entwicklung von Allergien eine untergeordnete Rolle spielen. In vorangegangen Studien wurde die Störung der Balance von T-regulatorischer und TH-2-zellulärer Antwort als Schlüssel zum Auftreten von Atopie gesehen, und damit die Wichtigkeit der IL-10 sezernierenden regulatorischen T-Zellen hervorgehoben [81, 99, 103, 138]. Auch Wills-Karp in ihrer modifizierten Hygiene-Hypothese betont die besondere Rolle der regulatorischen T-Zellen [168].
Letztendlich scheint bei den Proben der PASTURE-Studie der Einfluss der Produktion von IL-10 durch andere Nabelschnurblutzellen (z. B. aktivierte B-Zellen, TH-2-Zellen) die erwartete Konzentrationsveränderung durch T-reg-Proliferation überlagert zu haben. Es müssen daher weitere Untersuchungen zur Quantifizierung von regulatorischen T-Zellen durchgeführt werden. Da regulatorischen T-Zellen über die Expression von „FOX P-3“ (ein spezifischer Transkriptionsfaktor [53]) eindeutig bei einer weiteren mRNA-Analyse unserer Proben identifiziert werden können, wird in Zukunft wertvolle Information zur Klärung des Einflusses regulatorischer T-Zellen zu erwarten sein.

Bei Betrachtung der finnischen und der Gesamtstudienkohorte lässt sich zusammenfassend sagen, dass sich im Hinblick auf Finnland keine generelle Aussage machen lässt, sondern jede Variable einzeln bewertet werden muss. Die Assoziationen der Zytokine mit den besonderen Eigenschaften der finnischen Kohorte, führten jedoch meistens zu erwarteten Ergebnissen. Exemplarisch anzuführen sind dabei die hohen Stallverweildauern der Mütter oder der Konsum „nichtalpiner“ Frischmilch, der mit zu erwartenden Zytokinprofilen assoziierten. Aufgrund der kleineren Grundgesamtheit in der finnischen Kohorte

konnten einzelne Sachverhalte nicht signifikant beleuchtet werden, und somit nur tendenziell bewertet werden.

Im Rahmen der PASTURE-Studie war es nicht möglich, Zytokinanalysen aus mütterlichem oder aus plazentarem Blut zu gewinnen. Daher können die fetalen Zytokinprofile nicht mit Konzentrationen im mütterlichen Blut verglichen werden, wie dies beispielsweise durch Brown et al. gezeigt wurde [20].
Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe lassen jedoch den übertragbaren Schluss zu, dass die Zytokinproduktionskapazitäten des Feten mit denen der Mutter korrelieren.
Die endgültige Bedeutung der Nabelschnurzytokinmuster für die Allergieentwicklung kann erst nach Vorliegen von klinischen Endpunkten der Studie gesehen werden, so dass sich aus den Nabelschnurproben zum jetzigen Zeitpunkt noch keine abschließenden Aussagen über eine Prädiktorfunktion für mögliche zukünftige atopische Entwicklungen treffen lassen. Es bleibt abzuwarten bis die Ergebnisse der Endpunktbefragung der Kohorte mit einem Kindesalter von sechs Jahren vorliegen.

Dennoch konnten, basierend auf Ergebnissen vorangegangener Studien, Tendenzen festgestellt werden, die signifikante Vorteile für den bäuerlichen Lebensstil mit seinen verschiedenen Komponenten zeigen könnten. Durch die Korrelation dieser Komponenten mit Zytokinkonzentrationen im Nabelschnurblut und derer pränatale Beobachtung, konnten mögliche positive Effekte zur Atopieverhütung beim Neugeborenen identifiziert werden.
In der Zukunft wird es nun Aufgabe sein diese Faktoren noch präziser zu erfassen, um daraus therapeutische Ansätze abzuleiten. Besonders der Ansatz des präventiven Eingreifens bei der Mutter ist viel versprechend, da er, wegen der in der Regel bereits bestehenden sehr rücksichtsvollen Lebensweise der Mutter während der Schwangerschaft, deutlich einfacher zu realisieren ist als Präventionsmaßnahmen die den bereits geborenen Säugling betreffen.
Zunächst denkbar wären Nahrungsmittelzusätze die attenuierten Bakterien beinhalten und somit allergieprotektiven Eigenschaften hätten. Dazu gibt es bereits vielversprechende Forschungsansätze wie die Verabreichung des probioti-

schen Keimes Lactobacillus GG (LGG), der bei Hochrisikofamilien eine hochsignifikante Verringerung von atopischer Dermatitis erzielen konnte [82]. Dazu wurden Müttern vier Wochen vor Geburtstermin entweder Placebo oder aufbereitete Lactobacillus GG Bakterien verabreicht. In der Folge wurden diese Stoffe bis sechs Monate nach der Geburt während der Stillzeit eingenommen. Die Kinder wurden anschließend nach zwei und nach vier Jahren auf atopische Erkrankungen untersucht. Dabei konnten deutliche Vorteile für die Gruppe mit Bakterieneinnahme gesehen werden.

Auch der vermehrte Genuss von Omega-3-Fettsäuren während der Schwangerschaft konnte als präventiver Effekt bezüglich allergischer Erkrankung in einer Studie nachgewiesen werden. Dabei wurde Fischöl schwangeren Frauen aus Hochrisikofamilien placebokontrolliert verabreicht. Im Ergebnis zeigten die Kinder der Interventionsgruppe im ersten Lebensjahr eine geringere Sensibilisierung gegen Ovalbumin und ausgeprägte Ekzeme traten seltener auf [15, 45, 46]. Obwohl auch hier der Wirkungsmechanismus noch nicht vollständig geklärt werden konnte, werden vor allem die Änderung der Membranzusammensetzung und der Eicosanoidmetabolismus als zentrale Punkte gesehen. In diesem Kontext wichtig bleibt auch eine weitere Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Produktionskapazitäten von Zytokinen im Nabelschnurblut, und dem mütterlichen Genuss von nichtentrahmter Milch und daraus hergestellten Produkten, während der Schwangerschaft. Die Stärke des von uns gezeigten Zusammenhangs bezüglich auf dem Bauernhof erzeugter Milchprodukte, gibt Hoffnung auf eine mögliche nutritive Lösung unserer aktuell immer noch steigenden Inzidenz allergischer Erkrankungen.
Darüber hinaus könnte das öffentliche Bewusstsein dahingehend geschärft werden, den Nachwuchs häufiger einem ländlichen Umfeld auszusetzen um die dortigen Umweltfaktoren positiv zu nutzen. Besonders Nachwuchs aus hereditär belasteten Familien könnte von längeren Aufenthalten profitieren.
In Zukunft wäre auch eine „Impfung“ mit den zwei im Moment wichtigsten „Kuhstallkeimen“ Lactococcus lactis und Acinetobacter lwoffii denkbar, um die schützenden Effekte der traditionellen Farmumgebung breit in der Bevölkerung anwenden zu können. Dazu wurden bereits Versuche im Mausmodell betrieben

[39]. Eine Anwendung auf dem Menschen bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend zeigt diese erste Kohortenstudie zur Hygienetheorie im bäuerlichen Umfeld, welche auch das pränatale Verhalten der Mutter beobachtet hat, in der ersten Phase der Nabelschnurprobenanalyse deutliche Hinweise auf mögliche prädiktive Assoziationen von Umgebungsvariablen und Konzentrationsveränderungen einzelner Zytokine.

