

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

Direktor: Professor Dr. med. Dietrich Reinhardt

**Zytokinexpressionsmuster im Blut einjähriger Kinder von Bauern und  
Nichtbauern im Vergleich: Einfluss der Tätigkeiten der Bäuerinnen  
während der Schwangerschaft und der Exposition der Kinder im ersten  
Lebensjahr**



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

vorgelegt von

Sylvia Maier  
aus München

2008

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Erika von Mutius

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Katja Radon  
Prof. Dr. Joerg Hasford

Mitbetreuung durch: PD Dr. Susanne Krauss-Etschmann

Dekan: Prof. Dr. Dietrich Reinhardt

Tag des Rigorosums: 01.07.2008

Widmung  
Meiner Familie

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
0. Abkürzungsverzeichnis .....	7
1. Einleitung .....	8
1.1. Geschichte und Prävalenz allergischer Erkrankungen .....	8
1.2. Definition allergischer Erkrankungen .....	8
1.3. Das humane Immunsystem .....	8
1.3.1. Angeborenes und erworbenes Immunsystem .....	8
1.3.2. T <sub>H</sub> 1/ T <sub>H</sub> 2-Zellen .....	9
1.3.3. Regulatorische T-Zellen .....	10
1.3.4. Zytokine .....	11
1.4. Besonderheiten des kindlichen Immunsystems .....	13
1.5. Risikofaktoren für die Entwicklung allergischer Erkrankungen .....	13
1.5.1. Genetische Faktoren .....	13
1.5.2. Die Hygienehypothese .....	14
1.5.3. Weitere Faktoren .....	15
2. Zielsetzung .....	16
3. Material und Methoden .....	17
3.1. Studiendesign .....	17
3.1.1. Pilotstudie .....	17
3.1.2. Aufgabenverteilung .....	18
3.2. Studienpopulation .....	18
3.3. Materialgewinnung .....	18
3.3.1. Blutentnahme .....	18
3.3.2. Fragebögen .....	19
3.3.3. Tagebücher .....	20
3.4. Methoden .....	20
3.4.1. Stimulationsansatz .....	20
3.4.2. Differenziertes Blutbild .....	22
3.4.3. ELISA .....	22
3.4.4. Statistische Auswertung .....	22
3.5. Verbrauchsmaterial und Geräte .....	23
3.5.1. Geräte .....	23
3.5.2. Verbrauchsmaterial .....	24
3.5.3. Reagenzien .....	24
4. Ergebnisse .....	25
4.1. Rekrutierung der Studienteilnehmer und Materialgewinnung .....	25
4.2. Beschreibung der Studienpopulation .....	27
4.3. Charakterisierung der Bauernhöfe .....	32
4.4. Tätigkeiten der Bäuerinnen .....	32
4.5. Analyse der Zytokindaten .....	33
4.5.1. Zytokindaten ohne Kategorien .....	34
4.5.2. Zytokindaten in drei Kategorien .....	37
4.5.3. Zytokindaten in zwei Kategorien .....	42
4.5.4. Regressionsanalyse der Zytokine im Vergleich zum Bauernstatus .....	47

4.5.5.	Einfluss der Tätigkeiten der Bäuerinnen während der Schwangerschaft auf die Zytokindaten.....	50
4.5.6.	Regressionsanalyse der Zytokine im Vergleich zu den Tätigkeiten der Bäuerinnen .....	52
4.5.7.	Einfluss der Exposition der Bauernkinder auf die Zytokindaten .....	61
4.5.8.	Regressionsanalyse der Zytokine im Vergleich zur Exposition der Bauernkinder .....	62
4.5.9.	Zusammenhang zwischen den Tätigkeiten der Bäuerinnen während der Schwangerschaft und der Exposition der Kinder im ersten Lebensjahr .....	63
5.	Diskussion .....	69
5.1.	Studie.....	69
5.2.	Methoden.....	70
5.3.	Ergebnisse .....	71
5.3.1.	Zytokindaten in Bezug zum Bauernstatus.....	71
5.3.2.	Zytokindaten in Zusammenhang mit den Tätigkeiten der Bäuerinnen .....	72
5.3.3.	Zytokindaten in Bezug zur Exposition der Bauernkinder.....	74
5.3.4.	Unabhängigkeit der Tätigkeiten der Bäuerinnen während der Schwangerschaft und der Exposition der Kinder im ersten Lebensjahr .....	75
6.	Zusammenfassung .....	76
7.	Anhang .....	78
7.1.	Literaturverzeichnis.....	78
7.2.	Tabellenverzeichnis.....	86
7.3.	Abbildungsverzeichnis .....	88
7.4.	Fragebögen .....	89
7.4.1.	Auszüge aus dem Schwangerschaftsfragebogen.....	89
7.4.2.	Auszüge aus dem 1-Jahresfragebogen .....	101
7.5.	Danksagung.....	105
7.6.	Lebenslauf .....	106

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
$\Delta$	Delta oder Differenz
#	Nummer
~	ungefähr
<	kleiner
>	größer
$\mu\text{g}$	Microgramm
$\mu\text{l}$	Microliter
$\chi^2$	Pearson chi Quadrattest
aOR	adjustierte Odds Ratio
APZ	antigenpräsentierende Zelle
BMI	Body Mass Index
bzw.	beziehungsweise
CSF	koloniestimulierender Faktor
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTH	Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ („delayed type hypersensitivity“)
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPS	extrazelluläres Polysaccharid
FCS	fetales Kälberserum
FOXP3	Forkhead box Protein 3
h	hour(s)
IFN- $\gamma$	Interferon- gamma
IgE	Immunglobulin E
IL-	Interleukin
IPEX	Immundysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-chromosomales Syndrom
KI	Konfidenzintervall
LGG	Lactobacillus rhamnosus subspecies GG
LPS	Lipopolysaccharid
mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mRNA	Boten-Ribonuleinsäure („messenger“)
MWU	Mann-Whitney <i>U</i> -test
n	Anzahl
n.d.	nicht definiert
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
OR	Odds Ratio
p	Signifikanzniveau
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

pg	Picogramm
P/I	PMA/ Ionomycin
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RPMI	Zellkulturmedium entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
SEB	Staphylokokken enterotoxin B
sek	Sekunde(n)
TZR	T-Zell-Rezeptor
T <sub>C</sub>	zytotoxische T-Zelle
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zelle
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
u.a.	unter anderem
VB	Vollblut
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

## 1. Einleitung

### 1.1. Geschichte und Prävalenz allergischer Erkrankungen

Erste Beschreibungen von Heuschnupfen sind bereits im 19. Jahrhundert zu finden [1]. Im Jahre 1906 veröffentlichte der Wiener Kinderarzt Clemens von Pirquet seinen berühmten Artikel „Allergie“ in der Münchner Medizinischen Wochenschrift und führte somit den Begriff Allergie in die medizinische Fachsprache ein [2]. Während damals allergische Erkrankungen noch relativ selten vorkamen, haben sie in den letzten sechzig Jahren erheblich zugenommen [3]. Heutzutage haben in Europa über 40% der Bevölkerung zumindest eine allergische Erkrankung [2]. Krankheiten des atopischen Formenkreises sind die häufigsten chronischen Krankheiten bei Kindern in Industrienationen [4]. Asthma ist bei Kindern unter 18 Jahren der dritthäufigste Grund für eine Krankenhauseinweisung in den USA [5]. Zwischen 1990 und 1998 konnte eine Verdopplung des Auftretens von Asthma bei Kindern zwischen 1 und 5 Jahren verzeichnet werden [6]. Allerdings ist dieser Anstieg der Prävalenz von Asthma nur bei Kindern und Jugendlichen zu finden, aber nicht bei Erwachsenen. Derzeit scheint ein Plateau der Allergieinzidenz zumindest in der westlichen Welt erreicht zu sein, weil es in den letzten Jahren zu keinem weiteren Anstieg mehr kam [7-9].

### 1.2. Definition allergischer Erkrankungen

Als „Allergie“ bezeichnet man die spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit, d.h. der Körper reagiert auf einen normalerweise harmlosen Umweltstoff (Antigen) mit einer symptomatischen Reaktion [10]. Diese Reaktion beruht auf der Wechselwirkung zwischen dem Antigen und Antikörpern oder primär aktivierten T-Zellen, die sich bereits bei einem früheren Kontakt mit demselben Antigen gebildet haben.

Allergische Reaktionen werden in vier Klassen eingeteilt (nach Coombs und Gell):

- Typ-I-Reaktionen (die klassischen Soforttyp-Reaktionen, welche durch IgE-Antikörper vermittelt werden)
- Typ-II-Reaktionen (zytotoxische Reaktionen)
- Typ-III-Reaktionen (durch Immunkomplexe ausgelöste Reaktionen)
- Typ-IV-Reaktionen (die klassische verzögerte zelluläre Immunantwort) [10]

Unter Atopie versteht man die bei manchen Menschen auftretende, erblich bedingte, verstärkte Neigung, gegen harmlose Substanzen gerichtete Überempfindlichkeitsreaktionen des Soforttyps auszubilden, die normalerweise durch IgE Antikörper vermittelt werden [10].

Zu den Erkrankungen des atopischen Formenkreises zählen das atopische Ekzem (Neurodermitis), die allergische Rhinitis (Heuschnupfen), die allergische Konjunktivitis (Bindehautentzündung), die Urtikaria (Nesselsucht) und das allergische Asthma.

### 1.3. Das humane Immunsystem

#### 1.3.1. Angeborenes und erworbenes Immunsystem

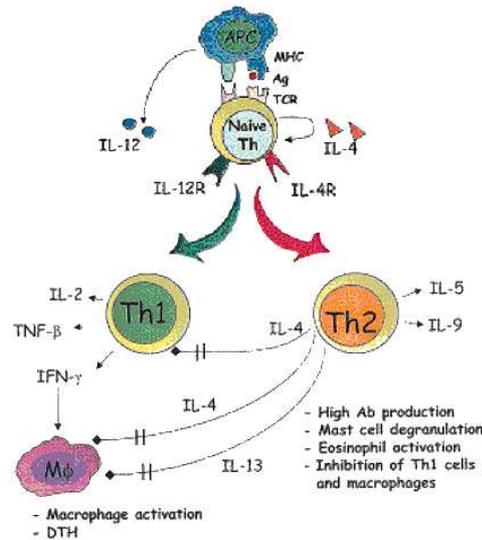
Man unterscheidet das angeborene (unspezifische) und das erworbene (spezifische) Immunsystem. Während durch das angeborene Immunsystem ein Fremdstoff auch ohne

vorhergehenden Kontakt unschädlich gemacht werden kann, muss zur Aktivierung des erworbenen Immunsystems ein Erstkontakt, welcher die Bildung von Antikörpern auslöst, vorangehen [11]. Prinzipiell können beide Systeme unabhängig voneinander arbeiten, jedoch sind sie beim Zusammenwirken effizienter. Zur angeborenen Abwehr zählen unter anderem Interferone, das Komplementsystem, Granulozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen. Zelluläre Komponenten der erworbenen Abwehr sind T-Lymphozyten, welche für die zelluläre Abwehr verantwortlich sind und B-Lymphozyten, welche zu einer Antikörperbildung führen. T-Zellen wiederum lassen sich unterteilen in T-Helferzellen ( $T_H1$ / $T_H2$ -Zellen; Oberflächenmarker CD4 positive Zellen), zytotoxische T-Zellen ( $T_c1$ / $T_c2$ -Zellen; CD8 positive Zellen) und regulatorische T-Zellen. Voraussetzung für eine allergische Immunantwort ist eine spezifische Sensibilisierung. Hierbei werden Allergene von antigenpräsentierenden Zellen (beispielsweise Makrophagen der Bronchialschleimhaut oder Langerhans-Zellen der Haut) phagozytiert, intrazellulär prozessiert und über Histokompatibilitätsantigene der Klasse II (MHC-Klasse-II) den T-Lymphozyten präsentiert [12, 13]. Die für dieses Peptid spezifische T-Zelle bindet mit Hilfe ihres T-Zellrezeptors an die APC. Durch ein zweites Signal von akzessorischen Rezeptoren wie CD4, CD28 oder Integrinen kommt es zur Aktivierung der T-Zelle [10, 14].

### 1.3.2. $T_H1$ / $T_H2$ -Zellen

In diesem Zusammenhang werden zwei T-Zelleffektortypen differenziert. 1986 lieferte T. R. Mosmann im Mausmodell als erster den Beweis, dass zwei Klassen von T-Helferzellen unterschieden werden können [15]. Ob sich eine naive  $T_H0$ -Zelle in Richtung  $T_H1$ - oder  $T_H2$ -Zelle polarisiert, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Zum einen von der Art der Antigen präsentierenden Zelle, zum anderen von der Art und Menge des Antigens, dem Eintrittsort des Antigens in den Körper (z.B. über die Schleimhäute oder systemisch) und dem Alter, mit welchem ein Erstkontakt mit dem Antigen erfolgte [16].

Die Polarisierung zu  $T_H2$ -Lymphozyten wird durch IL-4 eingeleitet, die Polarisierung zu  $T_H1$  von IL-12 (aus aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen).  $T_H2$  stellt die Immunantwort gegen extrazelluläre Pathogene (Würmer) dar,  $T_H1$ -Zellen richten sich gegen intrazelluläre Pathogene (Bakterien, Viren, Pilze) [10, 16-18]. Nach Ausbildung eines bestimmten  $T_H$ -Phänotyps kommt es nicht mehr zu einer Umwandlung in den anderen Phänotyp [16].  $T_H1$ -Zellen sind charakterisiert durch die Ausschüttung der Zytokine IL-2, TNF- $\beta$  und INF- $\gamma$  und führen dadurch zu einer zellulären Immunantwort, welche u. a. eine Aktivierung von Makrophagen beinhaltet [19]. Gleichzeitig wird eine  $T_H2$  Antwort durch die ausgeschütteten Zytokine inhibiert [16].  $T_H2$ -Zellen sind charakterisiert durch die Ausschüttung von IL-4, IL-5 und IL-13 und führen zu einer humoralen Immunantwort. Aktivierte  $T_H2$ -Zellen interagieren mit B-Zellen, welche daraufhin IgE Antikörper produzieren (Isotypwechsel der Antikörper von IgM zu IgE) [20, 21]. Die Ausreifung eosinophiler Granulozyten wird gefördert und eine Mastzellendegranulation ausgelöst [16-18].  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen befinden sich im gesunden Organismus in einem funktionellen Gleichgewicht. Dominiert einer der beiden Zelltypen, kann dies zu Autoimmunkrankheiten ( $T_H1$ -Dominanz) oder Krankheiten des atopischen Formenkreises ( $T_H2$ -Dominanz) führen [22, 23]. Entsprechend können  $T_H2$ -Zellen und deren Zytokine im Blut von Patienten mit Neurodermitis, allergischer Rhinitis oder allergischem Asthma nachgewiesen werden [24, 25]. Allerdings spiegelt eine erhöhte Anzahl an  $T_H2$ -Zellen vor allem den Atopiestatus und nicht so sehr eine akute Erkrankung wieder [26].



**Abbildung 1:** T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 Polarisierung

Die Grafik zeigt die Mechanismen, welche zu einer T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 Polarisierung führen. Findet die Antigenerkennung einer naiven T<sub>H</sub>-Zelle in Gegenwart von IL-12 statt, führt dies zu einer T<sub>H</sub>1 Polarisierung. IL-4 dagegen führt zu einer T<sub>H</sub>2 Polarisierung. T<sub>H</sub>1-Zellen produzieren Zytokine, welche Makrophagen aktivieren und zu einer Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ führen. T<sub>H</sub>2-Zytokine führen zu einer erhöhten IgE Produktion, einer Mastzelldegranulation und einer Aktivierung von eosinophilen Granulozyten.

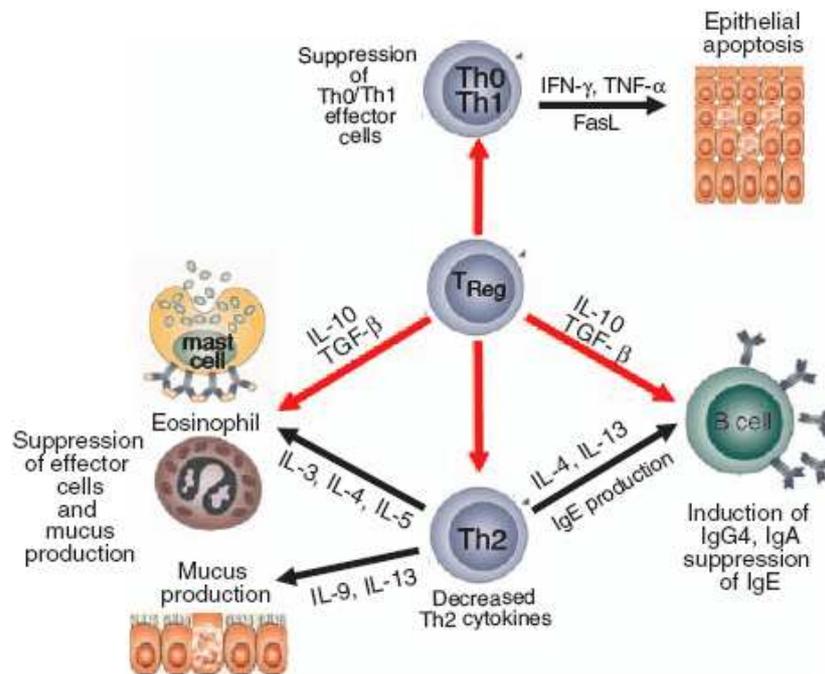
Grafik aus [18]

### 1.3.3. Regulatorische T-Zellen

Nur ca. 1% aller T-Zellen stellen regulatorische T-Zellen dar. Regulatorische T-Zellen greifen regulierend in das T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 Gleichgewicht ein [27]. Sie bestehen aus verschiedenen Untergruppen, dazu zählen natürliche regulatorische T-Zellen, Tr1 und T<sub>H</sub>3-Zellen [18]. Sie exprimieren inhibitorische Zytokine wie TGF-β, das antiinflammatorische Zytokin IL-10 und den Transkriptionsfaktor FOXP3 und unterdrücken überschießende Immunantworten [28]. Dadurch verhindern sie die Ausbildung von Autoimmunerkrankungen und inflammatorischen Krankheiten wie z. B. Asthma [29]. Eine Störung der regulatorischen T-Zellen, welche IL-10 produzieren, ist daher möglicherweise an der Entstehung von Allergien mitbeteiligt [26].

Der erste Hinweis darauf, dass T<sub>reg</sub>-Zellen möglicherweise eine Rolle bei allergischen Erkrankungen spielen, rührte von der Beobachtung her, dass Patienten mit dem IPEX Syndrom (IPEX= Immundysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-chromosomales Syndrom), welches auf Mutationen im FOXP3-Gen zurückzuführen ist, allergische Erkrankungen zeigten [30]. In nachfolgenden Studien wurde gezeigt, dass T<sub>reg</sub>-Zellen die Fähigkeit besitzen, die Produktion von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zytokinen zu unterdrücken und dass diese Fähigkeit der T<sub>reg</sub>-Zellen bei Atopikern besonders in der Pollensaison gestört ist [31-33]. So können T<sub>H</sub>2-Zellen, wenn sie von T<sub>reg</sub>-Zellen dominiert werden, kein IL-3, IL-4, IL-5 und IL-9 mehr produzieren, welche für die Differenzierung und

Aktivierung von Mastzellen, basophilen und eosinophilen Zellen benötigt werden [34]. Außerdem können  $T_{reg}$ -Zellen eine IgE Produktion verhindern [35]. Bei Kindern mit allergischen Erkrankungen konnten weniger zirkulierende  $T_{reg}$ -Zellen im Blut nachgewiesen werden als bei Kindern ohne Allergien [36]. Weiter wurde gezeigt, dass auch pulmonale regulatorische T-Zellen bei Asthma quantitativ und funktionell beeinträchtigt sind [37].



**Abbildung 2:** Einfluss von regulatorischen T-Zellen

Die Abbildung stellt den Einfluss von regulatorischen T-Zellen auf  $T_H1$ - und  $T_H2$ - Zellen und damit verbundene Auswirkungen auf das Immunsystem dar.

Grafik aus [34]

#### 1.3.4. Zytokine

Zytokine sind von Zellen gebildete einfache Polypeptide oder Glykoproteine, welche Signalstoffe für viele Zellen darstellen. Fast alle kernhaltigen Zellen bilden Zytokine. Sie sind wichtige Botenstoffe des Immunsystems. Von Lymphozyten gebildete Zytokine werden als Interleukine bezeichnet [10]. Des Weiteren zählen Interferone (IFN), koloniestimulierende Faktoren (CSF) und Tumornekrosefaktoren (TNF) zu den Zytokinen. Strukturell werden Zytokine in die Hämatopoetin-, TNF- und Chemokinfamilien eingeteilt. Zytokine entfalten ihre Wirkung durch Bindung an hochaffine und hochspezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche. Ein Großteil der Zytokinwirkung erklärt sich durch eine veränderte Genexpression bei der Zielzelle. Phänotypisch zeigt sich diese Wirkung in einer Erhöhung oder Erniedrigung der zellulären Proliferationsrate, einer unterschiedlichen Zelldifferenzierung und/oder einem Wechsel der Zellfunktion.

Die Zytokinproduktion im Körper beginnt schon vor der Geburt (ca. in der 22. Schwangerschaftswoche)[1]. Sie spielt eine entscheidende Rolle bei der Reifung des kindlichen Immunsystems zur Vorbereitung auf postnatale Antworten gegen Allergene und Pathogene [38].

Die wichtigsten Zytokine im Zusammenhang mit Allergien sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Zytokin	Herkunft	Funktion
IL-2	T-Zellen	T-Zellwachstumsfaktor
IL-4	T-Zellen, Mastzellen	B-Zell-Aktivierung (dadurch Steigerung der IgE Produktion); fördert Entwicklung zu T <sub>H</sub> 2-Zellen; hemmt T <sub>H</sub> 1-Zellen und Makrophagen
IL-5	T-Zellen, Mastzellen	Wachstum und Differenzierung eosinophiler Zellen
IL-6	T-Zellen, Makrophagen	B- und T-Zell-Aktivierung
IL-9	T-Zellen	Stimulation von Mastzellen und T <sub>H</sub> 2-Zellen
IL-10	T-Zellen, Makrophagen	Stimulation von Mastzellen und T <sub>H</sub> 2-Zellen
IL-12	B-Zellen, Makrophagen	NK-Zellen stimulierender Faktor; fördert Entwicklung zu T <sub>H</sub> 1-Zellen; hemmt T <sub>H</sub> 3-Zellen
IL-13	T-Zellen	B-Zell-Aktivierung; hemmt T <sub>H</sub> 1-Zellen
IFN- $\gamma$	NK- und T-Zellen	Aktivierung von Makrophagen; hemmt T <sub>H</sub> 2- und T <sub>H</sub> 3-Zellen

**Tabelle 1: Zytokine und ihre Funktionen**

[10, 16, 18]

IL-4 und IL-13 spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von allergischen Erkrankungen und atopischem Asthma. So wirkt IL-13 direkt auf die Atemwegsepithelzellen und bewirkt dort eine Hyperreaktivität und Überproduktion von Schleim [39]. Es konnte festgestellt werden, dass Polymorphismen in den IL-4 und IL-13 Genen das Asthmarisiko erhöhen [1].

IL-5 wirkt chemotaktisch auf eosinophile Granulozyten und verlängert deren Lebenszeit [24]. Außerdem kann IL-5 zu chronischen Atemwegsschäden führen [40].

Es wurde eine lokale Überproduktion von IL-4, IL-5 und IL-13 im Zusammenhang mit einer allergischen Entzündung festgestellt [41, 42].

IL-10 wird von einer Vielzahl von Zellen produziert und spielt eine entscheidende Rolle in der Unterdrückung von überschießenden Immunreaktionen im gesamten Immunsystem und bei der Entwicklung und Erhaltung von einer allergen-spezifischen Toleranz [26, 43]. Es unterdrückt eine Aktivierung von T-Zellen und eine IL-4 induzierte IgE Synthese [26]. Außerdem verhindert IL-10 allergische Entzündungsreaktionen und ein Überleben von eosinophilen Granulozyten [44]. Kortikosteroide erhöhen die IL-10 Produktion, wohingegen nach einer viralen Infektion bei allergischen Patienten erniedrigte IL-10 Spiegel gefunden werden konnten [26].

IL-12 wird von APCs produziert und fördert die Entwicklung von T<sub>H</sub>1 Antworten (u.a. Produktion von IFN- $\gamma$ ) [45]. In mehreren Studien konnte bei Atopikern eine erniedrigte IL-12 und IFN- $\gamma$  Produktion festgestellt werden [46-49].

In den letzten Jahren wurde noch eine Reihe an neueren Zytokinen identifiziert. Darunter die Zytokine der IL-17 Familie (IL-17 A-F) und IL-33, welche mit T<sub>H</sub>2-Zellaktivierung in Zusammenhang stehen [12, 50-52]. Auch IL-21 beeinflusst T<sub>H</sub>2-Zellen, allerdings scheint es deren Aktivierung zu regulieren [53]. Des Weiteren IL-31, welches wahrscheinlich den entscheidenden Mediator für die Ausbildung des Juckreizes bei atopischer Dermatitis darstellt [54].

Die Zytokinproduktion im Körper kann durch verschiedene Einflüsse verändert werden- dazu zählen Entwicklung oder Veränderung von Krankheiten, veränderte Rauchgewohnheiten und intensiver Sport [55].

## 1.4. Besonderheiten des kindlichen Immunsystems

In Neugeborenen liegt eine erhöhte Anzahl an T<sub>H</sub>2-Zellen vor. Dieser hohe T<sub>H</sub>2-Spiegel nach der Geburt ist möglicherweise auf T<sub>H</sub>2 fördernde Effekte mütterlicher Hormone zurückzuführen und stellt einen Schutz vor Plazenta toxischem IFN- $\gamma$  dar bzw. kann auf eine fehlende Ausreifung von T<sub>H</sub>1-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen zurückgeführt werden [26, 56]. Mikrobielle Stimuli - wie z.B. eine bakterielle Besiedlung des Darms - sind essentiell für eine postnatale Reifung der T<sub>H</sub>1-Zellen und führen somit zu der Ausbildung eines funktionellen Gleichgewichts zwischen T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen [57, 58]. Diese Entwicklung findet in den ersten 18 Lebensmonaten statt [9]. Bei Nichtatopikern findet während der ersten Lebensmonate eine Verschiebung zu einem T<sub>H</sub>1-Profil statt, wohingegen bei Atopikern dieses T<sub>H</sub>2-Zytokinprofil noch weiter verstärkt wird [59]. Einige Studien konnten zeigen, dass bei Neugeborenen starke T<sub>H</sub>2-Antworten (besonders eine erhöhte IL-13 Produktion) mit einem erhöhten Atopierisiko in späteren Jahren assoziiert sind [60, 61]. Andere Studien deuten darauf hin, dass nicht so sehr das T<sub>H</sub>2-Profil zum Zeitpunkt der Geburt, sondern eine Persistenz des T<sub>H</sub>2- Profils über die ersten Lebensmonate hinaus assoziiert ist mit nachfolgenden allergischen Erkrankungen [62].

In der Kindheit ist der Organismus besonders empfindlich gegenüber Einflüssen von außen [1, 63]. So besitzen Neugeborene noch ein unreifes Immunsystem und eine relativ durchlässige mukosale Grenzschicht und haben deshalb ein erhöhtes Risiko für allergische Sensibilisierung [64]. Das kritische Zeitfenster für die Entwicklung atopischer Erkrankungen scheint ungefähr im ersten Lebenshalbjahr zu liegen und auch pränatal [64, 65].

Außerdem ist bei der Entwicklung von Allergien eine gewisse zeitliche Reihenfolge zu beobachten. Zuerst findet eine Sensibilisierung gegenüber Nahrungsmittelallergenen statt (in Form einer atopischen Dermatitis), gefolgt von einer Sensibilisierung gegenüber inhalativen Allergenen, was schließlich zu einer Entwicklung von Asthma führen kann [9, 66]. Dieser typische zeitliche Ablauf wird als allergischer Marsch („allergic march, atopic march“) oder als Allergiekarriere bezeichnet [67-69].

Deshalb haben Kinder, die in frühen Jahren schon Allergien zeigen bzw. gegen bestimmte Allergene sensibilisiert sind und bei denen diese Sensibilisierung über längere Zeit nachgewiesen werden kann, ein erhöhtes Risiko später an Asthma zu erkranken [57, 66, 69]. Zeigen die Kinder neben Allergien auch noch keuchendes Atmen z. B. von viralen Infekten, ist das Asthmarisiko weiter erhöht [57]. Im ersten Lebensjahr ist die Inzidenz an atopischer Dermatitis am höchsten, Heuschnupfen kommt am häufigsten im Schulalter vor [1]. Während der Pubertät verlieren 80% der Patienten ihre Symptome [9].

## 1.5. Risikofaktoren für die Entwicklung allergischer Erkrankungen

### 1.5.1. Genetische Faktoren

Einen wesentlichen Risikofaktor für die Entstehung von Allergien stellt der genetische Hintergrund einer Person dar [1, 2]. Es sind erst wenige relevante Gene für allergische Krankheiten identifiziert worden, jedoch zeichnet sich ab, dass nicht ein einzelnes Gen verantwortlich ist für die Entstehung allergischer Krankheiten, sondern dass es sich um ein komplexes Zusammenspiel handelt [70]. Außerdem scheinen sich die genetischen Faktoren, welche für Asthma bestimmend sind, von denen für Atopie zu unterscheiden [71]. Die Zunahme an Allergien kann jedoch kaum durch genetische Faktoren erklärt werden, da die Mutationsrate niedrig ist [16].

### 1.5.2. Die Hygienehypothese

Ein Erklärungsmodell für die Allergiezunahme stellt die Hygienehypothese dar [18]. Die Hygienehypothese wurde 1989 von Strachan entwickelt und beruht auf der Beobachtung, dass ein Zusammenhang besteht zwischen Heuschnupfen und der Anzahl an älteren Geschwistern eines Kindes [64, 72]. Die Hygienehypothese besagt, dass der unhygienische Kontakt zu älteren Geschwistern einen schützenden Effekt vor Allergien hat bzw. dass auch schon vor der Geburt Infektionen der Mutter, die sich bei älteren Geschwistern des Kindes infiziert hat, vor Allergien schützen [1, 73-75]. Mit erhöhten sanitären Bedingungen nimmt die Zahl an Allergien zu [76, 77].

Allerdings können Infektionen auch Asthma (oder Allergien) auslösen; hier spielt sowohl der Zeitpunkt eine entscheidende Rolle als auch die Menge und Art des Krankheitserregers [1, 16]. So scheinen Infektionen mit Hepatitis A, Toxoplasma gondi, Helicobacter pylori, Mycobacterium tuberculosis, Herpesviren oder Schnupfenviren das Asthmarisiko zu senken [1, 16, 58]. Clostridium difficile und Yersinia enterocolitica stellen dagegen ein Risiko dar [58]. Außerdem spielt wahrscheinlich das individuelle Allergierisiko eine Rolle - so können Infektionen bei Personen mit niedrigem Allergierisiko schützend wirken, bei anderen nicht [58].

Auch Parasiten- und Würmerbefall ist assoziiert mit einem erniedrigten Allergierisiko [78]. Ein Schutz vor Asthma konnte jedoch nur festgestellt werden, wenn es sich um einen massiven Befall handelte [58]. In westlichen Ländern spielt dies sicherlich nur eine untergeordnete Rolle. Der Grund hierfür scheint zu sein, dass ein vermehrtes Vorkommen von chronischen Infektionen mit Parasiten und Würmern in Entwicklungsländern eine anhaltende Anregung des Immunsystems darstellt. Dies führt wohl zum Aufbau eines robusten regulatorischen Netzwerks im Immunsystem und damit zur Kontrolle von allergischen Krankheiten [78].

Eine große Anzahl älterer Geschwister oder ein Aufenthalt in einem Hort sind umgekehrt assoziiert mit Heuschnupfen und allergischer Sensibilisierung, der Einfluss auf Asthma ist jedoch weitgehend unklar [1, 58]. So senkt ein Hortaufenthalt das Asthmarisiko nur, wenn die Mutter auch kein Asthma hatte [58]. Auch ist unklar, ob die Hygienehypothese auch für atopische Dermatitis zutrifft [79].

Es werden zwei mögliche Gründe für die Hygienehypothese spekuliert: Zum einen, dass es durch eine geringere Zahl an Infektionen zu einem Ausbleiben der  $T_H1$ -Verschiebung kommt, zum anderen, dass dies zu einer verminderten Suppression des Immunsystems durch  $T_{reg}$  führt [18]. Jedoch ist eine einzelne Infektion nicht ausreichend, um eine starke Verschiebung zugunsten  $T_H1$  auszulösen, welche vor Allergien schützen könnte [16]. Die Hygienehypothese ist auch nicht die einzige Erklärung für die Allergie- und Asthmaentwicklung [58].

Ein weiterer Punkt ist, dass bei Bauernkindern ein geringeres Risiko besteht, an Heuschnupfen und Asthma zu erkranken [80]. Im Rahmen der ALEX-Studie (ALEX= Allergy and Endotoxin), welche die Faktoren untersuchte, die zu unterschiedlichen Endotoxinkonzentrationen bei Bauern und Nichtbauernfamilien führen, wurde herausgefunden, dass der langfristige und frühzeitige Aufenthalt in Ställen und der Genuss von unpasteurisierter Kuhmilch umgekehrt assoziiert ist mit der Entwicklung von Asthma, Heuschnupfen oder atopischer Sensibilisierung [81, 82]. Der Zeitpunkt der Exposition spielte dabei eine entscheidende Rolle; so war der Effekt am stärksten, wenn die Exposition im ersten Lebensjahr auftrat [81, 83]. Interessanterweise konnte man auch einen klaren mütterlichen Einfluss erkennen, da der Aufenthalt der Mütter während der Schwangerschaft einen protektiven Effekt auf die Kinder hatte [81]. Eine Kindheit auf einem Bauernhof schützt allerdings nicht vor atopischer Dermatitis [1]. Asthma und atopische Dermatitis scheinen demnach unterschiedliche Risikofaktoren zu haben [1]. Alm konnte 1999 als

erster zeigen, dass auch Kinder aus Familien mit anthroposophischen Lebensstil seltener Atopien aufwiesen [84]. Im Rahmen der PARSIFAL-Studie (PARSIFAL= Prevention of allergy risk factors for sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle), welche Bauern- und Rudolf-Steiner-Schulkinder in fünf verschiedenen europäischen Ländern im Vergleich zu entsprechenden Referenzkindern untersuchte, wurde herausgefunden, dass im Hausstaub von Bauernkindern und Rudolf-Steiner-Schulkindern vermehrt bakterielles Endotoxin (= LPS, Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien), Schimmelpilzglukane und EPS (extrazelluläres Polysaccharid von Pilzen) gefunden wurde [85-87]. Diese Kinder litten seltener an Allergien als andere Kinder. Hohe Endotoxinspiegel schützen vor Heuschnupfen und atopischem Asthma, aber nicht vor nicht-atopischem Asthma; dagegen schützt ein Leben auf dem Bauernhof vor beiden Asthmaarten [71]. Kinder, die auf einem Bauernhof aufwachsen, haben auch einen verstärkten Kontakt zu Tieren. Der Besitz von Haustieren hat wahrscheinlich auch einen schützenden Effekt; so senkt der verstärkte Kontakt zu Hunden die Wahrscheinlichkeit, an Asthma oder Heuschnupfen zu leiden [27, 88]. Allerdings ist wohl der Zeitpunkt des Erstkontaktes mit Haustieren entscheidend [27].

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass durch Inhalation eines mit Kochsalzlösung gewonnenen Stallstaubextraktes eine Allergen induzierte Atemwegsentzündung verhindert werden kann [89].

### 1.5.3. Weitere Faktoren

Weitere Risikofaktoren für die Entwicklung von Allergien und Asthma stellen Adipositas (besonders bei dem weiblichen Geschlecht), Rauchen, ein niedriges Geburtsgewicht und ein hohes Kfz-Verkehrsaufkommen in der Nähe der Wohnung dar [90-93]. Auch die Ernährung der Mutter in der Schwangerschaft spielt eine große Rolle. So scheint der Konsum von Bauernhofmilch einen protektiven Effekt gegenüber Asthma und Allergien zu haben [94]. Auch schützt der Genuss von Fisch, Vitamin D, Antioxidantien und Probiotika möglicherweise vor Allergien. In einer finnischen Studie von Kalliomäki wurde herausgefunden, dass der Konsum von *Lactobacillus rhamnosus* GG am Ende der Schwangerschaft und in den ersten sechs Wochen nach der Geburt das Risiko für atopische Dermatitis um 50% senkt [95]. Der schützende Effekt von Probiotika zeigt sich allerdings nur bei atopischem Ekzem und bleibt umstritten, weil andere Studien mit unterschiedlichen Probiotika diesen Effekt nicht zeigen konnten [58]. Auch eine Atopie der Eltern ist von wesentlicher Bedeutung. Eine Atopie der Mutter ist ein größerer Risikofaktor als eine Atopie des Vaters. Hierfür mögen Einflüsse *in utero* ein Grund sein [1].

Impfungen und Antibiotikagebrauch in frühen Lebensjahren haben dagegen, entgegen früheren Vermutungen, keinen Einfluss auf Asthma [58, 96].

## 2. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, inwieweit sich die Zytokinexpression im Blut einjähriger Kinder aus Bauernfamilien bzw. Nichtbauernfamilien, welche in der gleichen Gegend in Deutschland leben, unterscheidet. Im Nebenschritt sollte untersucht werden, welchen Einfluss eine Exposition gegenüber Mikroorganismen und Allergenen auf das Allergierisiko hat. Hierbei sollte festgestellt werden, welchen Einfluss bestimmte Tätigkeiten der Mütter während der Schwangerschaft haben und inwiefern die Exposition der Kinder gegenüber diesen Faktoren im ersten Lebensjahr eine Rolle spielt.

Im Detail ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Haben einjährige Bauernkinder gegenüber Nichtbauernkindern in peripherem Blut unterschiedliche Zytokinexpressionsmuster nach Stimulation mit P/I, LPS oder SEB? Falls ja, welche Zytokine sind im Einzelnen unterschiedlich exprimiert?
2. Inwieweit ergeben sich Unterschiede durch die verwendeten Stimulanzen?
3. Haben unterschiedliche Tätigkeiten der Bäuerinnen auf dem Hof und im Stall Einfluss auf den Zytokinstatus der Kinder?
4. Inwieweit trägt die Beschaffenheit des Bauernhofs (Größe, Art der Tiere usw.) zu diesen Unterschieden bei?
5. Wie beeinflusst eine Exposition der Kinder im ersten Lebensjahr gegenüber Mikroorganismen und Allergenen die Zytokinexpression?
6. Haben Einflüsse *in utero* oder nach der Geburt einen größeren Effekt auf die Zytokine?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Studiendesign

Diese Arbeit wurde im Rahmen der PASTURE- Studie (PASTURE= „Protection against Allergy: A Study in Rural Environments“) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine prospektive longitudinale Studie, welche in ländlichen Gegenden von fünf europäischen Ländern durchgeführt wurde. Bei den Ländern handelt es sich um Deutschland (Oberbayern), Schweiz (östlicher Teil), Österreich (Raum Salzburg), Finnland (Kuopio) und Frankreich (Besançon).