Diese Ergebnisse ermutigen die Auswertung der folgenden Jahresproben voranzutreiben und geben Aussicht auf weitere aufschlussreiche Resultate.

5. Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten hat die Prävalenz von allergischen Erkrankungen im Kindesalter besonders in den Industrienationen deutlich zugenommen. An den zugrunde liegenden Ursachen und am Verständnis dieser Erkrankungen wird derzeit intensiv geforscht. Besondere Aufmerksamkeit gilt dabei der prä- und auch postnatalen Phase des Neugeborenen, da die Grundlagen zur Entwicklung allergischer Erkrankungen wahrscheinlich schon sehr früh geschaffen werden. Zudem wurde bereits 1989 von Strachan ein Zusammenhang zwischen hygienischen Bedingungen und Haushaltsgröße mit dem verminderten Auftreten allergischer Erkrankungen entdeckt.

Im Rahmen dieser „Hygienehypothese“ wurden in der Vergangenheit mehrere Studien durchgeführt, die zum Ziel hatten, den Effekt des bäuerlichen Lebensumfeldes auf die Inzidenz allergischer Erkrankungen dort lebender Individuen zu untersuchen. Alle bisher durchgeführten Studien wurden ausschließlich als Retrospektiv- oder Querschnittsstudie angelegt.

Die hier zugrunde liegende PASTURE-Studie (**P**rotection against **A**llergy-**STU**dy in **R**ural **E**nviroment) begleitet, als erste Kohortenstudie in diesem Forschungsbereich, Kinder einer Bauern- und einer Nichtbauernpopulation von der Schwangerschaft über die Geburt bis hin zum sechsten Lebensjahr. Das Projekt wird in fünf europäischen Ländern (D, A, F, FIN, CH) durchgeführt. Dazu wurde der Lebensstil der Mutter während der Schwangerschaft und des Kindes während der ersten sechs Jahre mit Fragebögen erfasst. Zudem wurden Blutproben aus der Nabelschnur der Kinder und im Alter von ein, vier und sechs Jahren gewonnen und untersucht.

Als Teilprojekt widmet sich diese Arbeit den Nabelschnurblutproben der Säuglinge. Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin wurden die Konzentrationen der Zytokine IL-5, IL-10, IL-12, IFN-γ und TNF-α mittels handelsüblichen Sandwich-ELISA bestimmt und mit den Lebensgewohnheiten der Mutter während der Schwangerschaft assoziiert.

Signifikante Korrelationen wurden, im Kontext der aktuellen Literatur, auf ihre Aussagekraft zur Vorhersage für spätere allergische Erkrankungen der Kinder untersucht.

Bei der Auswertung der Daten zeigten sich signifikante positive Korrelationen bei „Mehrkinderhaushalten“ mit dem Zytokin IFN-γ. „Gehäufte mütterliche Arbeit in Heuschobern“ korrelierte positiv signifikant mit dem Zytokin TNF-α und „häufiger Kontakt der Mutter zu Nutztieren“ mit den Zytokinen IFN-γ und TNF-α. Ursächlich für diese Ergebnisse wurde in erster Linie der immunmodulierende Effekt des mikrobiellen Umfeldes der Bauernhofumgebung diskutiert.

Des Weiteren zeigte der mütterliche Genuss von Rohmilch, und insbesondere daraus hergestellter Produkte wie Butter, einen starke Assoziation mit den inflammatorischen Zytokinen (IFN-γ und TNF-α) im Nabelschnurblut. Hierbei wurden immunmodulierende Fettsäuremuster in alpiner Kuhmilch als mögliche Ursache diskutiert.

Die Zytokine IFN-γ und TNF-α als charakteristischen Botenstoffe der TH-1- und zellulären Antwort wurden in vorangegangen Studien bereits häufig mit niedrigen Allergieerkrankungsraten assoziiert. Sollten sich die klinischen Ergebnisse dieser Studie bezüglich der Allergieentwicklung der Kinder im sechsten Lebensjahr mit den Assoziationen im Nabelschnurblut decken, würden sich diese Zytokine als besonders zuverlässige Prädiktoren für das Risiko, zukünftig an allergischen Erkrankungen zu leiden, darstellen.

Schwerpunktmäßig wurde auf die finnische Subpopulation eingegangen und mit der Gesamtpopulation verglichen. Dabei zeigten sich trotz niedrigerer Fallzahlen als in der Gesamtkohorte signifikante Korrelationen zwischen erhöhten Zytokinkonzentrationen der TH-1-Antwort und landestypischem Verhalten, wie dem überdurchschnittlich langen mütterlichen Stallaufenthalt. Dies kann als weiterer Beleg für die Existenz der gezeigten Zusammenhänge zwischen bäuerlichen Einflussfaktoren und induzierten Zytokinkonzentrationen gewertet werden.

Trotz dieser zahlreichen vielversprechenden Korrelationen von induzieren Zytokinkonzentrationen im Nabelschnurblut mit Variablen der traditionellen Farmumgebung, muss der klinische Endpunkt der Gesamtstudie für eine endgültige Bewertung unserer Ergebnisse abgewartet werden. Angesichts einer Vielzahl ähnlich lautender Befunde in der aktuellen Literatur ist jedoch anzunehmen, dass sich einzelne der von uns gezeigten Effekte langfristig bestätigen und Anlass zu weiteren Untersuchungen geben werden.

6. Abstract

The prevalence of allergic diseases in childhood has considerably increased over the past decades, particularly in industrialized countries. The underlying causes and mechanisms determining these disorders are currently being investigated intensively. Particular attention is given to the pre-and postnatal period of the newborn, as the basic parameters for the development of allergic diseases are probably set very early in life. Moreover, as early as 1989 Strachan discovered a correlation between hygiene and household size and a reduced incidence of allergic diseases. Based on this "hygiene theory", in the past, several studies investigated the effect of living in a rural environment on the incidence of allergic disease in individuals. All studies were carried out as retrospective or cross-sectional studies.

As the first cohort study in this field of research the underlying PASTURE study (**P**rotection against **A**llergy-**Stu**dy in **R**ural **E**nvironment) accompanies children of a farmer and a non-farmer population from pregnancy over birth up to the sixth year of life. The project is conducted in five European countries (D, A, F, FIN, CH). The lifestyle of the mother during pregnancy and of the child during his first six years is surveyed by questionnaires. In addition, blood samples of umbilical cord blood of the children at the age of one, four and six years are obtained and investigated.

As part of the PASTURE-project the following thesis deals with the cord blood samples of the infants. After stimulation with PMA/Ionomycin the concentrations of the cytokines IL-5, IL-10, IL-12, IFN-γ and TNF-α were determined, using commercially available sandwich ELISA, and correlated with the habits of the mother during pregnancy.

Significant correlations were, in the context of current literature, studied with regard to their explanatory power for the prediction of subsequent allergic diseases of the children.

The interpretation of the data showed significant positive correlations between "Households with several children” and the cytokine IFN-γ. "Frequent maternal

work in barns" positively correlated with the cytokine TNF-α and “Frequent maternal contact with farm animals” with the cytokines IFN-γ and TNF-α. As reasons for these results primarily the immunomodulatory effect of the microbial influence of farm environment has been discussed.
Also the maternal consumption of raw milk and especially of derived products such as butter showed a strong association with inflammatory cytokines (IFN-γ and TNF-α) in cord blood. As a possible cause immune-modulating fatty acid compositions in Alpine cow's milk were discussed.
In previous studies, the cytokines IFN-γ and TNF-α as characteristic messengers of the TH-1- and cellular response have often been associated with low rates of allergic diseases. If the clinical results of this study with regard to the development of allergic diseases in the sixth year of life correspond with our associations concerning the cord blood, these cytokines could be considered as a particularly reliable predictor for the risk of future allergic diseases.