Ziel der Studie war es, die Rolle von erhöhter Exposition mit mikrobiellen Produkten auf die Entwicklung von kindlichen Allergien zu untersuchen. Außerdem sollten Faktoren identifiziert werden, welche den protektiven Effekt des Bauernhofs vor allergischen Erkrankungen ausmachen. Des Weiteren wurden auch immunologische und genetische Mechanismen untersucht, die hierbei involviert sind.

Hierfür wurden schwangere Frauen, welche aus Bauern- bzw. Nichtbauernfamilien stammen, im letzten Trimenon ihrer Schwangerschaft rekrutiert (zwischen August 2002 und März 2005). Mittels Fragebögen wurden Lebensstilfaktoren dieser Frauen erfasst. Bei der Geburt wurde Nabelschnurblut gesammelt, um u.a. den T- Zelleffektorstatus der Kinder zu ermitteln, sowie DNA zu extrahieren und diese auf Polymorphismen in Genen zu untersuchen, welche zur Erkennung von mikrobiellen Produkten dienen. Zusätzlich wurde die Expression dieser Gene untersucht. Außerdem wurde Blut von den Müttern und Vätern abgenommen, um DNA zu extrahieren bzw. den Atopiestatus der Mütter zu bestimmen. Im zweiten Lebensmonat der Kinder fand ein Hausbesuch statt, bei dem sowohl eine Befragung der Mütter als auch eine Probennahme von Staub an verschiedenen Orten im Haus durchgeführt wurde. Gleichzeitig wurden auch Milchproben gesammelt. Anschließend wurde bis zum ersten Lebensjahr ein detailliertes Tagebuch über die Kinder geführt. An ihrem ersten Geburtstag wurde noch einmal Blut von den Kindern abgenommen.

Das Studiendesign wurde von den fünf lokalen Ethikkomitees für Studien an Menschen gebilligt.

PASTURE wurde von der Europäischen Union finanziert. Studienkoordinatorin war Prof. Dr. Erika von Mutius, Dr. von Haunersches Kinderspital, München. Partner des Projektes waren: Prof. Dr. Charlotte Braun-Fahländer (Institut für Sozial- und Präventivmedizin, Basel), Prof. Juha Pekkanen, M.D., Ph.D. (Unit of Environmental Epidemiology, National Public Health Institut, Kuopio), Prof. Dr. Joseph Riedler (Kinderspital der LKA, Salzburg), sowie Jeroen Douwes Ph.D. (Utrecht), PD Dr. Roger Lauener (Zürich), PD Dr. Udo Herz (Marburg) und PD Dr. Michael Kabesch (München).

##### 3.1.1. Pilotstudie

In Deutschland lief die Studie unter dem Namen LUKAS (=“ländliche Umgebung und Kinder: Allergiestudie“). Um geeignete Krankenhäuser zu finden, in denen die Frauen rekrutiert werden sollten, wurde zunächst eine Pilotstudie durchgeführt. Hierbei wurden 55 Krankenhäuser in Südbayern kontaktiert und diejenigen ausgewählt, welche eine ausreichende Anzahl an Geburten von Bäuerinnen aufwiesen. In den verbleibenden sieben Krankenhäusern wurde sechs Wochen lang eine Pilotstudie durchgeführt, bei der die Mitarbeit der Hebammen und die tatsächliche Anzahl an Geburten von Bäuerinnen getestet wurden. Nach dieser Pilotstudie wurden die Krankenhäuser von Peißenberg, Penzberg, Bad Tölz und Wolfratshausen für die Studie ausgewählt.

### 3.1.2. Aufgabenverteilung

In Deutschland wurden die Aufgaben wie folgt verteilt: Krankenschwestern oder Ärztinnen nahmen das Blut bei den Kindern bzw. Eltern in den Krankenhäusern ab. Von dort wurden die Blutproben von den Feldarbeitern in das Dr. von Haunersche Kinderspital, München transportiert. Dort war ich in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Susanne Krauss-Etschmann verantwortlich für die Gewinnung von Serum für die IgE-Bestimmung, für den Stimulationsansatz zur späteren Zytokin-Bestimmung sowie für das Blutbild zur Bestimmung der Leukozytenzahl. Staub-, Stuhl-, Kuh- und Muttermilchproben der rekrutierten Familien wurden bis zur weiteren Bearbeitung in anderen Zentren zwischengelagert.

In der Arbeitsgruppe von PD Dr. Michael Kabesch im Dr.von Haunerschen Kinderspital in München wurden DNA-Analysen durchgeführt.

In Marburg am Klinikum der Philipps-Universität wurde die Zytokine im Blut und das IgE im Serum unter Leitung von Prof. Dr. Harald Renz und PD Dr. Udo Herz bestimmt. Die Dateneingabe fand an der Universität von Ulm, Institut für Epidemiologie, unter der Leitung von Prof. Dr. Stephan Weiland statt.

### 3.2. Studienpopulation

In jedem der teilnehmenden Zentren bestand die Studienpopulation aus einer Kohorte von ca. 200 Schwangeren, davon jeweils die Hälfte aus Bauern- und aus Nichtbauernfamilien. Als Bauernfamilie wurde jede Familie definiert, die auf einem Bauernhof lebt, auf dem irgendeine Art von Vieh gehalten wird. Dabei wurde zwischen Voll- und Teilzeitbauern unterschieden. Familien von reinen Getreidebauernhöfen wurden nicht als Bauernfamilien definiert, um nicht zu heterogene Daten zu bekommen.

Als „Nichtbauernfamilien“ wurden Familien definiert, die in der gleichen Gegend leben wie die Bauernfamilien und bei denen die Frauen im gleichen Krankenhaus rekrutiert wurden. Frauen aus Städten mit mehr als 30 000 Einwohnern oder aus Industriestandorten wurden ausgeschlossen.

Allgemeine Ausschlusskriterien waren Frauen unter 18 Jahren; Zwillingsschwangerschaften; Geschwister von Kindern, die bereits an der Studie teilnahmen; geplanter Umzug außerhalb des Studiengebietes; Familien ohne Telefon oder mit mangelnden Kenntnissen der deutschen Sprache; Familien, in denen ein Elternteil täglich zur Arbeit in eine große Stadt pendelt.

Ausschlusskriterien nach der Geburt waren Frühgeburten vor der 37. Schwangerschaftswoche und schwerwiegende genetische Erkrankungen der Kinder.

Die Rekrutierung fand in Schwangerschaftskursen und durch Hebammen in den Kliniken statt. Jede Schwangere wurde über die Studie informiert und gebeten, einen kurzen demographischen Fragebogen auszufüllen. Bei Erfüllung der Einschlusskriterien wurde von jeder teilnehmenden Familie eine Einverständniserklärung unterschrieben.

### 3.3. Materialgewinnung

#### 3.3.1. Blutentnahme

Falls die Eltern ihre Einwilligung zur Studienteilnahme gegeben hatten, wurde bei der 1-Jahresuntersuchung der Kinder ca. 12 ml Blut abgenommen und wie folgt verteilt: Ca. 2,5 ml Lithium-Heparinblut für die Zytokinmessung, 2,5 ml EDTA-Blut für das Differential-

Blutbild, ca. 4 ml zur Serumgewinnung für die IgE-Bestimmung, 2,5 ml in ein PAXgene Röhrchen für Genexpressionsuntersuchungen. Die Blutabnahme erfolgte nach festgelegter Rangfolge, wobei der Stimulationsansatz die höchste Priorität besaß. Die Regelung war nötig, da nicht immer ausreichend Blut gewonnen werden konnte, um alle Bestimmungen durchzuführen.

Das Lithium-Heparinblut für die Zytokinmessung wurde innerhalb von 24h nach Blutabnahme weiterverarbeitet, wobei das genaue Zeitintervall bis zum Beginn der Verarbeitung dokumentiert wurde. Das Serum wurde bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

Ebenso wurde von den Vätern und von den Müttern, wenn dies nicht schon bei der Geburt erfolgt war, ca. 15 ml Blut abgenommen: Ca. 2,5 ml EDTA-Blut für DNA-Analysen, ca. 2,5 ml in ein PAXgene Röhrchen für Genexpressionsuntersuchungen und Serum zur IgE-Bestimmung.

### 3.3.2. Fragebögen

Die Fragebögen basieren auf Fragen, welche bei der International Study of Allergy and Asthma in childhood (ISAAC), der Allergy and Endotoxin (ALEX) Studie, der PARSIFAL (Prevention of Allergy – Risk factors for Sensitization in children related to farming and anthroposophic) Studie verwendet wurden [81, 86, 97]. Außerdem wurden auch Fragen aus dem Fragebogen der American Thoracic Society (ATS) miteingeschlossen, um Atemwegsbeschwerden der Eltern zu erfassen [98]. Es gab vier verschiedene Fragebögen. Vor der Geburt wurde ein Interview durchgeführt, bei dem Lebensstilfaktoren und Krankheiten der Mütter sowie Kontakt zu Bauernhöfen während der Schwangerschaft abgefragt wurden. Im zweiten Lebensmonat der Kinder fand ein weiteres Interview statt, das Krankheiten der Kinder, ihre Ernährung und Kontakt zu Bauernhöfen, Tieren oder anderen Kindern beinhaltete. Außerdem gab es einen Fragebogen für die Väter, der an die Familien verschickt wurde, von den Vätern selbstständig ausgefüllt und später von Feldarbeiterinnen eingesammelt wurde. Im Alter der Kinder von 1 Jahr fand ein weiteres Interview statt, bei dem unter anderem atopische Erkrankungen der Kinder abgeklärt wurden.

Im Detail weisen die Fragebögen folgende Inhalte auf:

a) Fragebogen während der Schwangerschaft

Allgemeine Fragen zu den Müttern (z.B. Geburtsdatum, Größe, Gewicht)

Voraussichtliches Entbindungsdatum

Ausführliche Fragen zu Allergien und Atemwegserkrankungen der Mütter (z.B. Asthma, Heuschnupfen, Ekzem, Husten, Giemen, Atemwegserkrankungen in der Kindheit der Mütter)

Fragen zu Allergien bei den Eltern der Mütter bzw. bei weiteren Kindern der Mütter Krankheiten während der Schwangerschaft

Fragen zum Leben auf dem Bauernhof bzw. bei Nichtbauernfamilien Abklärung, ob die Mütter Kontakt zu Bauernhöfen haben oder in ihrer Kindheit hatten

Fragen bezüglich Impfungen, Haustiere, Rauchen, Ernährung

Auszüge aus dem Schwangerschaftsfragebogen sind im Anhang aufgeführt.

- b) Fragebogen im zweiten Lebensmonats der Kinder  
 Allgemeine Fragen bezüglich Gewicht, Größe, Kopfumfang der Kinder  
 Fragen zu Krankheiten der Mütter während der Schwangerschaft und während der ersten zwei Lebensmonate der Kinder  
 Fragen zu Krankheiten der Kinder  
 Fragen bezüglich Stillen  
 Fragen zum Leben auf dem Bauernhof bzw. bei Nichtbauernfamilien Abklärung, ob die Kinder Kontakt zu Bauernhöfen haben  
 Fragen bezüglich Kontakt zu anderen Kindern und Haustieren  
 Fragen zum Haus (Größe, Heizung, Feuchtigkeit usw.)
- c) Fragebogen der Väter  
 Ausführliche Fragen zu Allergien und Atemwegserkrankungen der Väter  
 Fragen zu Allergien bei den Eltern der Väter  
 Fragen zum Leben auf dem Bauernhof bzw. bei Nichtbauernfamilien Abklärung, ob die Väter Kontakt zu Bauernhöfen haben oder in ihrer Kindheit hatten  
 Fragen bezüglich Rauchen
- d) Fragebogen im ersten Lebensjahr der Kinder  
 Fragen zu Krankheiten der Kinder (besonders im Hinblick auf Asthma und Allergien)  
 Fragen zu Stillen und Ernährung der Kinder  
 Fragen zur landwirtschaftlichen Umgebung  
 Fragen zum Stallaufenthalt der Kinder  
 Fragen zu den Lebensumständen der Kinder  
 Fragen zu Haustieren  
 Fragen bezüglich Rauchen und Allergenvermeidung

Auszüge aus dem 1-Jahresfragebogen sind im Anhang aufgeführt.

### 3.3.3. Tagebücher

Zwischen dem zweiten und zwölften Lebensmonats der Kinder wurden die Eltern gebeten, wöchentlich ein Tagebuch zu führen. Darin wurde über die Gesundheit der Kinder, ihr Kontakt mit Stall, Tieren und anderen Kindern sowie ihre Ernährung berichtet.

## 3.4. Methoden

### 3.4.1. Stimulationsansatz

Zur Stimulation wurde Lithium-Heparin-Blut verwendet, das innerhalb von 24 h nach Abnahme verarbeitet werden musste. Während des gesamten Transports wurde das Blut bei ca. 4°C gekühlt. Im Labor wurden 2,5 ml Blut mit 7,5 ml Medium (1:4) verdünnt. Der Stimulationsansatz erfolgte in einer 24-well-Platte. Hierfür wurden in die wells der Spalten 2 bis 5 zunächst je 500 µl Medium gegeben. In die wells der Spalten 1 und 6 wurden je 1000 µl PBS pipettiert, um annähernd gleiche Bedingungen für alle wells zu schaffen. In die mit Medium gefüllten wells kamen nun die Stimulanzen nach unten aufgeführtem Schema dazu (s. Tabelle 2). Die Stammlösungen der Stimulanzen wurden zentral in

Marburg hergestellt und aliquotiert, um Schwankungen zu vermeiden. Von PMA wurde eine Stammlösung von 10 mg/ml in DMSO (entspricht einer Endkonzentration von 5 ng/ml Medium), von Ionomycin eine Stammlösung von 1 mg/ml in DMSO (entspricht einer Endkonzentration von 1 µg/ml Medium), von LPS eine Stammlösung von 1 mg/ml in DMSO (entspricht einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml Medium) und von SEB eine Stammlösung von 250 µg/ml in Medium (entspricht einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml Medium) verwendet. Hierbei stellt P/I generell einen sehr starken Stimulus dar, LPS simuliert gramnegative Bakterien und SEB grampositive Bakterien.

Anschließend wurden je 500 µl des vorher verdünnten Blutes hinzu gegeben. Wenn weniger als 2,5 ml unverdünntes Blut vorlagen, wurde dabei wie folgt vorgegangen: Zunächst wurden die Reihen 2 und 3 befüllt, angefangen mit Medium, dann LPS, SEB und zuletzt P/I. Nur wenn dann noch genügend Blut zur Verfügung stand, wurden die Duplikate in den Reihen 1 und 4 nach gleichem Schema angelegt. Anschließend wurden die Platten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-befeuchteter Raumluft inkubiert. Nach 24 h wurden die Überstände der Reihen 1 und 2, nach 48 h die der Reihen 3 und 4 abgenommen.

Dazu wurden die Überstände der einzelnen wells in Eppendorf-Tubes mit Hilfe einer Pipette abgenommen und bei 5000 rpm 3 Minuten zentrifugiert. Die Überstände hiervon wurden wiederum vorsichtig abgenommen und in Eppendorf-Tubes gegeben, die entsprechend gekennzeichnet wurden. Diese wurden bei -18° C bis zum Versand nach Marburg gelagert.

	Spalte 1	Spalte 2	Spalte 3	Spalte 4	Spalte 5	Spalte 6
Reihe 1	1000 µl PBS	500 µl Medium + 500 µl verdünntes Blut	500 µl Medium + 500 µl verdünntes Blut + 10 µl LPS	500 µl Medium + 500 µl verdünntes Blut + 10 µl P + 5 µl I	500 µl Medium + 500 µl verdünntes Blut + 4 µl SEB	1000 µl PBS
Reihe 2	1000 µl PBS	500 µl Medium + 500 µl verdünntes Blut	500 µl Medium + 500 µl verdünntes Blut + 10 µl LPS	500 µl Medium + 500 µl verdünntes Blut + 10 µl P + 5 µl I	500 µl Medium + 500 µl verdünntes Blut + 4 µl SEB	1000 µl PBS
Reihe 3	1000 µl PBS	500 µl Medium + 500 µl verdünntes Blut	500 µl Medium + 500 µl verdünntes Blut + 10 µl LPS	500 µl Medium + 500 µl verdünntes Blut + 10 µl P + 5 µl I	500 µl Medium + 500 µl verdünntes Blut + 4 µl SEB	1000 µl PBS
Reihe 4	1000 µl PBS	500 µl Medium + 500 µl verdünntes Blut	500 µl Medium + 500 µl verdünntes Blut + 10 µl LPS	500 µl Medium + 500 µl verdünntes Blut + 10 µl P + 5 µl I	500 µl Medium + 500 µl verdünntes Blut + 4 µl SEB	1000 µl PBS

**Tabelle 2: Zytokinstimulationsansatz**

### 3.4.2. Differenziertes Blutbild

Um die späteren Zytokinerggebnisse untereinander vergleichen zu können, musste ein differenziertes Blutbild erstellt werden. Hier wurde der prozentuale Anteil der Leukozyten/Lymphozyten ermittelt. Die Zytokinerggebnisse wurden immer auf den Leukozytenwert bezogen.

Für das Blutbild wurde Blut in einem EDTA-Röhrchen abgenommen und musste innerhalb von 24 h analysiert werden. Die Erstellung des differenzierten Blutbildes erfolgte mit einem Sysmex XT- 1800i im Labor der Dr. von Haunerschen Kinderklinik.

### 3.4.3. ELISA

Die quantitative Bestimmung der Zytokine erfolgte mittels ELISA. Die Bestimmung wurde in Marburg im Labor von Prof. Renz durchgeführt. Hierbei wurden Opteia ELISA kits (BD, Heidelberg) und 384 well Platten (Nunc) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet - bis auf ein reduziertes Reaktionsvolumen (50µl) und einen höher konzentrierten ersten Standard von 1000 pg/ml. Jede Probe wurde unverdünnt und in einer 1:20 Verdünnung gemessen, höher konzentrierte Proben zusätzlich noch in einer 1:40 Verdünnung. Folgende Zytokine wurden untersucht: IL-5 als charakteristisches T<sub>H</sub>2 Zytokin, IFN-γ als charakteristisches T<sub>H</sub>1- Zytokin, IL-10 als Zytokin der regulatorischen T-Zellen, TNF-α, welches für eine generelle inflammatorische Immunität steht und IL-12, welches im Körper eine T<sub>H</sub>1 Entwicklung einleitet. Die Sensitivitäten waren folgende: 10pg/ml für IFN-γ, 7,7 pg/ml für TNF-α, 8 pg/ml für IL-5, 7,2 pg/ml für IL-12 und 11,4 pg/ml für IL-10. Die Mediumwerte wurden immer Null gesetzt, es sei denn, sie wiesen einen abnormal hohen Wert auf, dann wurden sie aus den Messungen ausgeschlossen. Die Abweichungen innerhalb derselben Probe waren zwischen 1,2% und 5,2% (Variationskoeffizient) für drei verschiedene Verdünnungen.

### 3.4.4. Statistische Auswertung

Für die Deskription ordinaler Charakteristika der Studienpopulation sind der Median und die Spannweite angegeben. Für kategoriale Charakteristika der Studienpopulation und potentieller confounder wurden jeweils die Prozentzahlen berechnet und die Unterschiede wurden mittels des Pearson Chi Quadratstest ( $\chi^2$ ) bestimmt.

Die Auswertung der Zytokindaten erfolgte auf verschiedene Arten.

In einem ersten Schritt wurden die Zytokinwerte als stetige Daten ausgewertet.

Hierbei sind der Median und die 25. bzw. 75. Perzentile aufgeführt. Die Zytokinwerte wurden mit Hilfe des Kolmogorov- Smirnov Tests auf Normalverteilung untersucht. Da keine Normalverteilung vorlag, wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U- Test (MWU) für unverbundene Stichproben angewendet.

Als zweites erfolgte eine Einteilung der Zytokindaten in drei Kategorien: Kategorie 0: Zytokinwert = 0, Kategorie 1: Zytokinwert ≤ Median (ohne Nullwerte), Kategorie 2: Zytokinwert > Median (ohne Nullwerte). Es wurden jeweils die Prozentzahlen berechnet und die Unterschiede wurden mittels des Pearson Chi Quadratstest ( $\chi^2$ ) bestimmt. Hierbei wurden sowohl der p-Wert über alle drei Kategorien als auch der p-Wert über Kategorie 1 und 2 angegeben. Um den linearen Zusammenhang dieser kategorialen Zytokindaten genauer zu beschreiben, wurde der Mantel-Haenszel-Test angewendet.

Als drittes erfolgte eine Unterteilung in zwei Kategorien: Kategorie 0: Zytokinwert =0 und Kategorie 1: Zytokinwert >0. Auch hier wurden jeweils die Prozentzahlen berechnet und

die Unterschiede mittels des Pearson Chi Quadratstest ( $\chi^2$ ) bestimmt. Diese Unterteilung in zwei Kategorien wurde auch für die Erstellung einer logistischen Regressionsanalyse angewendet. Hierbei wurden Odds ratio (OR) mit 95% Konfidenzintervall (KI) berechnet. Als mögliche confounder wurden Alter, Body Mass Index, Anzahl der Geschwister, Bauernhofmilchkonsum in der Schwangerschaft, Asthma, allergischer Schnupfen, Hautausschlag, Neurodermitis, Allergie während der Schwangerschaft, Rauchen, Haustiere und Schulabschluss (jeweils von den Müttern) und Husten ohne Erkältung, pfeifender Atem ohne Erkältung, Hautausschlag, Diagnose Bronchitis, Diagnose Asthma, Diagnose Neurodermitis, Diagnose Lungenentzündung, Diagnose Pseudokrapp, Nahrungsmittelunverträglichkeit, Konsum von unabgekochter bzw. abgekochter Bauernhofmilch, Vorzugsmilch, pasteurisierter Milch, H-Milch und Milchkpulver (jeweils von den Kindern) betrachtet. Es wurde allerdings nur auf diese confounder adjustiert, wenn es sich nach beidseitiger Prüfung mittels  $\chi^2$  Test um einen potentiellen confounder mit  $p < 0,06$  handelte.

Bei Vorliegen von Fallzahlen  $< 5$  wurde der exakte Test nach Fisher angewendet.

Das Signifikanzniveau wurde bei 0,05 festgelegt. Als auffälliges, aber nicht signifikantes Ergebnis wurde  $p < 0,1$  angesehen.

Für die elektronische Berechnung wurde das Programm SPSS 14.0 (SPSS Inc.) verwendet. Tabellen und Diagramme wurden mittels Excel 97 (Microsoft) erstellt.

### 3.5. Verbrauchsmaterial und Geräte

#### 3.5.1. Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
Lamiarflow Laminair HBB 2472	Heraeus Instruments, Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Inkubator BB6060	Heraeus Instruments, Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
Tischzentrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultrazentrifuge Rotanta 460R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Blood counter: XT-1800i Haematology Analyser	Sysmex America, Inc. Mundelein, USA
Pipetten research (0-2 $\mu$ l, 2-20 $\mu$ l, 10-100 $\mu$ l, 100-1000 $\mu$ l)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
+4°C Kühlschrank	Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
-20°C Gefrierschrank	Siemens, München, Deutschland
-80°C Gefrierschrank	Kendro, Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
Personal Computer (PC)	Toshiba
Windows XP	Microsoft
SPSS 14.0 für Windows	SPSS Inc.
Reference Manager	Thomson ResearchSoft

### 3.5.2. Verbrauchsmaterial

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Firma</b>
Lamiarflow Laminair HBB 2472	Heraeus Instruments, Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Probenröhrchen Cellstar, 50 ml,	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einmalpipetten, 10ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

### 3.5.3. Reagenzien

<b>Reagenzien</b>		<b>Firma</b>
<u>Kulturmedium:</u>	RPMI mit 20% inaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS) mit Antibiotika/Antimykotika (100x)	Gibco, Karlsruhe PAA, Cölbe  Gibco, Karlsruhe
<u>Stimulanzen:</u>	PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat)  Ionomycin  LPS (Lipopolysaccharide von E. coli)    SEB (Staphylokokken enterotoxin B)	Sigma, Deisenhofen  Sigma, Deisenhofen  Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Otto Holst, Forschungszentrum BorstelS  Sigma, Deisenhofen
<u>Lösungen:</u>	PBS: 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH auf 7,3 eingestellt	

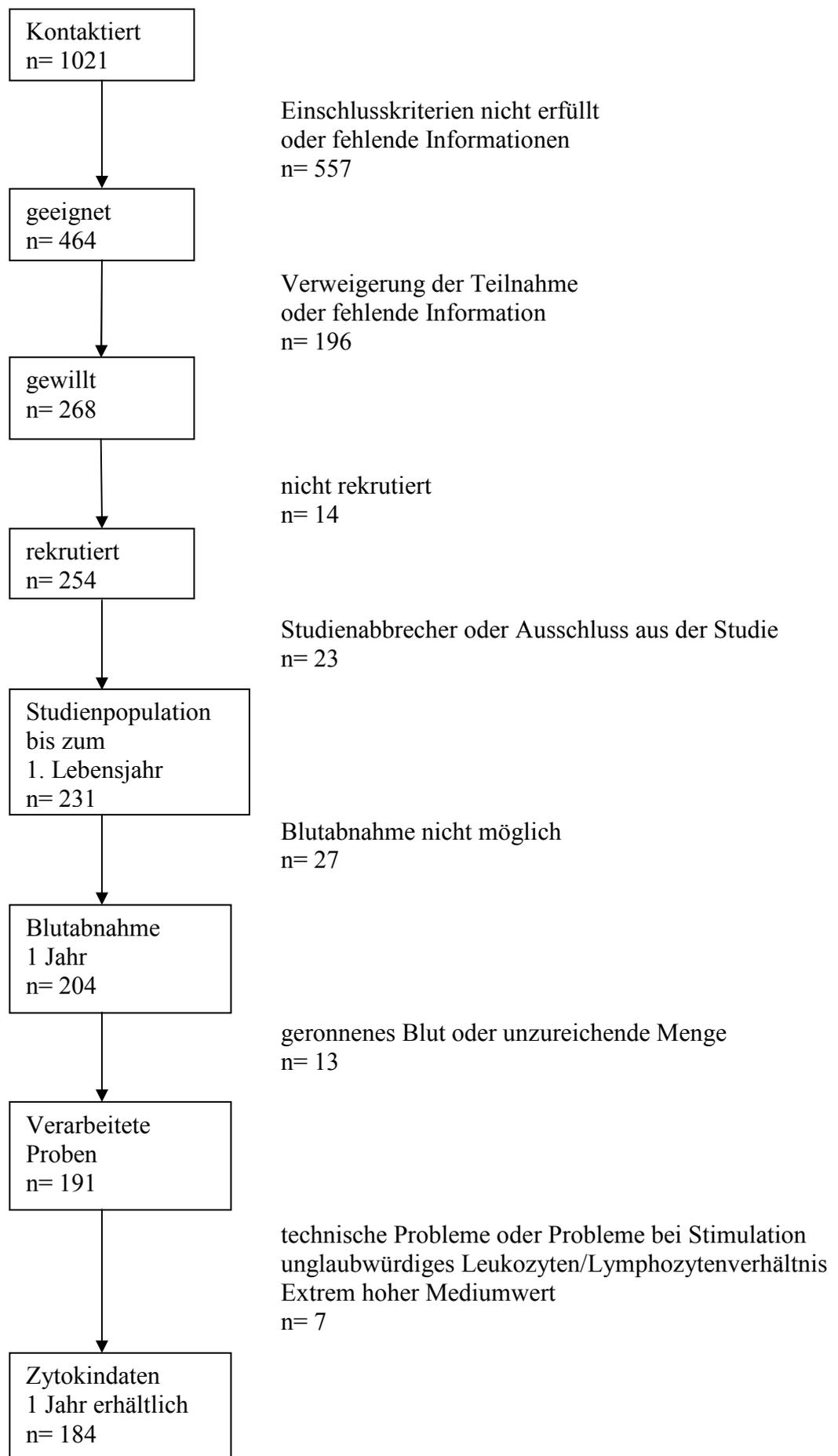
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Rekrutierung der Studienteilnehmer und Materialgewinnung

Für die Studie wurden in Deutschland insgesamt 1021 Schwangere kontaktiert. Von diesen wurden 464 als geeignet betrachtet, aber nur 268 waren gewillt, an der Studie teilzunehmen. Schließlich wurden 254 Schwangere im dritten Trimenon rekrutiert, davon waren 142 aus Bauern- und 112 aus Nichtbauernfamilien. Bis zum 1. Lebensjahr der Kinder nahmen noch 231 Familien an der Studie teil, die anderen hatten entweder die Studie abgebrochen oder waren aus der Studie ausgeschlossen worden, weil sie beispielsweise außerhalb des Studieneinzuggebietes verzogen waren oder nicht mehr kontaktiert werden konnten. Bei 204 Kindern konnte ungefähr 12 Monate nach der Geburt Blut abgenommen werden. Von diesen 204 Proben konnte bei 191 der Stimulationsansatz durchgeführt werden, bei den restlichen 13 Proben war entweder das Blut geronnen oder in unzureichender Menge vorhanden. Bei 7 dieser verarbeiteten Proben traten Probleme bei der Vermessung mittels ELISA auf; so gab es beispielsweise technische Probleme oder der Mediumwert war unglaublich hoch. Folglich waren letztendlich von 184 Kindern Zytokindaten erhältlich, davon 88 Kinder aus Bauern- und 96 Kinder aus Nichtbauernfamilien.

Die Rekrutierung fand zwischen August 2002 und März 2005, die Blutabnahme der 1-Jahresproben zwischen Dezember 2003 und Mai 2006 statt.

Ein Flowchart über die Rekrutierung der Studienteilnehmer ist in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3: Diagramm über die Rekrutierung der Studienteilnehmer**

## 4.2. Beschreibung der Studienpopulation

Die Charakterisierung der Studienpopulation ist in Tabelle 3 für die Mütter, in Tabelle 4 für die Väter und in Tabelle 5 für die Kinder zusammengefasst. Hierbei wurden nur die Familien eingeschlossen, von denen auch 1 Jahreszytokindaten der Kinder vorhanden sind. Allerdings ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der gesamten Studienpopulation in Deutschland und der Studienpopulation, von der 1 Jahreszytokindaten vorhanden sind (Daten werden nicht gezeigt).

<b>Mütter gesamt n=184</b>	<b>Nichtbauern (n=96)</b>		<b>Bauern (n=88)</b>		<b>p-Wert</b>
	n	%	n	%	
<b>Alter</b>	<b>n=96</b>		<b>n=88</b>		0,368
< 25 Jahre	14	14,6	7	8,0	
25 - 35	64	66,7	63	71,6	
> 35	18	18,8	18	20,5	
<b>BMI<sup>1</sup></b>	<b>n=96</b>		<b>n=88</b>		0,241
<18	0	0,0	0	0,0	
18-25	75	78,1	59	67,0	
25-30	16	16,7	22	25,0	
>30	5	5,2	7	8,0	
<b>Anzahl Geschwister der Mütter</b>	<b>n=96</b>		<b>n=88</b>		<b>0,002</b>
0	11	11,5	4	4,5	
1	39	40,6	22	25,0	
2	28	29,2	25	28,4	
3 und mehr	18	18,8	37	42,0	
<b>Bauernhofmilchkonsum in der S<sup>2</sup></b>	<b>n=96</b>		<b>n=88</b>		<b>&lt; 0,001</b>
Ja	17	17,7	66	75	
nein	79	82,3	22	25	
<b>Wird Bauernhofmilch abgekocht</b>	<b>n=16</b>		<b>n=65</b>		0,766
ja, nur im Sommer	0	0	2	3,1	
ja, immer	3	18,8	13	20	
nein	13	82,3	50	76,9	
<b>Asthma</b>	<b>n=96</b>		<b>n=88</b>		0,109
Ja	15	15,6	7	8	
nein	81	84,4	81	92	
<b>Asthma in der Schwangerschaft</b>	<b>n=15</b>		<b>n=7</b>		0,448
Ja	4	26,7	3	42,9	
nein	11	73,3	4	57,1	
<b>Allergischer Schnupfen</b>	<b>n=96</b>		<b>n=88</b>		0,606
Ja	34	35,4	28	31,8	
nein	62	64,6	60	68,2	
<b>Allergischer Schnupfen in der S<sup>2</sup></b>	<b>n=34</b>		<b>n=28</b>		0,1
ja	18	52,9	9	32,1	
nein	16	47,1	19	67,9	

Fortsetzung nachfolgende Seite

Mütter gesamt n=184	Nichtbauern (n=96)		Bauern (n=88)		p-Wert
	n	%	n	%	
<b>Hautausschlag &gt; 6 Monate<sup>3</sup></b>	<b>n=96</b>		<b>n=88</b>		0,094
ja	29	30,2	37	42	
nein	67	69,8	51	58	
<b>Neurodermitis</b>	<b>n=29</b>		<b>n=37</b>		0,345
ja	11	37,9	10	27	
nein	18	62,1	27	73	
<b>Jemals Raucher<sup>4</sup></b>	<b>n=96</b>		<b>n=88</b>		<b>&lt; 0,001</b>
ja	43	44,8	17	19,3	
nein	53	55,2	71	80,7	
<b>Rauchen jetzt aufgegeben</b>	<b>n=43</b>		<b>n=17</b>		
ja	37	86	16	94,1	0,38
nein	6	14	1	5,9	
<b>Haustiere</b>	<b>n=96</b>		<b>n=88</b>		<b>&lt; 0,001</b>
ja	41	42,7	62	70,5	
nein	55	57,3	26	29,5	
<b>Schulabschluss</b>	<b>n=96</b>		<b>n=88</b>		<b>0,003</b>
keiner	0	0	0	0	
Hauptschule	19	19,8	31	35,2	
Realschule	49	51	39	44,3	
Abitur	11	11,5	15	17	
Hochschule	17	17,7	3	3,4	
Sonstige	0	0	0	0	

**Tabelle 3: Charakterisierung der Studienpopulation (Mütter)**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Personen (%) angegeben. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des  $\chi^2$  Tests berechnet.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen (fett gedruckt).

<sup>1</sup>BMI= Body Mass Index

<sup>2</sup>S= Schwangerschaft

<sup>3</sup>Hautausschlag mindestens 6 Monate lang

<sup>4</sup>“Jemals Raucher“ wurde definiert als insgesamt >5 Packungen Zigaretten im Leben

Bei den Müttern konnten signifikante Unterschiede zwischen Bauern- und Nichtbauernfamilien bezüglich Anzahl der Geschwister, Bauernhofmilchkonsum in der Schwangerschaft, Rauchverhalten, Haltung von Haustieren und Schulbildung festgestellt werden. Mütter aus Bauernfamilien hatten eine größere Anzahl an Geschwistern ( $p = 0,002$ ), eine geringere Schulbildung ( $p = 0,003$ ) und konsumierten öfter Bauernhofmilch in der Schwangerschaft ( $p < 0,001$ ). Mütter aus Nichtbauernfamilien waren häufiger Raucher in früheren Jahren ( $p < 0,001$ ) und in diesen Familien gab es seltener Haustiere ( $p < 0,001$ ). In allen anderen Punkten (wie z.B. Alter, Body Mass Index, Allergien usw.) unterschieden sich Mütter aus Bauern- und Nichtbauernfamilien nicht signifikant.

Väter gesamt n= 184	Nichtbauern (n=96)		Bauern (n=88)		p-Wert
	n	%	n	%	
<b>Alter</b>	<b>n=96</b>		<b>n=88</b>		0,319
< 25 Jahre	4	4,2	2	2,3	
25 - 35	39	40,6	45	51,1	
> 35	53	55,2	41	46,6	
<b>Asthma</b>	<b>n=96</b>		<b>n=88</b>		0,876
ja	6	6,3	6	6,8	
nein	90	93,7	82	93,2	
<b>Allergischer Schnupfen</b>	<b>n=96</b>		<b>n=88</b>		<b>0,007</b>
ja	37	38,5	18	20,5	
nein	59	61,5	70	79,5	
<b>Neurodermitis</b>	<b>n=96</b>		<b>n=88</b>		0,61
ja	6	6,3	4	4,5	
nein	90	93,7	84	95,5	

**Tabelle 4: Charakterisierung der Studienpopulation (Väter)**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Personen (%) angegeben. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des  $\chi^2$  Tests berechnet.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen (fett gedruckt).

Bei den Vätern konnte einzig bei allergischem Schnupfen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Väter aus Nichtbauernfamilien litten häufiger an allergischem Schnupfen ( $p = 0,007$ ). Bezüglich Alter, Asthma und Neurodermitis konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Kinder gesamt n=183	Nichtbauern (n=96)		Bauern (n=87)		p-Wert
	n	%	n	%	
<b>Geschlecht</b>	<b>n=96</b>		<b>n=87</b>		0,312
Junge	48	50,0	50	57,5	
Mädchen	48	50,0	37	42,5	
<b>Husten ohne Erkältung</b>	<b>n=96</b>		<b>n=87</b>		0,868
ja	20	20,8	19	21,8	
nein	76	79,2	68	78,2	
<b>Pfeifender Atem ohne Erkältung</b>	<b>n=95</b>		<b>n=87</b>		0,732
nie	66	69,5	62	71,3	
selten	27	28,4	22	25,3	
einmal im Monat	2	2,1	2	2,3	
mindestens zweimal im Monat	0	0,0	1	1,1	
<b>Hautausschlag</b>	<b>n=96</b>		<b>n=87</b>		0,171
ja	22	22,9	13	14,9	
nein	74	77,1	74	85,1	
<b>Diagnose Bronchitis</b>	<b>n=95</b>		<b>n=86</b>		0,649
nie	80	84,2	68	79,1	
einmal	9	9,5	10	11,6	
mehrmals	6	6,3	8	9,3	
<b>Diagnose Asthma</b>	<b>n=93</b>		<b>n=83</b>		
nie	93	100	83	100	
einmal	0	0	0	0	
mehrmals	0	0	0	0	
<b>Diagnose Neurodermitis</b>	<b>n=93</b>		<b>n=83</b>		0,494
nie	83	89,3	78	94	
einmal	7	7,5	4	4,8	
mehrmals	3	3,2	1	1,2	
<b>Diagnose Lungenentzündung</b>	<b>n=93</b>		<b>n=83</b>		0,495
nie	92	98,9	81	97,6	
einmal	1	1,1	2	2,4	
mehrmals	0	0	0	0	
<b>Diagnose Pseudokrupp</b>	<b>n=94</b>		<b>n=83</b>		0,403
nie	87	92,6	79	95,2	
einmal	5	5,3	4	4,8	
mehrmals	2	2,1	0	0	
<b>Bauernhofmilchkonsum nicht abgekocht</b>	<b>n=96</b>		<b>n=87</b>		<0,001
ja	2	2,1	22	25,3	
nein	94	97,9	65	74,7	
<b>Bauernhofmilchkonsum abgekocht</b>	<b>n=96</b>		<b>n=87</b>		<0,001
ja	9	9,4	42	48,3	
nein	87	90,6	45	51,7	

Fortsetzung nachfolgende Seite

Kinder gesamt n=183	Nichtbauern (n=96)		Bauern (n=87)		p-Wert
	n	%	n	%	
<b>Vorzugsmilch</b>	<b>n=96</b>		<b>n=86</b>		0,473*
ja	0	0	1	1,2	
nein	96	100	85	98,8	
<b>Pasteurisierte Frischmilch</b>	<b>n=96</b>		<b>n=87</b>		<b>0,003</b>
ja	20	20,8	5	5,7	
nein	76	79,2	82	94,3	
<b>H-Milch</b>	<b>n=96</b>		<b>n=87</b>		<b>0,001</b>
ja	39	40,6	15	17,2	
nein	57	59,4	72	82,8	
<b>Milchpulver</b>	<b>n=96</b>		<b>n=86</b>		0,338*
ja	7	7,3	3	3,5	
nein	89	92,7	83	96,5	
<b>Nahrungsmittelunverträglichkeit</b>	<b>n=96</b>		<b>n=87</b>		0,237
ja	17	17,7	10	11,5	
nein	79	82,3	77	88,5	

**Tabelle 5: Charakterisierung der Studienpopulation (Kinder)**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Personen (%) angegeben. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des  $\chi^2$  Tests berechnet.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen (fett gedruckt).