This study focused on the Finnish subpopulation which was compared to the total population. Despite a lower number of cases than the total population, it showed significant correlations between elevated cytokine concentrations of the TH-1-response and country-specific behaviour, such as the above-average maternal exposure to stables. This can be interpreted as further evidence for the existence of the illustrated correlations between farming and induced cytokine concentrations.

Despite these numerous promising correlation between induced cytokine concentrations in cord blood and variables of traditional farming, the clinical outcome of the study has to be awaited for a final evaluation of our results. In the face of a multitude of similar findings in current literature, some of our illustrated effects can be assumed to prove true on a long-term basis and give rise to further investigations.

7. Literaturverzeichnis

[1] Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 2002; 8(9): 1024-32.

[2] Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998; 102(1): 98-106.

[3] Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Crameri R, Thunberg S, Deniz G, Valenta R, Fiebig H, Kegel C, Disch R, Schmidt-Weber CB, Blaser K, Akdis CA. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 2004; 199(11): 1567-75.

[4] Allanore Y, Hilliquin P, Coste J, Renoux M, Menkes CJ. Decreased prevalence of atopy in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1998; 351(9101): 497.

[5] Alm JS, Swartz J, Lilja G, Scheynius A, Pershagen G. Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle. *Lancet* 1999; 353(9163): 1485-8.

[6] Arock M, Zuany-Amorim C, Singer M, Benhamou M, Pretolani M. Interleukin-10 inhibits cytokine generation from mast cells. *Eur J Immunol* 1996; 26(1): 166-70.

[7] Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, Lai CKW, Strachan DP, Weiland SK, Williams H. 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(9537): 733-43.

[8] Barlan IB, Bahceciler N, Akdis M, Akdis CA. Role of bacillus Calmette-Guerin as an immunomodulator for the prevention and treatment of allergy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5(6): 552-7.

[9] Beasley R, Clayton T, Crane J, von Mutius E, Lai CKW, Montefort S, Stewart A. Association between paracetamol use in infancy and childhood, and risk of asthma, rhinoconjunctivitis, and eczema in children aged 6-7 years: analysis from Phase Three of the ISAAC programme. *Lancet* 2008; 372(9643): 1039-48.

[10] Benn CS, Melbye M, Wohlfahrt J, Bjorksten 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): 1223.

[11] Bieli C, Eder W, Frei R, Braun-Fahrlander C, Klimecki W, Waser M, Riedler J, von Mutius E, Scheynius A, Pershagen G, Doekes G, Lauener R, Martinez FD. A polymorphism in CD14 modifies the effect of farm milk consumption on allergic diseases and CD14 gene expression. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120(6): 1308-15.

[12] Bischoff SC, Brunner T, De Weck AL, Dahinden CA. *Interleukin 5 modifies histamine release and leukotriene generation by human basophils in response to diverse agonists.* 1990.

[13] Bjorksten B. Risk factors in early childhood for the development of atopic diseases. *Allergy* 1994; 49(6): 400-7.

[14] Blach-Olszewska Z. Innate immunity: cells, receptors, and signaling pathways. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005; 53(3): 245-53.

[15] Blumer N, Renz H. Consumption of omega3-fatty acids during perinatal life: role in immuno-modulation and allergy prevention. *J Perinat Med* 2007; 35 Suppl 1: S12-8.

[16] Blumer N, Sel S, Virna S, Patrascan CC, Zimmermann S, Herz U, Renz H, Garn H. Perinatal maternal application of Lactobacillus rhamnosus GG suppresses allergic airway inflammation in mouse offspring. *Clin Exp Allergy* 2007; 37(3): 348-57.

[17] Borish L, Aarons A, Rumbyrt J, Cvietusa P, Negri J, Wenzel S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97(6): 1288-96.

[18] Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(5): 1720-45.

[19] Braun-Fahrlander C, Gassner M, Grize L, Neu U, Sennhauser FH, Varonier HS, Vuille JC, Wuthrich B. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. *Clin Exp Allergy* 1999; 29(1): 28-34.

[20] Brown M, Gustafson M, Saldana S, Baradaran A, Miller H, Halonen M. Correlation of human decidual and cord blood mononuclear cell cytokine production. *Hum Immunol* 2004; 65(11): 1336-43.

[21] Brown MA, Rad PY, Halonen MJ. Method of birth alters interferon-gamma and interleukin-12 production by cord blood mononuclear cells. *Pediatr Allergy Immunol* 2003; 14(2): 106-11.

[22] Buelens C, Verhasselt V, De Groote D, Thielemans K, Goldman M, Willems F. Interleukin-10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor. *Eur J Immunol* 1997; 27(3): 756-62.

[23] Busse WW, Lemanske RFJ. Asthma. *N Engl J Med* 2001; 344(5): 350-62.

[24] Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopoly-saccharide. *J Exp Med* 2003; 197(4): 403-11.

[25] Celedon JC, Wright RJ, Litonjua AA, Sredl D, Ryan L, Weiss ST, Gold DR. Day care attendance in early life, maternal history of asthma, and asthma at the age of 6 years. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167(9): 1239-43.

[26] Clarke JR, Jenkins MA, Hopper JL, Carlin JB, Mayne C, Clayton DG, Dalton MF, Holst DP, Robertson CF. Evidence for genetic associations between asthma, atopy, and bronchial hyperresponsiveness: a study of 8- to 18-yr-old twins. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(6): 2188-93.

[27] Coffman RL, Seymour BW, Hudak S, Jackson J, Rennick D. Antibody to inter-leukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 1989; 245(4915): 308-10.

[28] Cohet C, Cheng S, MacDonald C, Baker M, Foliaki S, Huntington N, Douwes J, Pearce N. Infections, medication use, and the prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and eczema in childhood. *J Epidemiol Community Health* 2004; 58(10): 852-7.

[29] Contreras JP, Ly NP, Gold DR, He H, Wand M, Weiss ST, Perkins DL, Platts-Mills TAE, Finn PW. Allergen-induced cytokine production, atopic disease, IgE, and wheeze in children. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112(6): 1072-7.

[30] Cookson W. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(12): 978-88.

[31] Cooper PJ, Chico ME, Bland M, Griffin GE, Nutman TB. Allergic symptoms, atopy, and geohelminth infections in a rural area of Ecuador. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168(3): 313-7.

[32] Cooper PJ, Chico ME, Rodrigues LC, Ordonez M, Strachan D, Griffin GE, Nutman TB. Reduced risk of atopy among school-age children infected with geohelminth parasites in a rural area of the tropics. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(5): 995-1000.

[33] Corry DB, Kheradmand F. Induction and regulation of the IgE response. *Nature* 1999; 402(6760 Suppl): B18-23.

[34] Cullinan P, Harris JM, Newman Taylor AJ, Jones M, Taylor P, Dave JR, Mills P, Moffat SA, White CW, Figg JK, Moon AM, Barnes MC. Can early infection explain the sibling effect in adult atopy? *Eur Respir J* 2003; 22(6): 956-61.