\*mindestens eine Zelle hat eine erwartete Häufigkeit  $< 5$ , deshalb Anwendung des exakten Tests nach Fisher

Bei den Kindern konnte nur bezüglich des Milchkonsums ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. So tranken Kinder aus Bauernfamilien signifikant häufiger Frischmilch vom Bauernhof und zwar sowohl nicht abgekochte als auch abgekochte Milch (jeweils  $p < 0,001$ ). Pasteurisierte Frischmilch und H-Milch dagegen wurden signifikant häufiger von Kindern aus Nichtbauernfamilien getrunken ( $p = 0,003$  bzw.  $0,001$ ). Bezüglich Geschlecht, Husten ohne Erkältung, pfeifender Atem ohne Erkältung, Hautauschlag, Nahrungsmittelunverträglichkeit, Diagnose Bronchitis, Diagnose Asthma, Diagnose Neurodermitis, Diagnose Lungenentzündung und Diagnose Pseudokrapp konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

### 4.3. Charakterisierung der Bauernhöfe

Tabelle 6 zeigt die Art und Anzahl an Tieren auf den Bauernhöfen und die Größe der Höfe. Auf den meisten Höfen wurden Milchkühe und Rinder gehalten (89,7 bzw. 96,6%). Andere Tierarten wie Schweine, Geflügel, Pferde, Schafe bzw. Ziegen und Hasen bzw. Kaninchen kamen nicht so häufig vor und wenn, dann nur in geringer Zahl. Die Größe des Bauernhofs betrug zwischen 4 und 270 Hektar, der Median lag bei 30 Hektar.

<b>Bauern gesamt n=96</b>	n	%	Median (Spannweite)
<b>Tiere auf dem Hof (n=87)</b>			
Milchkühe	78	89,7	22 Tiere (0-170)
Rinder	84	96,6	25 Tiere (0-150)
Schweine	19	21,8	0 Tiere (0-3)
Geflügel	42	48,3	0 Tiere (0-89)
Pferde	25	28,7	0 Tiere (0-22)
Schafe/Ziegen	17	19,5	0 Tiere (0-20)
Hasen/Kaninchen	27	31	0 Tiere (0-10)
<b>Größe des Hofes (n=81)</b>			30 Hektar (4-270)

**Tabelle 6: Charakterisierung der Bauernhöfe**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Bauern (%), welche die entsprechende Tierart halten, angegeben. Außerdem ist der Median der Anzahl der Tiere bzw. der Größe des Hofes und die Spannweite angegeben.

### 4.4. Tätigkeiten der Bäuerinnen

In Tabelle 7 sind die Tätigkeiten der Bäuerinnen angegeben. Dabei fällt auf, dass fast alle Bäuerinnen auf dem Hof mitarbeiten (91,5%) und 69,7% von ihnen auch schon in früheren Jahren auf einem Bauernhof gearbeitet haben. Im Schnitt befanden sich die Frauen schon 15 Jahre auf dem Bauernhof, die Spannweite lag zwischen 1 und 30 Jahren.

Vor der Schwangerschaft arbeiteten 36,5 % der Bäuerinnen ganztags, 24,3 % halbtags und 39,2 % weniger als halbtags auf dem Bauernhof. Genaue Angaben zur Dauer der Arbeit während der Schwangerschaft sind in Tabelle 8 angegeben. Hierbei ist beachtenswert, dass im ersten und zweiten Trimenon der Schwangerschaft der Median bei 7 Tage die Woche arbeiten lag. Auch im dritten Trimenon arbeiteten die Bäuerinnen im Schnitt noch 4,75 Tage pro Woche und 2 Stunden pro Tag auf dem Bauernhof. Die Tätigkeiten der Bäuerinnen umfassten vor allem Umgang mit Heu (91,5%), Umgang mit Silage (81,75%), Reinigen von Ställen und Scheune (85,4%), Melken (80,5%), Einstreuen (76,8%) und Entmisten (75,6%). Getreidemahlen oder Eier sammeln wurde nur von einem geringen Teil der Bäuerinnen betrieben (8,5 bzw. 24,4%).

<b>Bäuerinnen</b>		n/N	%
Leben auf dem Bauernhof		85/88	96,6
Bewirtschaftung des Hofes		81/86	94,2
Arbeit auf dem Hof		75/82	91,5
Arbeit auf dem Hof in früheren Jahren		53/76	69,7
Schwangerschaft	ganztags	27/74	36,5
	halbtags	18/74	24,3
	weniger als halbtags	29/74	39,2
Tätigkeiten auf dem Hof	Melken	66/82	80,5
	Entmisten	62/82	75,6
	Einstreuen	63/82	76,8
	Waschen der Melkutensilien	61/82	74,4
	Reinigen der Tiere	44/82	53,7
	Umgang mit Heu	75/82	91,5
	Umgang mit Silage	67/82	81,7
	Umgang mit Kompost	41/82	50
	Tieren Medikament verabreichen	44/82	53,7
	Reinigen von Ställen oder Scheune	70/82	85,4
	Bewegen der Tiere im Stall	57/82	64,8
	Enger Kontakt zu Vieh	38/82	46,3
	Getreidemahlen	7/82	8,5
	Eier sammeln	20/82	24,4
	Reinigung Hühnerstall	14/82	17,1
sonstiges (z.B. Vieh tränken)	10/67	14,9	

**Tabelle 7: Tätigkeiten der Bäuerinnen**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Personen (%) angegeben.

<b>Bäuerinnen n=82</b>	Median(Spannweite)
Arbeit im Stall (Tage pro Woche) 1.-3. Schwangerschaftsmonat	7 Tage (0-7)
Arbeit im Stall (Stunden pro Tag) 1.-3. Schwangerschaftsmonat	2,5 Stunden (0-9)
Arbeit im Stall (Tage pro Woche) 4.-6. Schwangerschaftsmonat	7 Tage (0-7)
Arbeit im Stall (Stunden pro Tag) 4.-6. Schwangerschaftsmonat	2 Stunden (0-9)
Arbeit im Stall (Tage pro Woche) 7.-9. Schwangerschaftsmonat	4,75 Tage (0-7)
Arbeit im Stall (Stunden pro Tag) 7.-9. Schwangerschaftsmonat	2 Stunden (0-9)

**Tabelle 8: Dauer der Arbeit der Bäuerinnen während der Schwangerschaft**

Die Ergebnisse sind als Median (Spannweite) angegeben

#### 4.5. Analyse der Zytokindaten

Alle fünf Zytokine konnten in den Überständen nachgewiesen werden. Jedoch ergaben sich deutliche Unterschiede in den Konzentrationen der einzelnen Zytokine und je nach verwendetem Stimulans. Die Ergebnisse der Zytokinwerte wurden immer auf die Anzahl der Lymphozyten bezogen. Die Auswertung der Zytokindaten erfolgte auf verschiedene Arten. Zum einen wurden die Zytokinwerte als stetige Daten betrachtet, zum anderen erfolgte eine Unterteilung in verschiedene Kategorien. Hierbei erfolgte zunächst eine

Einteilung in drei Kategorien: Kategorie 0: Zytokinwert = 0, Kategorie 1: Zytokinwert  $\leq$  Median (ohne Nullwerte), Kategorie 2: Zytokinwert  $>$  Median (ohne Nullwerte). Anschließend erfolgte eine Unterteilung in zwei Kategorien: Kategorie 0: Zytokinwert =0 und Kategorie 1: Zytokinwert  $>0$ . Letztere Unterteilung wurde auch für die Regressionsanalysen angewendet.

#### 4.5.1. Zytokindaten ohne Kategorien

Die Zytokinwerte (ohne Kategorieunterteilung) wurden mittels Kolmogornoff Smirnof Test auf Normalverteilung getestet. Da sich keine Normalverteilung ergab, wurde der Mann-Whitney-*U*-Test verwendet.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 aufgeführt. Signifikante Ergebnisse ergaben sich bei TNF- $\alpha$  SEB 24h ( $p=0,026$ ), IL-5 PI 48h ( $p=0,011$ ), IL-5 LPS 48h ( $p= 0,016$ ) und IL-5 SEB 48h ( $p= 0,043$ ). Es waren jeweils die Werte bei den Bauern erhöht. Ein auffälliges, aber nicht signifikantes Ergebnis konnte für IL-5 SEB 24h ( $p=0,052$ ), IL-10 SEB 24h ( $p= 0,099$ ), INF- $\gamma$  LPS 24h ( $p= 0,065$ ) und TNF- $\alpha$  LPS 48h ( $p= 0,087$ ) festgestellt werden. Hier waren bei IL-5, IL-10 und TNF-  $\alpha$  die Werte bei den Bauern erhöht, bei INF- $\gamma$  waren die Werte bei den Nichtbauern erhöht. Da sich jedoch bei vielen Werten ein Median von Null ergab, wurden im nächsten Schritt Kategorien gebildet, um die Nullwerte getrennt von den positiven Werten betrachten zu können.

Zytokindaten ohne Kategorien

	Gesamt (n=184)				Bauern (n=88)				Nichtbauern (n=96)				p-Wert
	n	Perzentile			n	Perzentile			n	Perzentile			
PI 24h	n	25.	50. (Median)	75.	n	25.	50. (Median)	75.	n	25.	50. (Median)	75.	
IL-5	162	2,11	5,41	9,03	79	2,91	5,87	9,06	83	1,55	4,87	8,89	0,187
IL-10	160	2,35	8,13	19,04	78	2,62	6,96	15,66	82	2,26	11,03	22,29	0,106
IL-12	164	0	1,13	2,89	79	0	1,04	2,77	85	0	1,49	3,04	0,329
INF- $\gamma$	164	5,56	75,15	500,81	80	10,57	77,34	394,43	84	3,93	72,97	616,6	0,829
TNF- $\alpha$	164	14,66	44,51	76,37	79	15,07	41,73	74,04	85	13,3	47,24	90,79	0,52
LPS 24h	n	25.	50. (Median)	75.	n	25.	50. (Median)	75.	n	25.	50. (Median)	75.	p-Wert
IL-5	168	0	0	0	80	0	0	0,32	88	0	0	0	0,588
IL-10	164	20,45	46,52	84,24	79	18,33	51,55	78,91	85	21,71	42,92	100,39	0,949
IL-12	168	0	0	0,03	80	0	0	0	88	0	0	0,5	0,171
INF- $\gamma$	167	0	0	0	80	0	0	0	87	0	0	1,89	<b>0,065</b>
TNF- $\alpha$	164	7,53	17,79	41,3	77	5,84	20,44	45,92	87	9,17	16,03	40,13	0,872
SEB 24h	n	25.	50. (Median)	75.	n	25.	50. (Median)	75.	n	25.	50. (Median)	75.	p-Wert
IL-5	165	0	0,91	2,43	79	0	1,22	3,22	86	0	0,45	1,91	<b>0,052</b>
IL-10	161	2,5	5,79	10,91	78	4,1	6,61	11,46	83	1,94	5,45	10,45	<b>0,099</b>
IL-12	163	0	0	1,52	77	0	0	1,55	86	0	0	1,53	0,243
INF- $\gamma$	163	0	3,46	8,08	77	0	3,6	10,41	86	0	3,35	7,88	0,462
TNF- $\alpha$	162	0	4,35	13,68	76	0	6,44	15,27	86	0	1,67	10,04	<b>0,026</b>
PI 48h	n	25.	50. (Median)	75.	n	25.	50. (Median)	75.	n	25.	50. (Median)	75.	p-Wert
IL-5	159	1,86	7,07	11,86	80	4,19	7,82	13,68	79	1,17	4,17	10,41	<b>0,011</b>
IL-10	156	1,7	8,1	15,08	79	2,12	7,71	14,4	77	1,19	10	18,77	0,688
IL-12	158	0	0	1,7	78	0	0,1	1,89	80	0	0	1,46	0,415
INF- $\gamma$	158	6,63	256,62	979	78	21,03	335,31	763,31	80	3,2	88,69	1090,05	0,56
TNF- $\alpha$	156	9,8	43,01	77,91	77	14,18	43,32	80,24	79	5,87	42,5	73,06	0,497

Fortsetzung nachfolgende Seite

		Gesamt (n=184)			Bauern (n=88)				Nichtbauern (n=96)					
		Perzentile												
	n	25.	50. (Median)	75.	n	25.	50. (Median)	75.	n	25.	50. (Median)	75.	p-Wert	
LPS 48h														
IL-5	162	0	0	0,94	80	0	0	1,41	82	0	0	0,38	<b>0,016</b>	
IL-10	159	16,03	35,63	65,6	79	17,4	36,51	65,7	80	14,58	33,69	61,73	0,572	
IL-12	163	0	0	0,87	80	0	0	0,85	83	0	0	0,88	0,483	
INF- $\gamma$	162	0	0	2,65	79	0	0	2,47	83	0	0	3,56	0,829	
TNF- $\alpha$	159	0,04	6,71	20,19	77	1,85	10,69	21,85	82	0	5,03	19,13	<b>0,087</b>	
SEB 48h														
IL-5	161	0	1,8	4,52	79	0,48	2,13	4,65	82	0	1,14	3,98	<b>0,043</b>	
IL-10	158	4,84	11,45	19,58	79	5,44	12,12	20,38	79	3,7	9,11	18,3	0,196	
IL-12	161	0	0	0	80	0	0	0	81	0	0	0	0,62	
INF- $\gamma$	160	0	13,93	62,85	78	0	14,73	86,73	82	0	12,48	41,39	0,398	
TNF- $\alpha$	158	0	4,77	14,07	77	0	4,84	19,71	81	0	3,62	13,43	0,207	

**Tabelle 9: Zytokinwerte sortiert nach Stimulanzen**

Die Ergebnisse sind angegeben als Median, 25. und 75. Perzentile. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests berechnet.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen (fett gedruckt),  $p < 0,1$  wurde als auffällig angesehen (kursiv gedruckt).

#### 4.5.2. Zytokindaten in drei Kategorien

Wie bereits erwähnt, erfolgte zunächst die Unterteilung in drei Kategorien.

Kategorie 0: Zytokinwert =0

Kategorie 1: Zytokinwert  $\leq$ Median (ohne Nullwerte),

Kategorie 2: Zytokinwert  $>$ Median (ohne Nullwerte)

Die Berechnung erfolgte mittels des Pearson Chi Quadrattestes ( $\chi^2$ ). Hierbei wurden sowohl der p-Wert über alle drei Kategorien als auch der p-Wert über Kategorie 1 und 2 angegeben.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 10 dargestellt. Für den p-Wert über alle drei Kategorien ergaben sich signifikante Ergebnisse bei INF- $\gamma$  LPS 24h ( $p=0,045$ ) und IL-5 SEB 48h ( $p= 0,027$ ). Bei INF- $\gamma$  wiesen die Nichtbauern, bei IL-5 die Bauern erhöhte Zytokinwerte auf. Auffällige Werte konnte für IL-5 LPS 48h ( $p=0,058$ ) und TNF- $\alpha$  LPS 48h ( $p= 0,067$ ) festgestellt werden. Hier wiesen jeweils die Bauernkinder erhöhte Werte auf. Für den p-Wert über  $\leq$  Median vs.  $>$  Median ergaben sich signifikante Ergebnisse für INF- $\gamma$  LPS 24h und 48h ( $p=0,04$  bzw.  $0,039$ ). Beide Male wiesen die Nichtbauern höhere Werte auf. Auffällige Werte konnten für IL-10 P/I 24h ( $p=0,095$ ) und TNF- $\alpha$  LPS 48h ( $p=0,068$ ) gefunden werden. Bei IL-10 P/I 24h zeigten die Nichtbauern, bei TNF- $\alpha$  LPS 48h die Bauern höhere Werte.

Mit Hilfe des Mantel-Haenszel-Testes konnte ein signifikanter Trend über die drei Kategorien für IL-5 LPS 48h, IL-5 SEB 48h und INF- $\gamma$  LPS 24h gefunden werden. Der wesentliche Unterschied lag jedoch zwischen den detektierbaren und nicht detektierbaren Messwerten vor. So konnte man bei den Nichtbauernkindern deutlich mehr nicht detektierbare Messwerte feststellen (beispielsweise 35 zu 18 bei IL-5 SEB 48h, 58 zu 42 bei IL-5 LPS 48h, 13 zu 6 bei IL-10 SEB 24h, 57 zu 42 bei IL-12 SEB24h, 29 zu 23 bei IFN- $\gamma$  SEB 24h, 34 zu 20 bei TNF- $\alpha$  SEB 24h).

## Zytokindaten in drei Kategorien

IL-5	Bauern		Nichtbauern		p-Wert über drei Kategorien	p-Wert über ≤Median vs. >Median	Mantel- Haenszel-Test
	n	%	n	%			
PI 24h					0,182	0,454	<b>0,088</b>
0	5	6,3	12	14,5			
≤Median(ohne 0)	35	44,3	38	45,8			
>Median(ohne 0)	39	49,4	33	39,8			
LPS24h					0,496	0,342	0,748
0	59	73,8	69	78,4			
≤Median(ohne 0)	12	15,0	8	9,1			
>Median(ohne 0)	9	11,3	11	12,5			
SEB24h					0,179	0,28	<b>0,067</b>
0	25	31,6	37	43,0			
≤Median(ohne 0)	24	30,4	27	31,4			
>Median(ohne 0)	30	38,0	22	25,6			
PI48h					0,127	0,556	<b>0,07</b>
0	6	7,5	14	17,7			
≤Median(ohne 0)	35	43,8	34	43,0			
>Median(ohne 0)	39	48,8	31	39,2			
LPS48h					<b>0,058</b>	1	<b>0,028</b>
0	42	52,5	58	70,7			
≤Median(ohne 0)	19	23,8	12	14,6			
>Median(ohne 0)	19	23,8	12	14,6			
SEB48h					<b>0,027</b>	0,846	<b>0,026</b>
0	18	22,8	35	42,7			
≤Median(ohne 0)	31	39,2	23	28,0			
>Median(ohne 0)	30	38,0	24	29,3			

Fortsetzung nachfolgende Seite

IL-10	Bauern		Nichtbauern		p-Wert über drei Kategorien	p-Wert über ≤Median vs. >Median	Mantel- Haenszel-Test
	n	%	n	%			
PI 24h					0,248	<b>0,095</b>	0,201
0	8	10,3	8	9,8			
≤Median(ohne 0)	40	51,3	32	39,0			
>Median(ohne 0)	30	38,5	42	51,2			
LPS24h					0,897	0,686	0,644
0	4	5,1	5	5,9			
≤Median(ohne 0)	36	45,6	41	48,2			
>Median(ohne 0)	39	49,4	39	45,9			
SEB24h					0,176	0,314	<b>0,069</b>
0	6	7,7	13	15,7			
≤Median(ohne 0)	33	42,3	38	45,8			
>Median(ohne 0)	39	50,0	32	38,6			
PI48h					0,485	0,489	0,782
0	9	11,4	13	16,9			
≤Median(ohne 0)	37	46,8	30	39,0			
>Median(ohne 0)	33	41,8	34	44,2			
LPS48h					0,808	0,629	0,528
0	2	2,5	3	3,8			
≤Median(ohne 0)	37	46,8	40	50,0			
>Median(ohne 0)	40	50,6	37	46,3			
SEB48h					0,695	0,502	0,397
0	7	8,9	9	11,4			
≤Median(ohne 0)	34	43,0	37	46,8			
>Median(ohne 0)	38	48,1	33	41,8			

Fortsetzung nachfolgende Seite

IL-12	Bauern		Nichtbauern		p-Wert über drei Kategorien	p-Wert über ≤Median vs. >Median	Mantel- Haenszel-Test
	n	%	n	%			
PI 24h					0,302	0,144	0,249
0	30	38,0	29	34,1			
≤Median(ohne 0)	28	35,4	24	28,2			
>Median(ohne 0)	21	26,6	32	37,6			
LPS24h					0,361	1	0,184
0	64	80,0	62	70,5			
≤Median(ohne 0)	8	10,0	13	14,8			
>Median(ohne 0)	8	10,0	13	14,8			
SEB24h					0,233	0,451	0,267
0	42	54,5	57	66,3			
≤Median(ohne 0)	19	24,7	13	15,1			
>Median(ohne 0)	16	20,8	16	18,6			
PI48h					0,529	0,813	0,271
0	39	50,0	47	58,8			
≤Median(ohne 0)	19	24,4	17	21,3			
>Median(ohne 0)	20	25,6	16	20,0			
LPS48h					0,496	0,328	0,323
0	56	70,0	54	65,1			
≤Median(ohne 0)	14	17,5	13	15,7			
>Median(ohne 0)	10	12,5	16	19,3			
SEB48h					0,846	0,849	0,657
0	65	81,3	63	77,8			
≤Median(ohne 0)	7	8,8	9	11,1			
>Median(ohne 0)	8	10,0	9	11,1			

Fortsetzung nachfolgende Seite

IFN- $\gamma$	Bauern		Nichtbauern		p-Wert über drei Kategorien	p-Wert über $\leq$ Median vs. >Median	Mantel- Haenszel-Test
	n	%	n	%			
PI 24h					0,866	0,871	0,845
0	5	6,3	7	8,3			
$\leq$ Median(ohne 0)	38	47,5	38	45,2			
>Median(ohne 0)	37	46,3	39	46,4			
LPS24h					<b>0,045</b>	<b>0,044</b>	<b>0,033</b>
0	66	82,5	63	72,4			
$\leq$ Median(ohne 0)	10	12,5	9	10,3			
>Median(ohne 0)	4	5,0	15	17,2			
SEB24h					0,788	0,637	0,489
0	23	29,9	29	33,7			
$\leq$ Median(ohne 0)	26	33,8	30	34,9			
>Median(ohne 0)	28	36,4	27	31,4			
PI48h					0,341	0,609	0,514
0	7	9,0	13	16,3			
$\leq$ Median(ohne 0)	37	47,4	32	40,0			
>Median(ohne 0)	34	43,6	35	43,8			
LPS48h					0,115	<b>0,039</b>	0,565
0	49	62,0	53	63,9			
$\leq$ Median(ohne 0)	19	24,1	11	13,3			
>Median(ohne 0)	11	13,9	19	22,9			
SEB48h					0,643	0,357	0,732
0	21	26,9	21	25,6			
$\leq$ Median(ohne 0)	26	33,3	33	40,2			
>Median(ohne 0)	31	39,7	28	34,1			

Fortsetzung nachfolgende Seite

TNF- $\alpha$	Bauern		Nichtbauern		p-Wert über drei Kategorien	p-Wert über $\leq$ Median vs. >Median	Mantel- Haenszel-Test
	n	%	n	%			
PI 24h					0,469	0,224	0,399
0	5	6,3	6	7,1			
$\leq$ Median(ohne 0)	41	51,9	36	42,4			
>Median(ohne 0)	33	41,8	43	50,6			
LPS24h					0,681	0,452	0,398
0	8	10,4	11	12,6			
$\leq$ Median(ohne 0)	32	41,6	40	46,0			
>Median(ohne 0)	37	48,1	36	41,4			
SEB24h					0,105	0,248	<b>0,034</b>
0	20	26,3	34	39,5			
$\leq$ Median(ohne 0)	25	32,9	29	33,7			
>Median(ohne 0)	31	40,8	23	26,7			
PI48h					0,984	0,866	0,874
0	8	10,4	8	10,1			
$\leq$ Median(ohne 0)	35	45,5	35	44,3			
>Median(ohne 0)	34	44,2	36	45,6			
LPS48h					<b>0,067</b>	<b>0,068</b>	<b>0,028</b>
0	15	19,5	24	29,3			
$\leq$ Median(ohne 0)	26	33,8	34	41,5			
>Median(ohne 0)	36	46,8	24	29,3			
SEB48h					0,446	0,767	0,348
0	25	32,5	34	42,0			
$\leq$ Median(ohne 0)	27	35,1	23	28,4			
>Median(ohne 0)	25	32,5	24	29,6			

**Tabelle 10: Unterschiede in der Zytokinexpression zwischen Bauern und Nichtbauern mit verschiedenen Stimulanzen (Zytokinkategorien 0,1,2)**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Personen (%) angegeben. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels des  $\chi^2$  Tests berechnet. Es sind der p-Wert über alle drei Kategorien und der p-Wert über  $\leq$ Median vs. >Median angegeben.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant (fett gedruckt),  $p < 0,1$  wurde als auffällig angesehen (kursiv gedruckt). Mittels des Mantel-Haenszel-Testes wurde der Trend über die drei Kategorien dargestellt.

#### 4.5.3. Zytokindaten in zwei Kategorien

Im nächsten Schritt erfolgte eine Unterteilung in zwei Kategorien. Dies war u.a. nötig, um anschließend eine logistische Regressionsanalyse durchführen zu können.

Kategorie 0: Zytokinwert =0

Kategorie 1: Zytokinwert >0

Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt. Signifikante Ergebnisse ergaben sich bei IL-5 LPS 48h ( $p = 0,017$ ) und IL-5 SEB 48h ( $p = 0,007$ ). Hier konnten jeweils bei den Bauernkindern erhöhte Werte festgestellt werden. Auffällige Ergebnisse konnte bei IL-5

PI 24h (p=0,092), IL-5 PI 48h (p=0,052) und TNF- $\alpha$  SEB 24h (p= 0,075) festgestellt werden. Auch hier wiesen jeweils die Bauernkinder höhere Werte auf.

Zytokindaten in zwei Kategorien

IL-5	Bauern		Nichtbauern		p-Wert
	n	%	n	%	
PI 24h					<b>0,092</b>
0	5	6,3	12	14,5	
>0	74	93,7	71	85,5	
LPS24h					0,479
0	59	73,8	69	78,4	
>0	21	26,3	19	21,6	
SEB24h					0,132
0	25	31,6	37	43,0	
>0	54	68,4	49	57,0	
PI48h					<b>0,052</b>
0	6	7,5	14	17,7	
>0	74	92,5	65	82,3	
LPS48h					<b>0,017</b>
0	42	52,5	58	70,7	
>0	38	47,5	24	29,3	
SEB48h					<b>0,007</b>
0	18	22,8	35	42,7	
>0	61	77,2	47	57,3	

Fortsetzung nachfolgende Seite

IL-10	Bauern		Nichtbauern		p-Wert
	n	%	n	%	
PI 24h					0,916
0	8	10,3	8	9,8	
>0	70	89,7	74	90,2	
LPS24h					0,818
0	4	5,1	5	5,9	
>0	75	94,9	80	94,1	
SEB24h					0,117
0	6	7,7	13	15,7	
>0	72	92,3	70	84,3	
PI48h					0,325
0	9	11,4	13	16,9	
>0	70	88,6	64	83,1	
LPS48h					0,660
0	2	2,5	3	3,8	
>0	77	97,5	77	96,3	
SEB48h					0,598
0	7	8,9	9	11,4	
>0	72	91,1	70	88,6	

Fortsetzung nachfolgende Seite

IL-12	Bauern		Nichtbauern		p-Wert
	n	%	n	%	
PI 24h					0,607
0	30	38,0	29	34,1	
>0	49	62,0	56	65,9	
LPS24h					0,154
0	64	80,0	62	70,5	
>0	16	20,0	26	29,5	
SEB24h					0,126
0	42	54,5	57	66,3	
>0	35	45,5	29	33,7	
PI48h					0,270
0	39	50,0	47	58,8	
>0	39	50,0	33	41,3	
LPS48h					0,501
0	56	70,0	54	65,1	
>0	24	30,0	29	34,9	
SEB48h					0,585
0	65	81,3	63	77,8	
>0	15	18,8	18	22,2	

Fortsetzung nachfolgende Seite

INF-y	Bauern		Nichtbauern		p-Wert
	n	%	n	%	
PI 24h					0,609
0	5	6,3	7	8,3	
>0	75	93,8	77	91,7	
LPS24h					0,120
0	66	82,5	63	72,4	
>0	14	17,5	24	27,6	
SEB24h					0,598
0	23	29,9	29	33,7	
>0	54	70,1	57	66,3	
PI48h					0,169
0	7	9,0	13	16,3	
>0	71	91,0	67	83,8	
LPS48h					0,809
0	49	62,0	53	63,9	
>0	30	38,0	30	36,1	
SEB48h					0,85
0	21	26,9	21	25,6	
>0	57	73,1	61	74,4	

Fortsetzung nachfolgende Seite

TNF- $\alpha$	Bauern		Nichtbauern		p-Wert
	n	%	n	%	
PI 24h					0,852
0	5	6,3	6	7,1	
>0	74	93,7	79	92,9	
LPS24h					0,653
0	8	10,4	11	12,6	
>0	69	89,6	76	87,4	
SEB24h					<b>0,075</b>
0	20	26,3	34	39,5	
>0	56	73,7	52	60,5	
PI48h					0,957
0	8	10,4	8	10,1	
>0	69	89,6	71	89,9	
LPS48h					0,152
0	15	19,5	24	29,3	
>0	62	80,5	58	70,7	
SEB48h					0,217
0	25	32,5	34	42,0	
>0	52	67,5	47	58,0	

**Tabelle 11: Unterschiede in der Zytokinexpression zwischen Bauern und Nichtbauern (Zytokinkategorien 0,1)**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Personen (%) angegeben. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des  $\chi^2$  Tests berechnet.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant (fett gedruckt),  $p < 0,1$  wurde als auffällig (kursiv gedruckt) angesehen.

#### 4.5.4. Regressionsanalyse der Zytokine im Vergleich zum Bauernstatus

Um den Zusammenhang zwischen den Zytokindaten und dem Bauernstatus weiter zu untersuchen, wurde bei den Werten, die bei der Einteilung in zwei Zytokinkategorien (Kategorie 0: Zytokinwert =0 und Kategorie 1: Zytokinwert >0) einen signifikanten Unterschied von  $p < 0,06$  aufwiesen, eine binär logistische Regressionsanalyse durchgeführt.

Hierbei wurden Alter, Body Mass Index, Anzahl der Geschwister, Bauernhofmilchkonsum in der Schwangerschaft, Asthma, allergischer Schnupfen, Hautausschlag, Neurodermitis, Allergie während der Schwangerschaft, Rauchen, Haustiere und Schulabschluss (jeweils von den Müttern) und Husten ohne Erkältung, pfeifender Atem ohne Erkältung, Hautausschlag, Diagnose Bronchitis, Diagnose Asthma, Diagnose Neurodermitis, Diagnose Lungenentzündung, Diagnose Pseudokrapp, Nahrungsmittelunverträglichkeit, Konsum von unabgekochter bzw. abgekochter Bauernhofmilch, Vorzugsmilch, pasteurisierter Milch, H-Milch und Milchpulver (jeweils von den Kindern) als mögliche confounder betrachtet. Es wurde jedoch nur auf diese confounder adjustiert, wenn nach beidseitiger Prüfung mittels  $\chi^2$  Test sowohl gegen den Bauernstatus, als auch gegen den Zytokinwert  $p < 0,06$  betrug.

Die Prüfung möglicher confounder im Vergleich zum Bauernstatus ist den Tabellen: Charakterisierung der Studienpopulation Mütter bzw. Kinder zu entnehmen (Tabelle 3 bzw. 5). Hierbei konnten, wie bereits erwähnt, signifikante Unterschiede zwischen Bauern- und Nichtbauernfamilien bezüglich Anzahl der Geschwister, Bauernhofmilchkonsum während der Schwangerschaft, Rauchverhalten, Haltung von Haustieren und Schulbildung (jeweils von den Müttern) bzw. Konsum von nicht abgekochter, abgekochter, pasteurisierter Frischmilch bzw. H-Milch (jeweils von den Kindern) festgestellt werden. Mütter aus Bauernfamilien hatten eine größere Anzahl an Geschwistern ( $p=0,002$ ), eine geringere Schulbildung ( $p=0,003$ ) und konsumierten öfter Bauernhofmilch während der Schwangerschaft ( $p<0,001$ ). Mütter aus Nichtbauernfamilien waren häufiger Raucher in früheren Jahren ( $p<0,001$ ) und in diesen Familien gab es seltener Haustiere ( $p<0,001$ ). Kinder aus Bauernfamilien tranken signifikant häufiger Frischmilch vom Bauernhof und zwar sowohl nicht abgekochte als auch abgekochte Milch (jeweils  $p<0,001$ ). Pasteurisierte Frischmilch und H-Milch dagegen wurden signifikant häufiger von Kindern aus Nichtbauernfamilien getrunken ( $p=0,003$  bzw.  $0,001$ ).

Nach Prüfung dieser potentiellen confounder im Vergleich zu den auffälligen Zytokinwerten ergaben sich nur noch für Haustiere und Konsum von unabgekochter Bauernhofmilch der Kinder signifikante bzw. auffällige Werte (siehe Tabelle 12 und 13). Deshalb wurde in der Regressionsanalyse bei IL-5 P/I 48h auf den potentiellen confounder Haustiere, bei IL-5 SEB 48h auf die potentiellen confounder Haustiere und Konsum unabgekochter Bauernhofmilch (Kinder) adjustiert.

	Haustiere				p-Wert
	ja n	%	nein n	%	
IL-5 P/I 48h					<b>0,037</b>
0	7	7,8	13	18,8	
>0	83	92,2	56	81,2	
IL-5 SEB 48h					<b>0,014</b>
0	23	25	30	43,5	
>0	69	75	39	56,5	

**Tabelle 12: Unterschiede in der Zytokinexpression im Vergleich zur Haustierhaltung (Zytokinkategorien 0,1)**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Personen (%) angegeben. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des  $\chi^2$  Tests berechnet.  $p<0,05$  wurde als statistisch signifikant (fett gedruckt) angesehen.

	unabgekochte Bauernhofmilch Kinder				p-Wert
	ja n	%	nein n	%	
IL-5 SEB 48h					<b>0,056</b>
0	3	14,3	49	35,3	
>0	18	85,7	90	64,7	

**Tabelle 13: Unterschiede in der Zytokinexpression im Vergleich zum Konsum unabgekochter Bauernhofmilch der Kinder (Zytokinkategorien 0,1)**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Personen (%) angegeben. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des  $\chi^2$  Tests berechnet.  $p<0,06$  wurde als auffällig, aber nicht statistisch signifikant (kursiv gedruckt) angesehen.

Die Ergebnisse der binär logistischen Regressionsanalyse sind in Tabelle 14-16 dargestellt.

---

#### IL-5 Expression nach P/I 48h Stimulation

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR		
	OR	95% KI	p-Wert	aOR	95% KI	p-Wert
Bauern	2,65	0,97-7,31	<b>0,059</b>	2,12*	0,74-6,08	0,164

**Tabelle 14: Unterschiede in der IL-5 Expression nach P/I 48h Stimulation zwischen Bauern und Nichtbauern (Zytokinkategorien 0,1)**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse.

\*adjustiert auf Haustiere

Die IL-5 Expression nach P/I 48h Stimulation war positiv assoziiert mit dem Bauernstatus (OR, 2,65; KI, 0,97-7,31), allerdings war das Ergebnis zwar auffällig, aber nicht signifikant ( $p=0,059$ ). Nach Adjustierung auf Haustiere betrug der p-Wert nur noch 0,164.

---

#### IL-5 Expression nach LPS 48h Stimulation

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR
	OR	95% KI	p-Wert	
Bauern	2,19	1,15-4,18	<b>0,018</b>	keine Adjustierung nötig

**Tabelle 15: Unterschiede in der IL-5 Expression nach LPS 48h Stimulation zwischen Bauern und Nichtbauern (Zytokinkategorien 0,1)**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse. Es war keine Adjustierung nötig, da keine potentiellen confounder festgestellt werden konnten.

Die gleiche positive Assoziation für IL-5 war auch bei Stimulation mit LPS 48h (OR, 2,19; KI 1,15-4,18) zu sehen, hier war das Ergebnis signifikant ( $p= 0,018$ ). Es war keine Adjustierung nötig, da keine potentiellen confounder festgestellt werden konnten.

---

#### IL-5 Expression nach SEB 48h Stimulation

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR		
	OR	95% KI	p-Wert	aOR	95% KI	p-Wert
Bauern	2,52	1,27-5,00	<b>0,008</b>	2,00*	0,94- 4,26	<b>0,071</b>

**Tabelle 16: Unterschiede in der IL-5 Expression nach SEB 48h Stimulation zwischen Bauern und Nichtbauern (Zytokinkategorien 0,1)**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse.

\*adjustiert auf Haustiere und unabgekochten Bauernhofmilchkonsum Kinder

Auch nach Stimulation mit SEB 48h konnte eine positive Assoziation von IL-5 mit dem Bauernstatus festgestellt werden (OR, 2,5; KI, 1,27-5,00). Das Ergebnis war deutlich signifikant ( $p= 0,008$ ). Nach Adjustierung auf Haustiere und unabgekochten Bauernhofmilchkonsum Kinder blieb der Effekt des Bauernstatus bestehen (aOR, 2,00;

KI, 0,94-4,26), das Ergebnis war jedoch nur noch auffällig und nicht mehr signifikant ( $p=0,071$ ).

#### 4.5.5. Einfluss der Tätigkeiten der Bäuerinnen während der Schwangerschaft auf die Zytokindaten

Um herauszufinden, welchen Einfluss Tätigkeiten der Bäuerinnen während der Schwangerschaft auf den Zytokinstatus der Kinder haben, wurden einige Tätigkeiten betrachtet, welche wahrscheinlich mit einer hohen Exposition gegenüber Mikroorganismen oder Allergenen einhergehen. Dazu zählen Entmisten, Reinigen der Tiere, Umgang mit Heu, Umgang mit Silage und Umgang mit Kompost. In Tabelle 17 sind nur diejenigen Zytokine aufgeführt, für welche ein signifikanter (fett gedruckt) bzw. auffälliger, aber nicht signifikanter (kursiv gedruckt) Wert festgestellt werden konnte. Da es sich hierbei oft um kleinere Fallzahlen von Personen handelte, wurde bei einer Häufigkeit  $<5$  der exakte Test nach Fisher angewendet.

Bei der Tätigkeit Entmisten konnte ein signifikanter Unterschied in der TNF- $\alpha$  Expression nach SEB 24h und 48h Stimulation ( $p=0,01$  bzw.  $0,04$ ) festgestellt werden und zwar lag eine signifikant höhere TNF- $\alpha$  Expression bei den Kindern vor, deren Mütter während der Schwangerschaft entmisteten. Das gleiche konnte für TNF- $\alpha$  Expression nach LPS 24h und 48h Stimulation beobachtet werden, allerdings war hier das Ergebnis nicht signifikant, aber auffällig ( $p=0,083$  bzw.  $0,08$ ).

Bei der Tätigkeit Reinigen der Tiere lag ein signifikanter Unterschied in der IL-10 Expression nach LPS 24h Stimulation ( $p=0,04$ ) und in der TNF- $\alpha$  Expression nach SEB 24h Stimulation ( $p=0,01$ ) vor. Auch hier waren die Werte erhöht, wenn die Mütter während der Schwangerschaft die Tiere reinigten. Ebenso war die IL-5 Expression nach SEB 48h Stimulation erhöht, allerdings nicht signifikant ( $p=0,079$ ).

Auch wenn die Mütter während der Schwangerschaft Umgang mit Heu hatten, konnten signifikant höhere Werte in der INF- $\gamma$  Expression nach PI 24h und 48h Stimulation ( $p=0,005$  bzw.  $0,001$ ) bei den Kindern festgestellt werden. Auffällige, aber nicht signifikante Werte konnte für die IL-5 Expression nach P/I 48h Stimulation festgestellt werden ( $p=0,066$ ).