[35] Daftarian PM, Kumar A, Kryworuchko M, Diaz-Mitoma F. IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 1996; 157(1): 12-20.

[36] Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, Lyons D, Hampl J, Arden B, Chien Y. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 523-44.

[37] de Marco R, Pattaro C, Locatelli F, Svanes C. Influence of early life exposures on incidence and remission of asthma throughout life. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(5): 845-52.

[38] de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, 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(4): 915-24.

[39] Debarry J, Garn H, Hanuszkiewicz A, Dickgreber N, Blumer N, von Mutius E, Bufe A, Gatermann S, Renz H, Holst O, Heine H. Acinetobacter lwoffii and Lactococcus lactis strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119(6): 1514-21.

[40] Del Prete G, De Carli 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(2): 353-60.

[41] Denburg JA. Hemopoietic progenitors and cytokines in allergic inflammation. *Allergy* 1998; 53(45 Suppl): 22-6.

[42] Douek IF, Leech NJ, Gillmor HA, Bingley PJ, Gale EA. Children with type-1 diabetes and their unaffected siblings have fewer symptoms of asthma. *Lancet* 1999; 353(9167): 1850.

[43] Douwes J, Cheng S, Travier N, Cohet C, Niesink A, McKenzie J, Cunningham C, Le Gros G, von Mutius E, Pearce N. Farm exposure in utero may protect against asthma, hay fever and eczema. *Eur Respir J* 2008; 32(3): 603-11.

[44] Douwes J, Travier N, Huang K, Cheng S, McKenzie J, Le Gros G, von Mutius E, Pearce N. Lifelong farm exposure may strongly reduce the risk of asthma in adults. *Allergy* 2007; 62(10): 1158-65.

[45] Dunstan JA, Mori TA, 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(6): 1178-84.

[46] Dunstan JA, Mori TA, Barden A, Beilin LJ, Taylor AL, Holt PG, Prescott SL. Maternal fish oil supplementation in pregnancy reduces interleukin-13 levels in cord blood of infants at high risk of atopy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33(4): 442-8.

[47] Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrlander C, Nowak D, Martinez FD. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(3): 482-8.

[48] Ege MJ, Herzum I, Buchele G, Krauss-Etschmann S, Lauener RP, Roponen M, Hyvarinen A, Vuitton DA, Riedler J, Brunekreef B, Dalphin J, Braun-Fahrlander C, Pekkanen J, Renz H, von Mutius E. Prenatal exposure to a farm environment modifies atopic sensitization at birth. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122(2): 407-12, 412.e1-4.

[49] Fageras Bottcher M, Hmani-Aifa M, Lindstrom A, Jenmalm MC, Mai X, Nilsson L,

Zdolsek HA, Bjorksten B, Soderkvist P, Vaarala O. A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(3): 561-7.

[50] Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 170(6): 2081-95.

[51] Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991; 146(10): 3444-51.

[52] Floistrup H, Swartz J, Bergstrom A, Alm JS, Scheynius A, van Hage M, Waser M, Braun-Fahrlander C, Schram-Bijkerk D, Huber M, Zutavern A, von Mutius E, Ublagger E, Riedler J, Michaels KB, Pershagen G. Allergic disease and sensitization in Steiner school children. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(1): 59-66.

[53] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4(4): 330-6.

[54] Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med* 1996; 183(1): 195-201.

[55] Gehring U, Spithoven J, Schmid S, Bitter S, Braun-Fahrlander C, Dalphin J, Hyvarinen A, Pekkanen J, Riedler J, Weiland SK, Buchele G, von Mutius E, Vuitton DA, Brunekreef B. Endotoxin levels in cow's milk samples from farming and non-farming families - the PASTURE study. *Environ Int* 2008; 34(8): 1132-6.

[56] Gehring U, Strikwold M, Schram-Bijkerk D, Weinmayr G, Genuneit J, Nagel G, Wickens K, Siebers R, Crane J, Doekes G, Di Domenicantonio R, Nilsson L, Priftanji A, Sandin A, El-Sharif N, Strachan D, van Hage M, von Mutius E, Brunekreef B. Asthma and allergic symptoms in relation to house dust endotoxin: Phase Two of the International Study on Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC II). *Clin Exp Allergy* 2008; 38(12): 1911-20.

[57] Gereda JE, Leung DY, 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): 1680-3.

[58] Gerhold K, Avagyan A, Reichert E, Blumchen K, Wahn U, Hamelmann E. Lipopolysaccharides modulate allergen-specific immune regulation in a murine model of mucosal tolerance induction. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 147(1): 25-34.

[59] Giovannangelo M, Gehring U, Nordling E, Oldenwening M, de Wind S, Bellander T, Almqvist C, Heinrich J, Hoek G, Brunekreef B. Childhood cat allergen exposure in three European countries: The AIRALLERG study. *Sci Total Environ* 2006; 369(1-3): 82-90.

[60] Giovannangelo M, Nordling E, Gehring U, Oldenwening M, Bellander T, Heinrich J, Hoek G, Brunekreef B. Variation of biocontaminant levels within and between homes--the AIRALLERG study. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2007; 17(2): 134-40.

[61] Gold DR, Burge HA, Carey V, Milton DK, Platts-Mills T, Weiss ST. Predictors of repeated wheeze in the first year of life: the relative roles of cockroach, birth weight, acute lower respiratory illness, and maternal smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(1): 227-36.

[62] Grunig G, Corry DB, Leach MW, Seymour BW, Kurup VP, Rennick DM. Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Exp Med* 1997; 185(6): 1089-99.

[63] Guerra S, Lohman IC, Halonen M, Martinez FD, Wright AL. *Reduced interferon gamma production and soluble CD14 levels in early life predict recurrent wheezing by 1 year of age.* 2004.

[64] Han J, Brown T, Beutler B. Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at the translational level. *J Exp Med* 1990; 171(2): 465-75.

[65] Hansen G, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest* 1999; 103(2): 175-83.

[66] Haranaka K, Carswell EA, Williamson BD, Prendergast JS, Satomi N, Old LJ. Purification, characterization, and antitumor activity of nonrecombinant mouse tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(11): 3949-53.

[67] Hedberg CL, Adcock K, Martin J, Loggins J, Kruger TE, Baier RJ. Tumor necrosis

factor alpha -- 308 polymorphism associated with increased sepsis mortality in ventilated very low birth weight infants. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23(5): 424-8.

[68] Heinrich J, Hoelscher B, Frye C, Meyer I, Wjst M, Wichmann HE. Trends in prevalence of atopic diseases and allergic sensitization in children in Eastern Germany. *Eur Respir J* 2002; 19(6): 1040-6.

[69] Herz U, Gerhold K, Gruber C, Braun A, Wahn U, Renz H, Paul K. BCG infection suppresses allergic sensitization and development of increased airway reactivity in an animal model. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102(5): 867-74.

[70] Hinshaw LB, Emerson TEJ, Taylor FBJ, Chang AC, Duerr M, Peer GT, Flournoy DJ, White GL, Kosanke SD, Murray CK. Lethal Staphylococcus aureus-induced shock in primates: prevention of death with anti-TNF antibody. *J Trauma* 1992; 33(4): 568-73.

[71] Hirai K, Yamaguchi M, Misaki Y, Takaishi T, Ohta K, Morita Y, Ito K, Miyamoto T. Enhancement of human basophil histamine release by interleukin 5. *J Exp Med* 1990; 172(5): 1525-8.

[72] Hoffjan S, Nicolae D, Ostrovnaya I, Roberg K, Evans M, Mirel DB, Steiner L, Walker K, Shult P, Gangnon RE, Gern JE, Martinez FD, Lemanske RF, Ober C. Gene-environment interaction effects on the development of immune responses in the 1st year of life. *Am J Hum Genet* 2005; 76(4): 696-704.

[73] Holford-Strevens V, Warren P, Wong C, Manfreda J. Serum total immunoglobulin E levels in Canadian adults. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73(4): 516-22.

[74] Holgate ST. The epidemic of allergy and asthma. *Nature* 1999; 402(6760 Suppl): B2-4.

[75] Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993; 260(5107): 547-9.

[76] Huang SW. Asthma and diabetes. *Lancet* 1999; 354(9177): 515.

[77] Jaakkola JJK, Gissler M. Maternal smoking in pregnancy, fetal development, and childhood asthma. *Am J Public Health* 2004; 94(1): 136-40.

[78] Jarvinen KM, Laine S, Suomalainen H. Defective tumour necrosis factor-alpha

production in mother's milk is related to cow's milk allergy in suckling infants. *Clin Exp Allergy* 2000; 30(5): 637-43.

[79] Jaudszus A, Krokowski M, Mockel P, Darcan Y, Avagyan A, Matricardi P, Jahreis G, Hamelmann E. Cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid inhibits allergic sensitization and airway inflammation via a PPARgamma-related mechanism in mice. *J Nutr* 2008; 138(7): 1336-42.

[80] Jeannin P, Delneste Y, Seveso M, Life P, Bonnefoy JY. IL-12 synergizes with IL-2 and other stimuli in inducing IL-10 production by human T cells. *J Immunol* 1996; 156(9): 3159-65.

[81] Jenkins MK, Mueller D, Schwartz RH, Carding S, Bottomley K, Stadecker MJ, Urdahl KB, Norton SD. Induction and maintenance of anergy in mature T cells. *Adv Exp Med Biol* 1991; 292: 167-76.

[82] Kalliomaki M, Salminen 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): 1869-71.

[83] Kanwar RK, Macgibbon AK, Black PN, Kanwar JR, Rowan A, Vale M, Krissansen GW. Bovine milk fat enriched in conjugated linoleic and vaccenic acids attenuates allergic airway disease in mice. *Clin Exp Allergy* 2008; 38(1): 208-18.

[84] Karvonen S, Sipila P, Martikainen P, Rahkonen O, Laaksonen M. Smoking in context - a multilevel approach to smoking among females in Helsinki. *BMC Public Health* 2008; 8: 134.

[85] Kay AB. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344(1): 30-7.

[86] Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 931-72.

[87] Klippel A, Reinhard C, Kavanaugh WM, Apell G, Escobedo MA, Williams LT. Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transducing kinase pathways. *Mol Cell Biol* 1996; 16(8): 4117-27.

[88] Kondo N, Kobayashi Y, Shinoda S, Takenaka R, Teramoto T, Kaneko H, Fukao T, Matsui E, Kasahara K, Yokoyama Y. Reduced interferon gamma production by anti-

gen-stimulated cord blood mononuclear cells is a risk factor of allergic disorders--6-year follow-up study. *Clin Exp Allergy* 1998; 28(11): 1340-4.

[89] Kopf M, Brombacher F, Hodgkin PD, Ramsay AJ, Milbourne EA, Dai WJ, Ovington KS, Behm CA, Kohler G, Young IG, Matthaei KI. IL-5-deficient mice have a developmental defect in CD5+ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity* 1996; 4(1): 15-24.

[90] Kraft J, Collomb M, Mockel P, Sieber R, Jahreis G. Differences in CLA isomer distribution of cow's milk lipids. *Lipids* 2003; 38(6): 657-64.

[91] Kull I, Wickman M, Lilja G, Nordvall SL, Pershagen G. Breast feeding and allergic diseases in infants-a prospective birth cohort study. *Arch Dis Child* 2002; 87(6): 478-81.

[92] Kummeling I, Stelma FF, Dagnelie PC, Snijders BEP, Penders J, Huber M, van Ree R, van den Brandt PA, Thijs C. Early life exposure to antibiotics and the subsequent development of eczema, wheeze, and allergic sensitization in the first 2 years of life: the KOALA Birth Cohort Study. *Pediatrics* 2007; 119(1): e225-31.

[93] Larsen FS, Holm NV, Henningsen K. Atopic dermatitis. A genetic-epidemiologic study in a population-based twin sample. *J Am Acad Dermatol* 1986; 15(3): 487-94.

[94] Lemanske RFJ. The childhood origins of asthma (COAST) study. *Pediatr Allergy Immunol* 2002; 13 Suppl 15: 38-43.

[95] Leung DY, Geha RS. Control of IgE synthesis in man. *J Clin Immunol* 1986; 6(4): 273-83.

[96] Li L, Elliott JF, Mosmann TR. IL-10 inhibits cytokine production, vascular leakage, and swelling during T helper 1 cell-induced delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* 1994; 153(9): 3967-78.

[97] Li L, Lee H, Bell JJ, Gregg RK, Ellis JS, Gessner A, Zaghouani H. IL-4 utilizes an alternative receptor to drive apoptosis of Th1 cells and skews neonatal immunity toward Th2. *Immunity* 2004; 20(4): 429-40.

[98] Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 1993; 151(9): 4562-73.

[99] Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, Carr VA, Robinson DS. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004; 363(9409): 608-15.

[100] Litonjua AA, Carey VJ, Burge HA, Weiss ST, Gold DR. Parental history and the risk for childhood asthma. Does mother confer more risk than father? *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(1): 176-81.

[101] Macaubas C, de Klerk NH, Holt BJ, Wee C, Kendall G, Firth M, Sly PD, Holt PG. Association between antenatal cytokine production and the development of atopy and asthma at age 6 years. *Lancet* 2003; 362(9391): 1192-7.

[102] Malamitsi-Puchner A, Protonotariou 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 Hum Dev* 2005; 81(4): 387-92.

[103] Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001; 2(9): 816-22.

[104] Matheson MC, Erbas B, Balasuriya A, Jenkins MA, Wharton CL, Tang ML, Abramson MJ, Walters EH, Hopper JL, Dharmage SC. Breast-feeding and atopic disease: a cohort study from childhood to middle age. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120(5): 1051-7.

[105] Matheson MC, Walters EH, Simpson JA, Wharton CL, Ponsonby A, Johns DP, Jenkins MA, Giles GG, Hopper JL, Abramson MJ, Dharmage SC. Relevance of the hygiene hypothesis to early vs. late onset allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2009; 39(3): 370-8.

[106] Midodzi WK, Rowe BH, Majaesic CM, Saunders LD, Senthilselvan A. Predictors for wheezing phenotypes in the first decade of life. *Respirology* 2008;.

[107] Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 683-765.

[108] Moore MM, Rifas-Shiman SL, Rich-Edwards JW, Kleinman KP, Camargo CAJ, Gold DR, Weiss ST, Gillman MW. Perinatal predictors of atopic dermatitis occurring in the first six months of life. *Pediatrics* 2004; 113(3 Pt 1): 468-74.

[109] Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136(7): 2348-57.