Beim Umgang mit Silage verhielt es sich bezüglich der IL-5 Expression nach LPS 48h Stimulation umgekehrt. Hier wurden signifikant niedrigere Werte bei den Kindern festgestellt, wenn deren Mütter während der Schwangerschaft Umgang mit Silage hatten ( $p=0,018$ ). Für die INF- $\gamma$ -Werte nach P/I 24h bzw. 48h Stimulation dagegen konnten grenzwertig signifikant ( $p=0,054$ ) bzw. signifikant ( $p=0,029$ ) höhere Werte bei den Kindern nachgewiesen werden, deren Mütter während der Schwangerschaft Umgang mit Silage hatten.

Was den Umgang mit Kompost betrifft, war die IL-5 Expression nach LPS 48h Stimulation wiederum tendenziell bei den Kindern erniedrigt, deren Mütter während der Schwangerschaft Umgang mit Kompost hatten ( $p=0,063$ ).

	Entmisten		kein Entmisten		p-Wert
	n	%	n	%	
TNF- $\alpha$ LPS 24h					<b>0,083*</b>
0	4	7,3	4	23,5	
>0	51	92,7	13	76,5	
TNF- $\alpha$ SEB 24h					<b>0,01*</b>
0	11	20,4	9	56,3	
>0	43	79,6	7	43,7	
TNF- $\alpha$ LPS 48h					<b>0,08*</b>
0	9	15,8	6	37,5	
>0	48	4,2	10	62,5	
TNF- $\alpha$ SEB 48h					<b>0,040</b>
0	16	28,6	9	56,3	
>0	40	71,4	7	43,7	

	Reinigen der Tiere		kein Reinigen der Tiere		p-Wert
	n	%	n	%	
IL-5 SEB 48h					<b>0,079</b>
0	6	14,3	10	31,3	
>0	36	85,7	22	68,7	
IL-10 LPS 24h					<b>0,04*</b>
0	0	0,0	4	11,8	
>0	40	100,0	30	88,2	
TNF- $\alpha$ SEB 24h					<b>0,010</b>
0	6	15,8	14	43,8	
>0	32	84,2	18	56,2	

	Umgang mit Heu		kein Umgang mit Heu		p-Wert
	n	%	n	%	
IL-5 PI 48h					<b>0,066*</b>
0	3	4,4	2	28,6	
>0	65	95,6	5	71,4	
INF- $\gamma$ PI 24h					<b>0,005*</b>
0	2	3,0	3	42,9	
>0	65	97,0	4	57,1	
INF- $\gamma$ PI 48h					<b>0,001*</b>
0	3	4,5	4	57,1	
>0	63	95,5	3	42,9	

	Umgang mit Silage		kein Umgang mit Silage		p-Wert
	n	%	n	%	
IL-5 LPS 48h					<b>0,018</b>
0	37	60,7	4	26,7	
>0	24	39,3	11	73,3	
INF- $\gamma$ PI 24h					<b>0,054*</b>
0	2	3,4	3	20,0	
>0	57	96,6	12	80,0	
INF- $\gamma$ PI 48h					<b>0,029*</b>
0	3	5,2	4	26,7	
>0	55	94,8	11	73,3	

Fortsetzung nachfolgende Seite

	Umgang mit Kompost		kein Umgang mit Kompost		p-Wert
	n	%	n	%	
IL-5 LPS 48h					<b>0,063</b>
0	24	64,9	17	43,6	
>0	13	35,1	22	56,4	

**Tabelle 17: Unterschiede in der Zytokinexpression der Kinder bei unterschiedlichen Arbeiten der Mütter während der Schwangerschaft auf dem Bauernhof (Zytokinkategorien 0,1)**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Kinder (%) angegeben, deren Mütter während der Schwangerschaft eine entsprechende Tätigkeit ausführen. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des  $\chi^2$  Tests berechnet.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant (fett gedruckt),  $p < 0,1$  wurde als auffällig, aber nicht signifikant angesehen (kursiv gedruckt).

\*mindestens eine Zelle hat eine erwartete Häufigkeit  $< 5$ , deshalb Anwendung des exakten Tests nach Fisher

#### 4.5.6. Regressionsanalyse der Zytokindaten im Vergleich zu den Tätigkeiten der Bäuerinnen während der Schwangerschaft

Um die bemerkten Unterschiede weiter zu quantifizieren, wurde auch hier eine binär logistische Regressionsanalyse durchgeführt.

Zunächst wurden wiederum potentielle confounder ermittelt.

Die Ergebnisse der Confounderbestimmung sind in Tabelle 18-30 aufgeführt. Hierbei ist jeweils der potentielle confounder erstens im Vergleich zu auffälligen Zytokinwerten und zweitens im Vergleich zu den Tätigkeiten der Bäuerinnen während der Schwangerschaft dargestellt. Es sind nur auffällige bzw. signifikante Ergebnisse aufgeführt.

Als potentielle confounder konnten allergischer Schnupfen (bezüglich TNF- $\alpha$  LPS 24h bzw. 48h und Umgang mit Silage bzw. Kompost), Neurodermitis (bezüglich IFN- $\gamma$  P/I 24h und Umgang mit Silage), Bauernhofmilchkonsum (bezüglich IL-5 LPS 48h und Umgang mit Silage) und Allergie während der Schwangerschaft (bezüglich IFN- $\gamma$  P/I 48h und Umgang mit Silage bzw. Heu) jeweils der Müttern sowie H-Milchkonsum der Kinder (bezüglich TNF- $\alpha$  SEB 24h und Reinigen der Tiere) ermittelt werden.

	Allergischer Schnupfen Mütter				p-Wert
	ja		nein		
	n	%	n	%	
TNF- $\alpha$ LPS 24h					<b>0,048*</b>
0	0	0,0	8	15,4	
>0	25	100,0	44	84,6	
TNF- $\alpha$ LPS 48h					<b>0,031*</b>
0	1	4,3	14	25,9	
>0	22	95,7	40	74,1	

**Tabelle 18: Unterschiede in der Zytokinexpression der Bauernkinder bei allergischem Schnupfen der Mütter (Zytokinkategorien 0,1)**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Kinder (%) angegeben. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des  $\chi^2$  Tests berechnet.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant (fett gedruckt) angesehen.

\*mindestens eine Zelle hat eine erwartete Häufigkeit  $< 5$ , deshalb Anwendung des exakten Tests nach Fisher

	<b>Allergischer Schnupfen Mütter</b>				p-Wert
	ja n	%	nein n	%	
Umgang mit Silage					<b>0,031*</b>
ja	16	66,7	51	86,2	
nein	8	33,3	7	12,8	
Umgang mit Kompost					<b>0,015</b>
ja	17	70,8	24	41,4	
nein	7	29,2	34	58,6	

**Tabelle 19: Zusammenhang zwischen Umgang mit Silage und allergischem Schnupfen bei den Müttern**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Personen (%) angegeben. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des  $\chi^2$  Tests berechnet.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant (fett gedruckt) angesehen.

\*mindestens eine Zelle hat eine erwartete Häufigkeit  $< 5$ , deshalb Anwendung des exakten Tests nach Fisher

	<b>Haustiere</b>				p-Wert
	ja n	%	nein n	%	
IL-5 P/I 48h					<b>0,007*</b>
0	1	1,8	5	21,7	
>0	56	98,2	18	78,3	

**Tabelle 20: Unterschiede in der Zytokinexpression der Bauernkinder bei Haustierhaltung (Zytokinkategorien 0,1)**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Kinder (%) angegeben. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des  $\chi^2$  Tests berechnet.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant (fett gedruckt) angesehen.

\*mindestens eine Zelle hat eine erwartete Häufigkeit  $< 5$ , deshalb Anwendung des exakten Tests nach Fisher

	<b>Neurodermitis Mütter</b>				p-Wert
	ja n	%	nein n	%	
IFN- $\gamma$ P/I 24h					<b>0,057*</b>
0	2	22,2	0	0,0	
>0	7	77,8	27	100,0	

**Tabelle 21: Unterschiede in der Zytokinexpression der Bauernkinder bei Neurodermitis der Mütter (Zytokinkategorien 0,1)**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Kinder (%) angegeben. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des  $\chi^2$  Tests berechnet.  $p < 0,06$  wurde als auffällig, aber nicht statistisch signifikant (kursiv gedruckt) angesehen.

\*mindestens eine Zelle hat eine erwartete Häufigkeit  $< 5$ , deshalb Anwendung des exakten Tests nach Fisher

	<b>Neurodermitis Mütter</b>				p-Wert
	ja		nein		
	n	%	n	%	
Umgang mit Silage					<b>0,031*</b>
ja	5	55,6	23	92	
nein	4	44,4	2	8	

**Tabelle 22: Zusammenhang zwischen Umgang mit Silage und Neurodermitis bei den Müttern**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Personen (%) angegeben. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des  $\chi^2$  Tests berechnet.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant (fett gedruckt) angesehen.

\*mindestens eine Zelle hat eine erwartete Häufigkeit  $< 5$ , deshalb Anwendung des exakten Tests nach Fisher

	<b>unabgekochte Bauernhofmilch Mütter</b>				p-Wert
	ja		nein		
	n	%	n	%	
IL-5 LPS 48h					<b>0,004</b>
0	37	61,7	5	25,0	
>0	23	38,3	15	75,0	

**Tabelle 23: Unterschiede in der Zytokinexpression der Bauernkinder bei Bauernhofmilchkonsum der Mütter (Zytokinkategorien 0,1)**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Kinder (%) angegeben. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des  $\chi^2$  Tests berechnet.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant (fett gedruckt) angesehen.

	<b>unabgekochte Bauernhofmilch Mütter</b>				p-Wert
	ja		nein		
	n	%	n	%	
Umgang mit Silage					<b>0,037*</b>
ja	55	87,3	12	63,2	
nein	8	12,7	7	36,8	

**Tabelle 24: Zusammenhang zwischen Umgang mit Silage und Bauernhofmilchkonsum bei den Müttern**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Personen (%) angegeben. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des  $\chi^2$  Tests berechnet.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant (fett gedruckt) angesehen.

\*mindestens eine Zelle hat eine erwartete Häufigkeit  $< 5$ , deshalb Anwendung des exakten Tests nach Fisher

	Allergie in der Schwangerschaft				p-Wert
	ja		nein		
	n	%	n	%	
IFN- $\gamma$ P/I 48h					<b>0,054*</b>
0	3	27,3	4	6,0	
>0	8	72,7	63	94,0	

**Tabelle 25: Unterschiede in der Zytokinexpression der Bauernkinder bei Allergien während der Schwangerschaft der Mütter (Zytokinkategorien 0,1)**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Kinder (%) angegeben. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des  $\chi^2$  Tests berechnet.  $p < 0,06$  wurde als auffällig, aber nicht statistisch signifikant (kursiv gedruckt) angesehen.

\*mindestens eine Zelle hat eine erwartete Häufigkeit  $< 5$ , deshalb Anwendung des exakten Tests nach Fisher

	Allergie in der Schwangerschaft				p-Wert
	ja		nein		
	n	%	n	%	
Umgang mit Silage					<b>0,038</b>
ja	7	58,3	60	85,7	
nein	5	41,7	10	14,3	
Umgang mit Heu					<b>0,001*</b>
ja	7	58,3	68	97,1	
nein	5	41,7	2	2,9	

**Tabelle 26: Zusammenhang zwischen Umgang mit Silage bzw. Umgang mit Heu und Allergie während der Schwangerschaft bei den Müttern**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Personen (%) angegeben. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des  $\chi^2$  Tests berechnet.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant (fett gedruckt) angesehen.

\*mindestens eine Zelle hat eine erwartete Häufigkeit  $< 5$ , deshalb Anwendung des exakten Tests nach Fisher

	Diagnose Neurodermitis Kinder						p-Wert
	nie		einmal		mehrmals		
	n	%	n	%	n	%	
IL-5 P/I 48h							<b>0,042</b>
0	4	5,5	1	50,0	0	0,0	
>0	69	94,5	1	50,0	1	100,0	
IFN- $\gamma$ P/I 24h							<b>0,04</b>
0	4	5,4	1	50	0	0	
>0	70	94,6	1	50	1	100	

**Tabelle 27: Unterschiede in der Zytokinexpression der Bauernkinder bei Diagnose Neurodermitis (Zytokinkategorien 0,1)**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Kinder (%) angegeben. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des  $\chi^2$  Tests berechnet.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant (fett gedruckt) angesehen.

<b>unabgekochte Bauernhofmilch Kinder</b>					
	ja		nein		p-Wert
	n	%	n	%	
TNF- $\alpha$ LPS 48h					<b>0,008*</b>
0	0	0,0	15	26,8	
>0	20	100,0	41	73,2	
TNF- $\alpha$ SEB 48h					<b>0,023</b>
0	2	10,5	22	38,6	
>0	17	89,5	35	61,4	

**Tabelle 28: Unterschiede in der Zytokinexpression der Bauernkinder bei Konsum von unabgekochter Bauernhofmilch (Zytokinkategorien 0,1)**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Kinder (%) angegeben. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des  $\chi^2$  Tests berechnet.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant (fett gedruckt) angesehen.

\*mindestens eine Zelle hat eine erwartete Häufigkeit  $< 5$ , deshalb Anwendung des exakten Tests nach Fisher

<b>H-Milch Kinder</b>					
	ja		nein		p-Wert
	n	%	n	%	
TNF- $\alpha$ SEB 24h					<b>0,029*</b>
0	0	0,0	20	31,3	
>0	12	100,0	44	68,7	
TNF- $\alpha$ SEB 48h					<b>0,052*</b>
0	1	7,7	23	36,5	
>0	12	92,3	40	63,5	

**Tabelle 29: Unterschiede in der Zytokinexpression der Bauernkinder bei Konsum von H-Milch (Zytokinkategorien 0,1)**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Kinder (%) angegeben. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des  $\chi^2$  Tests berechnet.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant (fett gedruckt)  $p < 0,06$  wurde als auffällig, aber nicht statistisch signifikant (kursiv gedruckt) angesehen.

\*mindestens eine Zelle hat eine erwartete Häufigkeit  $< 5$ , deshalb Anwendung des exakten Tests nach Fisher

<b>H-Milch Kinder</b>					
	ja		nein		p-Wert
	n	%	n	%	
Reinigen der Tiere					<b>0,023</b>
ja	10	83,3	33	47,8	
nein	2	16,7	36	52,2	

**Tabelle 30: Zusammenhang zwischen Reinigen der Tiere durch die Mütter während der Schwangerschaft und H-Milchkonsum der Kinder**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Kinder (%) angegeben. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des  $\chi^2$  Tests berechnet.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant (fett gedruckt) angesehen.

Nicht adjustierte und adjustierte Odds Ratio der Tätigkeiten der Bäuerinnen während der Schwangerschaft, welche mit der Zytokinexpression der Kinder assoziiert sind, werden in Tabelle 31-43 aufgeführt.

---

#### IL-5 Expression nach SEB 48h Stimulation

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR
	OR	95% KI	p-Wert	
Reinigen der Tiere	2,73	0,87-8,55	<b>0,085</b>	keine Adjustierung nötig

**Tabelle 31: Unterschiede in der IL-5 Expression der Kinder nach SEB 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Reinigen der Tiere durch die Mütter während der Schwangerschaft**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse. Es war keine Adjustierung nötig, da keine potentiellen confounder festgestellt werden konnten. Eine negative Korrelation lag bei  $OR < 1$ , eine positive Korrelation bei  $OR > 1$  vor.

Die IL-5 Expression nach SEB 48h Stimulation war positiv assoziiert mit der Tätigkeit Reinigen der Tiere (OR, 2,73; KI, 0,87-8,55), allerdings war der Unterschied zwar auffällig, aber nicht signifikant ( $p = 0,085$ ). Es war keine Adjustierung auf confounder nötig.

---

#### IL-5 Expression nach PI 48h Stimulation

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR		
	OR	95% KI	p-Wert	aOR	95% KI	p-Wert
Umgang mit Heu	8,67	1,17-64,5	<b>0,035</b>	22,68*	1,33-385,68	<b>0,031</b>

**Tabelle 32: Unterschiede in der IL-5 Expression der Kinder nach PI 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Heu**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse.

\*adjustiert auf Allergie in der Schwangerschaft

Auch die IL-5 Expression nach P/I 48h Stimulation war positiv assoziiert mit der Tätigkeit Umgang mit Heu (OR, 8,67; KI, 1,17-64,5). Das Ergebnis war signifikant ( $p = 0,035$ ). Nach Adjustierung auf den potentiellen confounder Allergie während der Schwangerschaft blieb das Ergebnis signifikant ( $p = 0,031$ ) und der Effekt wurde sogar noch deutlicher (aOR, 22,68), jedoch mit extrem breitem Konfidenzintervall (KI, 1,33-385,68).

---

**IL-5 Expression nach LPS 48h Stimulation**

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR		
	OR	95% KI	p-Wert	aOR	95% KI	p-Wert
Umgang mit Silage	0,24	0,07-0,83	<b>0,024</b>	0,1*	0,01-1,93	0,127

**Tabelle 33: Unterschiede in der IL-5 Expression der Kinder nach LPS 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Silage**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse.

\*adjustiert auf Allergischer Schnupfen, Bauernhofmilchkonsum, Neurodermitis, Allergie in der Schwangerschaft (jeweils von den Müttern)

Bei der IL-5 Expression nach LPS 48h Stimulation verhielt es sich jedoch anders, hier konnte eine negative Assoziation mit den Tätigkeit Umgang mit Silage (OR, 0,24; KI, 0,07-0,83) festgestellt werden. Nach Adjustierung auf Allergischer Schnupfen, Bauernhofmilch, Neurodermitis, Allergie in der Schwangerschaft (jeweils von den Müttern) wurde der Effekt noch ausgeprägter, allerdings war das Ergebnis nicht mehr signifikant (aOR, 0,1; KI, 0,01-1,93; p= 0,127).

---

**IL-5 Expression nach LPS 48h Stimulation**

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR		
	OR	95% KI	p-Wert	aOR	95% KI	p-Wert
Umgang mit Kompost	0,42	0,17-1,06	<b>0,065</b>	0,37*	0,14-0,98	<b>0,044</b>

**Tabelle 34: Unterschiede in der IL-5 Expression der Kinder nach LPS 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Kompost**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse.

\*adjustiert auf Allergischer Schnupfen der Mütter

Auch die IL-5 Expression nach LPS 48h Stimulation war negativ assoziiert mit Umgang mit Kompost (OR, 0,42; KI, 0,17-1,06). Das Ergebnis wurde jedoch erst nach Adjustierung auf allergischer Schnupfen der Mütter signifikant (p= 0,044; aOR, 0,37; KI, 0,14-0,98).

---

**IFN- $\gamma$  Expression nach PI 24h Stimulation**

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR		
	OR	95% KI	p-Wert	aOR	95% KI	p-Wert
Umgang mit Heu	24,38	3,12-190,18	<b>0,002</b>	37,67*	2,21-640,93	<b>0,012</b>

**Tabelle 35: Unterschiede in der IFN- $\gamma$  Expression der Kinder nach PI 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Heu**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse.

\*adjustiert auf Allergie in der Schwangerschaft

Die IFN- $\gamma$  Expression nach PI 24h Stimulation dagegen war positiv assoziiert mit der Tätigkeit Umgang mit Heu (OR, 24,38; KI, 3,12-190,18) und deutlich signifikant (p=

0,002). Nach Adjustierung auf Allergie in der Schwangerschaft blieb das Ergebnis signifikant (p= 0,012) und der Effekt wurde noch ausgeprägter, allerdings lag ein extrem breites Konfidenzintervall vor (aOR, 37,67; KI, 2,21-640,93).