[110] Murphy K, Ehrenstein M, Janeway C, Travers P, Walport M. *Janeway's immunobiology.* New York, NY [u.a.]: Garland Science, c 2008.

[111] Neaville WA, Tisler C, Bhattacharya A, Anklam K, Gilbertson-White S, Hamilton R, Adler K, Dasilva DF, Roberg KA, Carlson-Dakes KT, Anderson E, Yoshihara D, Gangnon R, Mikus LD, Rosenthal LA, Gern JE, Lemanske RFJ. *Developmental cytokine response profiles and the clinical and immunologic expression of atopy during the first year of life.* 2003.

[112] Negele K, Heinrich J, Borte M, von Berg A, Schaaf B, Lehmann I, Wichmann H, Bolte G. Mode of delivery and development of atopic disease during the first 2 years of life. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; 15(1): 48-54.

[113] Ning H, Wang H, Zhao L, Zhang C, Li X, Chen Y, Xu D. Maternally-administered lipopolysaccharide (LPS) increases tumor necrosis factor alpha in fetal liver and fetal brain: its suppression by low-dose LPS pretreatment. *Toxicol Lett* 2008; 176(1): 13-9.

[114] Norman PS. Immunotherapy: 1999-2004. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(6): 1013-23; quiz 1024.

[115] Nowak D, Heinrich J, Jorres R, Wassmer G, Berger J, Beck E, Boczor S, Claussen M, Wichmann HE, Magnussen H. Prevalence of respiratory symptoms, bronchial hyperresponsiveness and atopy among adults: west and east Germany. *Eur Respir J* 1996; 9(12): 2541-52.

[116] Ohmen JD, Hanifin JM, Nickoloff BJ, Rea TH, Wyzykowski R, Kim J, Jullien D, McHugh T, Nassif AS, Chan SC. Overexpression of IL-10 in atopic dermatitis. Contrasting cytokine patterns with delayed-type hypersensitivity reactions. *J Immunol* 1995; 154(4): 1956-63.

[117] Oien T, Storro O, Johnsen R. Assessing atopic disease in children two to six years old: reliability of a revised questionnaire. *Prim Care Respir J* 2008;.

[118] Osterlund P, Jarvinen KM, Laine S, Suomalainen H. Defective tumor necrosis factor-alpha production in infants with cow's milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 1999;

10(3): 186-90.

[119] Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994; 76(2): 241-51.

[120] Pfefferle PI, Sel S, Johannes Ege,.M., Buchele G, Blumer N, Krauss-Etschmann S, Herzum I, Albers CE, Lauener RP, Roponen M, Hirvonen MR, Vuitton DA, Riedler J, Brunekreef B, Dalphin JC, Braun-Fahrlander C, Pekkanen J, von Mutius,.E., Renz H. Cord blood allergen-specific IgE is associated with reduced IFN-gamma production by cord blood cells: The Protection against Allergy-Study in Rural Environments (PASTURE) study. *J Allergy Clin Immunol* 2008;.

[121] Prescott SL, Holt PG. Abnormalities in cord blood mononuclear cytokine production as a predictor of later atopic disease in childhood. *Clin Exp Allergy* 1998; 28(11): 1313-6.

[122] Prescott SL, King B, Strong TL, Holt PG. The value of perinatal immune responses in predicting allergic disease at 6 years of age. *Allergy* 2003; 58(11): 1187-94.

[123] Prescott SL, Macaubas 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): 4730-7.

[124] Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Holt PG. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 1999; 353(9148): 196-200.

[125] Prokesova L, Lodinova-Zadnikova R, Zizka J, Kocourkova I, Novotna O, Petraskova 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): 175-83.

[126] Protonotariou E, Malamitsi-Puchner A, Giannaki G, Rizos D, Phocas I, Sarandakou A. Patterns of inflammatory cytokine serum concentrations during the perinatal period. *Early Hum Dev* 1999; 56(1): 31-8.

[127] Racioppi L, Ronchese F, Matis LA, Germain RN. Peptide-major histocompatibility complex class II complexes with mixed agonist/antagonist properties provide evidence for ligand-related differences in T cell receptor-dependent intracellular signaling. *J Exp*

Med 1993; 177(4): 1047-60.

[128] Raherison C, Penard-Morand C, Moreau D, Caillaud D, Charpin D, Kopfersmitt C, Lavaud F, Taytard A, Annesi-maesano I. In utero and childhood exposure to parental tobacco smoke, and allergies in schoolchildren. *Respir Med* 2007; 101(1): 107-17.

[129] Ramana CV, Gil MP, Schreiber RD, Stark GR. Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol* 2002; 23(2): 96-101.

[130] Randolph DA, Carruthers CJ, Szabo SJ, Murphy KM, Chaplin DD. Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma. *J Immunol* 1999; 162(4): 2375-83.

[131] Renz H, mutius Ev, Illi S, Wolkers F, Hirsch T, Weiland SK. 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): 338-42.

[132] Renz H. The central role of T-cells in allergic sensitization and IgE regulation. *Exp Dermatol* 1995; 4(4 Pt 1): 173-82.

[133] Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, Carr D, Schierl R, Nowak D, von Mutius E. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 2001; 358(9288): 1129-33.

[134] Robinson DS, Tsicopoulos A, Meng Q, Durham S, Kay AB, Hamid Q. Increased interleukin-10 messenger RNA expression in atopic allergy and asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 14(2): 113-7.

[135] Roponen M, Hyvarinen A, Hirvonen M, 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): 1048-52.

[136] Rowe J, Heaton 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; 113(4): 710-6.

[137] Royer B, Varadaradjalou S, Saas P, Guillosson JJ, Kantelip JP, Arock M. Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(5): 694-704.

[138] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001; 182: 18-32.

[139] Salam MT, Margolis HG, McConnell R, McGregor JA, Avol EL, Gilliland FD. *Mode of delivery is associated with asthma and allergy occurrences in children.* 2006.

[140] Sandin A, Bjorksten B, Braback L. Development of atopy and wheezing symptoms in relation to heredity and early pet keeping in a Swedish birth cohort. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; 15(4): 316-22.

[141] Schaub B, Liu J, Schleich I, Hoppler S, Sattler C, von Mutius E. Impairment of T helper and T regulatory cell responses at birth. *Allergy* 2008; 63(11): 1438-47.

[142] Schmitt E, Van Brandwijk R, Fischer HG, Rude E. *Establishment of different T cell sublines using either interleukin 2 or interleukin 4 as growth factors.* 1990.

[143] Schultz Larsen FV, Holm NV. Atopic dermatitis in a population based twin series. Concordance rates and heritability estimation. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 1985; 114: 159.

[144] Snijders A, Van der Pouw Kraan TC, Engel M, Wormmeester J, Widjaja P, Zonneveld IM, Bos JD, Kapsenberg ML. Enhanced prostaglandin E2 production by monocytes in atopic dermatitis (AD) is not accompanied by enhanced production of IL-6, IL-10 or IL-12. *Clin Exp Immunol* 1998; 111(3): 472-6.

[145] Sornasse T, Larenas PV, Davis KA, de Vries JE, Yssel H. Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4+ T cells, analyzed at the single-cell level. *J Exp Med* 1996; 184(2): 473-83.

[146] Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989; 299(6710): 1259-60.

[147] Szepfalusi Z, Loibichler C, Pichler J, Reisenberger K, Ebner C, Urbanek R. Direct evidence for transplacental allergen transfer. *Pediatr Res* 2000; 48(3): 404-7.

[148] Takanaski S, Nonaka R, Xing Z, O'Byrne P, Dolovich J, Jordana M. Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. *J Exp Med* 1994; 180(2): 711-5.

[149] Tau G, Rothman P. Biologic functions of the IFN-gamma receptors. *Allergy* 1999; 54(12): 1233-51.

[150] Turyk M, Curtis L, Scheff P, Contraras A, Coover L, Hernandez E, Freels S, Persky V. Environmental allergens and asthma morbidity in low-income children. *J Asthma* 2006; 43(6): 453-7.

[151] Van der Pouw Kraan TC, Boeije LC, de Groot ER, Stapel SO, Snijders A, Kapsenberg ML, van der Zee JS, Aarden LA. Reduced production of IL-12 and IL-12-dependent IFN-gamma release in patients with allergic asthma. *J Immunol* 1997; 158(11): 5560-5.

[152] Vogel K, Blumer N, Korthals M, Mittelstadt J, Garn H, Ege M, von Mutius E, Gatermann S, Bufe A, Goldmann T, Schwaiger K, Renz H, Brandau S, Bauer J, Heine H, Holst O. Animal shed Bacillus licheniformis spores possess allergy-protective as well as inflammatory properties. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122(2): 307-12, 312.e1-8.

[153] Vollmar A, Dingermann T, Zündorf I. *Immunologie: Grundlagen und Wirkstoffe.* Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges., c2005.

[154] von Ehrenstein OS, Von Mutius E, Illi S, Baumann L, Bohm O, von Kries R. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy* 2000; 30(2): 187-93.

[155] von Mutius E, Martinez FD, Fritzsch C, Nicolai T, Reitmeir P, Thiemann HH. Skin test reactivity and number of siblings. *BMJ* 1994; 308(6930): 692-5.

[156] von Mutius E, Schmid S. The PASTURE project: EU support for the improvement of knowledge about risk factors and preventive factors for atopy in Europe. *Allergy* 2006; 61(4): 407-13.

[157] von Mutius E. The influence of birth order on the expression of atopy in families: a gene-environment interaction? *Clin Exp Allergy* 1998; 28(12): 1454-6.

[158] Wamboldt FS, Ho J, Milgrom H, Wamboldt MZ, Sanders B, Szefler SJ, Bender BG. Prevalence and correlates of household exposures to tobacco smoke and pets in children with asthma. *J Pediatr* 2002; 141(1): 109-15.

[159] Warner JA, Miles EA, 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(5): 423-30.

[160] Waser M, Michels KB, Bieli C, Floistrup H, Pershagen G, von Mutius E, Ege M, Riedler J, Schram-Bijkerk D, Brunekreef B, van Hage M, Lauener R, Braun-Fahrlander C. Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe. *Clin Exp Allergy* 2007; 37(5): 661-70.

[161] Waser M, von Mutius E, Riedler J, Nowak D, Maisch S, Carr D, Eder W, Tebow G, Schierl R, Schreuer M, Braun-Fahrlander C. Exposure to pets, and the association with hay fever, asthma, and atopic sensitization in rural children. *Allergy* 2005; 60(2): 177-84.

[162] Waterer GW, Quasney MW, Cantor RM, Wunderink RG. Septic shock and respiratory failure in community-acquired pneumonia have different TNF polymorphism associations. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(7): 1599-604.

[163] Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14(7): 353-6.

[164] Wickens K, Lane JM, Fitzharris P, Siebers R, Riley G, Douwes J, Smith T, Crane J. Farm residence and exposures and the risk of allergic diseases in New Zealand children. *Allergy* 2002; 57(12): 1171-9.

[165] Williams LK, Peterson EL, Ownby DR, Johnson CC. The relationship between early fever and allergic sensitization at age 6 to 7 years. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(2): 291-6.

[166] Williams TJ, Jones CA, 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(5): 951-9.

[167] Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, Donaldson DD. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 1998; 282(5397): 2258-61.

[168] Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol* 2001; 1(1): 69-75.

[169] Winkler B, Hufnagl K, Spittler A, Ploder M, Kallay E, Vrtala S, Valenta R, Kundi M, Renz H, Wiedermann U. The role of Foxp3+ T cells in long-term efficacy of prophylactic and therapeutic mucosal tolerance induction in mice. *Allergy* 2006; 61(2): 173-80.

[170] Yabuhara A, Macaubas C, Prescott SL, Venaille TJ, Holt BJ, Habre W, Sly PD, Holt PG. TH2-polarized immunological memory to inhalant allergens in atopics is established during infancy and early childhood. *Clin Exp Allergy* 1997; 27(11): 1261-9.

[171] Yang X, Wang S, Fan Y, Han X. IL-10 deficiency prevents IL-5 overproduction and eosinophilic inflammation in a murine model of asthma-like reaction. *Eur J Immunol* 2000; 30(2): 382-91.

[172] Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 2002; 296(5567): 490-4.

[173] Ying S, Robinson DS, Meng Q, Barata LT, McEuen AR, Buckley MG, Walls AF, Askenase PW, Kay AB. C-C chemokines in allergen-induced late-phase cutaneous responses in atopic subjects: association of eotaxin with early 6-hour eosinophils, and of eotaxin-2 and monocyte chemoattractant protein-4 with the later 24-hour tissue eosinophilia, and relationsh. *J Immunol* 1999; 163(7): 3976-84.

[174] Yoshida T, Ikuta K, Sugaya H, Maki K, Takagi M, Kanazawa H, Sunaga S, Kinashi T, Yoshimura K, Miyazaki J, Takaki S, Takatsu K. Defective B-1 cell development and impaired immunity against Angiostrongylus cantonensis in IL-5R alpha-deficient mice. *Immunity* 1996; 4(5): 483-94.

[175] Yu JH, Lue KH, Lu KH, Sun HL, Lin YH, Chou MC. The relationship of air pollution to the prevalence of allergic diseases in Taichung and Chu-Shan in 2002. *J Microbiol Immunol Infect* 2005; 38(2): 123-6.

[176] Zhong NS. New insights into risk factors of asthma. *Respirology* 1996; 1(3): 159-66.

[177] Zizka J, Kverka M, Novotna O, Stankova I, Lodinova-Zadnikova R, Kocourkova I, Sterzl I, Prokesova L. Perinatal period cytokines related to increased risk of future allergy development. *Folia Microbiol (Praha)* 2007; 52(5): 549-55.