---

#### IFN- $\gamma$ Expression nach PI 24h Stimulation

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR	
	OR	95% KI	p-Wert	aOR	95% KI
Umgang mit Silage	7,13	1,07-47,37	<b>0,042</b>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>

**Tabelle 36: Unterschiede in der IFN- $\gamma$  Expression der Kinder nach PI 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Silage**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse.

<sup>1</sup> Adjustierung mit SPSS nicht möglich, da ein Feld einen Nullwert aufwies

Ebenso war die IFN- $\gamma$  Expression nach PI 24h Stimulation positiv assoziiert mit der Tätigkeit Umgang mit Silage (OR, 7,13; KI, 1,07- 47,37).

---

#### IFN- $\gamma$ Expression nach PI 48h Stimulation

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR		
	OR	95% KI	p-Wert	aOR	95% KI	p-Wert
Umgang mit Heu	28	4,22-185,84	<b>0,001</b>	32,41*	2,5-419,76	<b>0,008</b>

**Tabelle 37: Unterschiede in der IFN- $\gamma$  Expression der Kinder nach PI 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Heu**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse.

\*adjustiert auf Allergie in der Schwangerschaft

Die IFN- $\gamma$  Expression nach PI 48h Stimulation war ebenfalls positiv assoziiert mit der Tätigkeit Umgang mit Heu, jedoch wiederum mit einem breitem Konfidenzintervall (OR, 28; KI, 4,22-185,84). Der p-Wert betrug 0,001. Nach Adjustierung auf Allergie in der Schwangerschaft blieb das Ergebnis signifikant, allerdings wurde das Konfidenzintervall noch breiter (aOR, 32,41; KI, 2,5- 419,76).

---

#### IFN- $\gamma$ Expression nach PI 48h Stimulation

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR		
	OR	95% KI	p-Wert	aOR	95% KI	p-Wert
Umgang mit Silage	6,67	1,31-34,06	<b>0,023</b>	4,58*	0,2-103,82	0,339

**Tabelle 38: Unterschiede in der IFN- $\gamma$  Expression der Kinder nach PI 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Silage**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse.

\*adjustiert auf Allergischer Schnupfen, Bauernhofmilch, Neurodermitis, Allergie in der Schwangerschaft (jeweils von den Müttern)

Die gleiche positive Assoziation konnte für die IFN- $\gamma$  Expression nach PI 48h Stimulation mit der Tätigkeit Umgang mit Silage festgestellt werden (OR, 6,67; KI, 1,31-

34,06), ebenfalls mit signifikantem Ergebnis ( $p=0,023$ ). Nach Adjustierung auf Allergischer Schnupfen, Bauernhofmilch, Neurodermitis und Allergie in der Schwangerschaft (jeweils von den Müttern) war das Ergebnis allerdings nicht mehr signifikant ( $p=0,339$ ), obgleich die Odds ratio weiterhin erhöht war. (aOR, 4,58; KI, 0,2-103,82).

---

#### TNF- $\alpha$ Expression nach LPS 24h Stimulation

	Nicht- adjustierte OR		p-Wert	Adjustierte OR
	OR	95% KI		
Entmisten	3,92	0,86-17,83	<b>0,077</b>	keine Adjustierung nötig

**Tabelle 39: Unterschiede in der TNF- $\alpha$  Expression der Kinder nach LPS 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Entmisten der Mütter während der Schwangerschaft**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse. Es war keine Adjustierung nötig, da keine potentielle confounder festgestellt werden konnten.

Auch die TNF- $\alpha$  Expression nach LPS 24h Stimulation war positiv assoziiert mit der Tätigkeit Entmisten (OR, 3,92; KI, 0,86-17,83), allerdings war das Ergebnis zwar auffällig, aber nicht signifikant ( $p=0,077$ ). Hier war keine Adjustierung auf potentielle confounder nötig.

---

#### TNF- $\alpha$ Expression nach SEB 24h Stimulation

	Nicht- adjustierte OR		p-Wert	Adjustierte OR
	OR	95% KI		
Entmisten	5,03	1,53-16,51	<b>0,008</b>	keine Adjustierung nötig

**Tabelle 40: Unterschiede in der TNF- $\alpha$  Expression der Kinder nach SEB 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Entmisten der Mütter während der Schwangerschaft**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse. Es war keine Adjustierung nötig, da keine potentiellen confounder festgestellt werden konnten.

Die TNF- $\alpha$  Expression nach SEB 24h Stimulation war positiv assoziiert mit der Tätigkeit Entmisten (OR, 5,03; KI, 1,53-16,51). Der p-Wert betrug 0,008. Hier war keine Adjustierung nötig.

---

#### TNF- $\alpha$ Expression nach SEB 24h Stimulation

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR		
	OR	95% KI	p-Wert	aOR	95% KI	p-Wert
Reinigen der Tiere	4,15	1,36-12,68	<b>0,013</b>	3,29*	1,05-10,31	<b>0,04</b>

**Tabelle 41: Unterschiede in der TNF- $\alpha$  Expression der Kinder nach SEB 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Reinigen der Tiere durch die Mütter während der Schwangerschaft**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse.

\*adjustiert auf H-Milchkonsum Kinder

Auch die TNF- $\alpha$  Expression nach SEB 24h Stimulation war positiv assoziiert mit der Tätigkeit Reinigen der Tiere mit signifikantem Ergebnis ( $p= 0,013$ ; OR, 4,15; KI, 1,36-12,68). Nach Adjustierung auf H-Milchkonsum der Kinder blieb dieser Effekt erhalten ( $p= 0,04$ ; aOR, 3,29; KI, 1,05-10,31).

---

#### TNF- $\alpha$ Expression nach LPS 48h Stimulation

	Nicht- adjustierte OR		p-Wert	Adjustierte OR
	OR	95% KI		
Entmisten	3,2	0,93-11,03	<b>0,065</b>	keine Adjustierung nötig

**Tabelle 42: Unterschiede in der TNF- $\alpha$  Expression der Kinder nach LPS 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Entmisten der Mütter während der Schwangerschaft**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse. Es war keine Adjustierung nötig, da keine potentiellen confounder festgestellt werden konnten.

Ebenso war die TNF- $\alpha$  Expression nach LPS 48h Stimulation positiv assoziiert mit Entmisten (OR, 3,2; KI, 0,93-11,03), allerdings nicht signifikant ( $p= 0,065$ ). Auch hier war keine Adjustierungen nötig.

---

#### TNF- $\alpha$ Expression nach SEB 48h Stimulation

	Nicht- adjustierte OR		p-Wert	Adjustierte OR
	OR	95% KI		
Entmisten	3,21	1,02-10,1	<b>0,046</b>	keine Adjustierung nötig

**Tabelle 43: Unterschiede in der TNF- $\alpha$  Expression der Kinder nach SEB 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Entmisten der Mütter während der Schwangerschaft**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse. Es war keine Adjustierung nötig, da keine potentiellen confounder festgestellt werden konnten.

Die gleiche positive Assoziation konnte bei der TNF- $\alpha$  Expression nach SEB 48h Stimulation mit Entmisten gesehen werden (OR, 3,21; KI, 1,02-10,1); hier war das Ergebnis signifikant ( $p= 0,046$ ). Auch hier war keine Adjustierung nötig.

#### 4.5.7. Einfluss der Exposition der Bauernkinder auf die Zytokindaten

Des Weiteren war von Interesse, herauszufinden, welchen Einfluss die Exposition der Kinder im ersten Lebensjahr gegenüber Mikroorganismen und Allergenen auf den Zytokinstatus hat. Hierfür wurde die Anwesenheit der Kinder im Stall, bei der Fütterung der Tiere und bei der Heuernte im Vergleich zu den Zytokindaten untersucht. In Tabelle 44 sind nur diejenigen Zytokine aufgeführt, für welche ein signifikanter (fett gedruckt) bzw. auffälliger, aber nicht signifikanter (kursiv gedruckt) Wert festgestellt werden konnte. Da es sich hierbei oft um kleinere Fallzahlen von Personen handelte, wurde bei einer Häufigkeit  $<5$  der exakte Test nach Fisher angewendet.

Bezüglich des Stallaufenthalts der Kinder konnten keinerlei Unterschiede festgestellt werden.

Die Anwesenheit der Kinder während der Fütterung der Tiere führte zu keinem signifikanten Unterschied in den Zytokindaten, allerdings konnten zwei auffällige Werte

festgestellt werden für IL5 PI 24h (p= 0,071) und IL-10 PI 24h (p= 0,076). Hierbei wiesen die Kinder, welche nicht bei der Fütterung anwesend waren, ausschließlich positive Werte auf. Für die Anwesenheit der Kinder bei der Heuernte konnten signifikante Unterschiede in der IL-10 Expression nach LPS und SEB 24h Stimulation nachgewiesen werden (p= 0,039 bzw. p= 0,021). Die Kinder, die bei der Heuernte nicht anwesend waren, wiesen häufiger positive Werte auf. Ähnlich verhielt es sich für die TNF- $\alpha$  LPS 24h Werte, auch hier hatten diese Kinder häufiger positive Werte, wenn auch der Unterschied nicht signifikant war (p= 0,092).

	Stallaufenthalt Kinder		kein Stallaufenthalt Kinder		p-Wert
	n	%	n	%	
keine signifikanten Unterschiede feststellbar					
	Kinder anwesend bei Fütterung		Kinder nicht anwesend		p-Wert
	n	%	n	%	
IL-5 PI 24h					<b>0,071*</b>
0	5	13,5	0	0,0	
>0	32	86,5	26	100,0	
IL-10 PI 24h					<b>0,076*</b>
0	5	13,5	0	0,0	
>0	32	86,5	25	100,0	
	Kinder anwesend bei Heuernte		Kinder nicht anwesend		p-Wert
	n	%	n	%	
IL-10 LPS 24h					<b>0,039*</b>
0	3	16,7	1	1,7	
>0	15	83,3	57	98,3	
IL-10 SEB 24h					<b>0,021*</b>
0	4	23,5	2	3,4	
>0	13	76,5	56	96,6	
TNF- $\alpha$ LPS 24h					<b>0,092*</b>
0	4	22,2	4	7,1	
>0	14	77,8	52	92,9	

**Tabelle 44: Unterschiede in der Zytokinexpression der Kinder bei unterschiedlicher Exposition der Kinder auf dem Bauernhof (Zytokinkategorien 0,1)**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Kinder (%) angegeben. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des  $\chi^2$  Tests berechnet. p< 0,05 wurde als statistisch signifikant (fett gedruckt), p< 0,1 wurde als auffällig, aber nicht signifikant angesehen (kursiv gedruckt).

\*mindestens eine Zelle hat eine erwartete Häufigkeit <5, deshalb Anwendung des exakten Tests nach Fisher

#### 4.5.8. Regressionsanalyse der Zytokine im Vergleich zur Exposition der Bauernkinder

Auch hier wurde wiederum eine binär logistische Regressionsanalyse durchgeführt (s. Tabelle 45-46).

Als mögliche confounder wurden Husten ohne Erkältung, pfeifender Atem ohne Erkältung, Hautausschlag, Diagnose Bronchitis, Diagnose Asthma, Diagnose Neurodermitis, Diagnose Lungenentzündung, Diagnose Pseudokrupp, Nahrungsmittelunverträglichkeit, Konsum von unabgekochter bzw. abgekochter Bauernhofmilch, Vorzugsmilch, pasteurisierter Milch, H-Milch und Milchpulver (jeweils von den Kindern) betrachtet. Da sich jedoch nach beidseitiger Prüfung mittels  $\chi^2$  Test sowohl gegen den Expositionstatus der Kinder, als auch gegen den Zytokinwert nie p<

0,06 ergab, war in der Regressionsanalyse keine Adjustierung auf potentielle confounder nötig.

---

#### IL-10 Expression nach LPS 24h Stimulation

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR
	OR	95% KI	p-Wert	
Kinder anwesend bei Heuernte	0,88	0,009-0,91	<b>0,041</b>	keine Adjustierung nötig

**Tabelle 45: Unterschiede in der IL-10 Expression der Kinder nach LPS 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Anwesenheit der Kinder bei der Heuernte**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse. Es war keine Adjustierung nötig, da keine potentielle confounder festgestellt werden konnten.

Die IL-10 Expression nach LPS 24h Stimulation war negativ assoziiert mit der Anwesenheit der Kinder bei der Heuernte (OR, 0,88; KI, 0,009-0,91). Der Unterschied war signifikant mit  $p=0,041$ .

---

#### IL-10 Expression nach SEB 24h Stimulation

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR
	OR	95% KI	p-Wert	
Kinder anwesend bei Heuernte	0,116	0,019-0,70	<b>0,019</b>	keine Adjustierung nötig

**Tabelle 46: Unterschiede in der IL-10 Expression der Kinder nach SEB 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Anwesenheit der Kinder bei der Heuernte**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse. Es war keine Adjustierung nötig, da keine potentielle confounder festgestellt werden konnten.

Auch die IL-10 Expression nach SEB 24h Stimulation war negativ assoziiert mit der Anwesenheit der Kinder bei der Heuernte (OR, 0,116; KI, 0,019-0,7). Der Unterschied war wiederum signifikant mit  $p=0,019$ .

#### 4.5.9. Zusammenhang zwischen den Tätigkeiten der Bäuerinnen während der Schwangerschaft und der Exposition der Kinder im ersten Lebensjahr

Abschließend stellte sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen den Tätigkeiten der Bäuerinnen während der Schwangerschaft und der Exposition der Kinder im ersten Lebensjahr besteht, oder ob die beobachteten Effekte unabhängig voneinander sind. Hierfür wurden Kategorien gebildet, bei denen zwischen „mindestens eine Exposition der Kinder im ersten Lebensjahr“ vs. „keine Exposition“ bzw. „mindestens eine Exposition der Mütter während der Schwangerschaft“ vs. „keine Exposition“ unterschieden wurde. Da lediglich zwei Mütter keine Exposition während der Schwangerschaft aufwiesen, wurden für das weitere Vorgehen zwischen der Kategorie „mindestens 2 Expositionen der Mütter während der Schwangerschaft“ und der Kategorie „keine 2 Expositionen“ unterschieden (s. Tabelle 47).

	Exposition Kinder <sup>3</sup>		keine Exposition Kinder		p-Wert
	n	%	n	%	
Exposition Mütter <sup>1</sup>	58	98,3	19	95,0	0,445*
keine Exposition Mütter	1	1,7	1	5,0	
					<b>0,041*</b>
mind. 2 Expositionen Mütter <sup>2</sup>	55	93,2	15	75,0	
keine 2 Expositionen Mütter	4	6,8	5	25,0	

**Tabelle 47: Zusammenhang zwischen der Exposition der Mütter während der Schwangerschaft und der Exposition der Kinder im ersten Lebensjahr**

Die Ergebnisse sind als Anzahl der Kinder (%) angegeben. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des  $\chi^2$  Tests berechnet.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant (fett gedruckt) angesehen.

<sup>1</sup>Exposition Mütter = Mütter üben mindestens eine der Tätigkeiten entmisten, reinigen der Tiere, Umgang mit Silage, Umgang mit Heu, Umgang mit Kompost während der Schwangerschaft aus  
<sup>2</sup>mind. 2 Expositionen Mütter = Mütter üben mindestens zwei der Tätigkeiten entmisten, reinigen der Tiere, Umgang mit Silage, Umgang mit Heu, Umgang mit Kompost während der Schwangerschaft aus

<sup>3</sup>Exposition Kinder = Kinder sind mindestens einer Exposition im ersten Lebensjahr ausgesetzt (von Kinder anwesend bei Fütterung, Kinder anwesend bei Heuernte, Stallaufenthalt Kinder)

\*mindestens eine Zelle hat eine erwartete Häufigkeit  $< 5$ , deshalb Anwendung des exakten Tests nach Fisher

Anschließend wurde eine binär logistische Regressionsanalyse durchgeführt (s. Tabelle 48-58). Bei Tätigkeiten der Mütter während der Schwangerschaft, für die signifikante Werte ermittelt werden konnten, wurde auf „Exposition der Kinder“ adjustiert bzw. bei signifikanten Werten für Expositionen der Kinder wurde auf „mind. 2 Expositionen der Mütter“ adjustiert.

#### IL-5 Expression nach LPS 48h Stimulation

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR		
	OR	95% KI	p-Wert	aOR	95% KI	p-Wert
Umgang mit Silage	0,24	0,07-0,83	<b>0,024</b>	0,21*	0,06-0,74	<b>0,016</b>

**Tabelle 48: Unterschiede in der IL-5 Expression der Kinder nach LPS 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter mit Silage während der Schwangerschaft**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse.

\*adjustiert auf Exposition der Kinder

Bei der IL-5 Expression nach LPS 48h Stimulation konnte eine negative Assoziation mit den Tätigkeit Umgang mit Silage (OR, 0,24; KI, 0,07-0,83) festgestellt werden. Nach Adjustierung auf Exposition der Kinder wurde der Effekt noch etwas ausgeprägter, das Ergebnis blieb signifikant (aOR, 0,21; KI, 0,06-0,74;  $p = 0,016$ ).

---

**IL-5 Expression nach PI 48h Stimulation**

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR		
	OR	95% KI	p-Wert	aOR	95% KI	p-Wert
Umgang mit Heu	8,67	1,17-64,5	<b>0,035</b>	9,64*	1,19-78,25	<b>0,034</b>

**Tabelle 49: Unterschiede in der IL-5 Expression der Kinder nach PI 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Heu**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse.

\*adjustiert auf Exposition der Kinder

Die IL-5 Expression nach P/I 48h Stimulation war positiv assoziiert mit der Tätigkeit Umgang mit Heu (OR, 8,67; KI, 1,17-64,5). Das Ergebnis war signifikant ( $p=0,035$ ). Nach Adjustierung auf Exposition der Kinder blieb das Ergebnis signifikant ( $p=0,034$ ) und der Effekt wurde sogar noch etwas deutlicher (aOR, 9,64), jedoch mit breiterem Konfidenzintervall (KI, 1,19-78,25).

---

**IFN- $\gamma$  Expression nach PI 24h Stimulation**

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR		
	OR	95% KI	p-Wert	aOR	95% KI	p-Wert
Umgang mit Heu	24,38	3,12-190,18	<b>0,002</b>	20,69	2,41-177,61	<b>0,006</b>

**Tabelle 50: Unterschiede in der IFN- $\gamma$  Expression der Kinder nach PI 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Heu**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse.

\*adjustiert auf Exposition der Kinder

Ebenso war die IFN- $\gamma$  Expression nach PI 24h Stimulation positiv assoziiert mit der Tätigkeit Umgang mit Heu (OR, 24,38; KI, 3,12-190,18) und deutlich signifikant ( $p=0,002$ ). Nach Adjustierung auf Exposition der Kinder blieb das Ergebnis signifikant ( $p=0,006$ ) und der Effekt blieb ähnlich ausgeprägt, allerdings lag ein extrem breites Konfidenzintervall vor (aOR, 20,69; KI, 2,41-177,61).

---

**IFN- $\gamma$  Expression nach PI 24h Stimulation**

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR		
	OR	95% KI	p-Wert	aOR	95% KI	p-Wert
Umgang mit Silage	7,13	1,07-47,37	<b>0,042</b>	6,07*	0,86-42,86	<b>0,071</b>

**Tabelle 51: Unterschiede in der IFN- $\gamma$  Expression der Kinder nach PI 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Silage**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse.

\*adjustiert auf Exposition der Kinder

Auch die IFN- $\gamma$  Expression nach PI 24h Stimulation war positiv assoziiert mit der Tätigkeit Umgang mit Silage (OR, 7,13; KI, 1,07- 47,37). Nach Adjustierung auf Exposition der Kinder blieb der Effekt ähnlich ausgeprägt (aOR, 6,07; KI, 0,86-42,86), allerdings war das Ergebnis nicht mehr signifikant ( $p=0,071$ ).

---

**IFN- $\gamma$  Expression nach PI 48h Stimulation**

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR		
	OR	95% KI	p-Wert	aOR	95% KI	p-Wert
Umgang mit Heu	28	4,22-185,84	<b>0,