8. Materialübersicht

Artikel	Bezeichnung	Firma	Bestellnummer
384-Well-Platte	384 well clear Maxisorp	NUNC A/S	65813
BM blue POD-Substrat	3,3´-5,5´- Tetra-methylbenzidin (TMB)	Roche Diagnostics Corporation	1484281
Desinfektionsmittel	Softasept	Reagenzienzentrale	8171
Einfrier-Pappschachteln			
Eis			
ELISA-Reader	Tecan	GENios	
ELISA-Reader- Software	Magellan 3		
FCS	Fetal calf serum Gold	PAA Laboratories GmbH	
Fein-Waage			
Finnpipette	300 µl (automatisch)	Labsystems	
Finnpipette	50-300 µl (manuell/ mecha-nisch)	Labsystems	
H2SO4	2 mmol/ l		
Handschuhe	Gr. 7		
Kühlschrank	-20 °C		
Kühlschrank	2-6 °C		
Kühlschrank	-80 °C		
Opt-EIA ELISA Kit IFN-γ	Capture AntibodyDetection AntibodyEnzym ReagentStan-dard	BD Biosciences Pharmingen	555142
Opt-EIA ELISA Kit IL-10	Capture AntibodyDetection AntibodyEnzym ReagentStan-dard	BD Biosciences Pharmingen	555157
Opt-EIA ELISA Kit IL-12	Capture AntibodyDetection AntibodyEnzym ReagentStan-dard	BD Biosciences Pharmingen	555171
Opt-EIA ELISA Kit IL-5	Capture AntibodyDetection AntibodyEnzym ReagentStan-dard	BD Biosciences Pharmingen	555202
Opt-EIA ELISA Kit TNF-α	Capture AntibodyDetection AntibodyEnzym ReagentStan-dard	BD Biosciences Pharmingen	555212
PBS	Dulbeccos□f Phosphate Buff-ered Saline	PAA Laboratories GmbH	
Pipetten	"reference" 10-100 µl (gelb) 0,5- 10 µl (grau) 50-200 µl (gelb) "research" 5000µl (lila)	Eppendorf	

Pipetten-Spitzen	Gelb Blau Lila Transparent		
Probenstander			
Reagiergefase			
Micro-Tubes			
Cryo-Tubes			
Schuttler			
Stiroporkiste			
Tween 20	Polyoxyethylene Sorbitant Monolaurate	Sigma	9005-64-5
Verschlussfilm			
Parafilm			
Vortexer			
Wasserbad			

9. Anhang

9.1 Lebenslauf

Persönliche Angaben	*Familienstand: ledig*
	Staatsangehörigkeit: deutsch
	Alter: 28 (geb. 27.05.1980)
	Geburtsort: Stuttgart, Bad Cannstatt
	Eltern: Dr. med. Kurt Zimmermann Arzt (Internist)
	Dr. med. A.-E. Kerber-Zimmermann Ärztin (Psychotherapie)
Ausbildung	1986 – 1990 Grundschule Bad Kissingen (Bayern)
	1990 – 1991 Gymnasium Bad Kissingen (Bayern)
	1991 – 1993 Gymnasium Tegernsee (Bayern)
	1993 – 1999 Gymnasium im Ellental Bietigheim (Baden-Württemberg)
	1999 – 2000 Zivildienst bei Sozialberatung Ludwigsburg e.V.
	2000 – 2003 Ausbildung an der BA-Stuttgart zum Dipl. Betriebswirt (BA)
	2002 ERASMUS – Semester an der Hogeschool Zeeland, Vlissingen (NL)
	2003 – 2009 Studium der Medizin an der Universität Marburg
	Herbst 2005 – erfolgreiche Teilnahme an der ersten ärztlichen Prüfung (2,0)
Famulaturen	3/2006 Famulatur in der Inneren Medizin – Krankenhaus Bietigheim
	8/2006 Famulatur in der Herzchirurgie – Deutsches Herzzentrum Berlin
	8/2007 Famulatur in der Plastischen Chirurgie – Markus KH, Frankfurt
	2/2008 Famulatur in der Orthopädie – Tongji University, Shanghai
Praktisches Jahr	8/2008 Innere Medizin, Uniklinikum Marburg, Stat. 022 / Notaufnahme
	12/2008 Orthopädie, Auguste-Victoria-Krankenhaus, Berlin
	2/2009 Chirurgie, Insel Spital, Bern
	4/2009 Anästhesie, Uniklinikum Marburg
Extrakurrikuläre Aktivitäten	Dozent „Medilearn“ (Medizinrepetitorien), Marburg
	Nachtmesser, Schlaflabor Universität Marburg
	Dozent Nathkurs, Visceralchirurgie Marburg
	Wissenschaftliche Hilfskraft im Neuroanatomiekurs der Universität Marburg

9.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Arnold
Barth
Bals
Basler
Baum
Becker
Christiansen
Dünne
Eilers
Feuser
Fuchs
Gerdes
Geus
Gudermann
Griss
Hofbauer
Höffken
Hofmann
Jungclas
Kann
Klose
Klenk
Köhler
Koolmann
Krause
Kretschmer
Krieg
Kroll
Lang
Lill
Maisch
Mandrek
Moll
Mueller
Mutters
Oertel
Remschmidt
Rothmund
Renz
Schmidt
Steiniger
Stiletto
Studer
Vogelmeier
Weihe
Werner
Wulf

9.3 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Harald Renz für die Möglichkeit danken, in seiner Abteilung diese Doktorarbeit anfertigen zu dürfen.

Frau Dr. Dr. Pfefferle danke ich für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, die große Hilfsbereitschaft und ein immer offenes Ohr für meine Anliegen.

Ich danke auch der gesamten Abteilung für die nette Atmosphäre sowie für die fachliche und technische Unterstützung vor allem bei den ELISA Messungen.

Darüber hinaus danke ich meiner Freundin Tanja und meinem Freund Christoph für die kritische Durchsicht und Beratung bezüglich der engischen Formulierungen.

Und schließlich danke ich meiner Familie, die mich stets unterstützt und wieder aufgebaut hat, und ohne die dies alles nicht möglich gewesen wäre.

DANKE!

9.4 Ehrenwörtliche Erklärung

„Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Die Hygienehypothese im bäuerlichen Umfeld – immunologische Mechanismen pränataler Einflussfaktoren im Hinblick auf die Zytokinexpression im Nabelschnurblut“ in dem Medizinischen Zentrum für Klinische Chemie und Molekularer Diagnostik der Phillips-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. H. Renz mit Unterstützung durch Frau Dr. Dr. Petra Pfefferle ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.“

Folgende Veröffentlichungen sind aus dieser Arbeit hervorgegangen:

The Journal of Allergy and Clinical Immunology

Cord blood cytokines are modulated by maternal farming activities and consumption of farm dairy products during pregnancy - The PASTURE Study

Petra Ina Pfefferle PhD DrPH, Gisela Büchele MPH, Nicole Blümer[1] PhD, Marjut Roponen PhD, Markus Johannes Ege[9] MD, MPH, Susanne Krauss-Etschmann[9] MD, Jon Genuneit, Anne Hyvärinen, PhD, Maija-Riitta Hirvonen PhD, Roger Lauener MD, Juha Pekkanen MD, Josef Riedler MD, Jean Charles Dalphin MD, PhD, Bert Brunekeef, PhD, Charlotte Braun-Fahrländer[8] MD, Erika von Mutius MD MSc, Harald Renz MD and *the PASTURE Study group**

**The PASTURE study group:* Gertraud Weiß, Ellen Üblagger, Claudia Humer, Manuela, Rußegger (Austria); Maija-Riitta Hirvonen, Raija Juntunen, Reetta Tiihonen, Pekka Tiittanen, Timo Kauppila, Aino Nevalainen, Sami Remes (Finland); Dominique A. Vuitton, Marie-Laure Dalphin, Renaud Piarroux, Gabriel Reboux, Sandrine Roussel, Bertrand Sudre (France); Bianca Schaub, Susanne Schmid, Sabina Illi, Nicola Korherr, Dorothee Quast, Markus Zimmermann (Germany); Sondhja Bitter, Felix H. Sennhauser, Susanne Loeliger, Johanna Steinle, Remo Frei (Switzerland).

Supported by the European Union (research grant QLK4-CT-2001-00250)

Ort: Datum: Unterschrift: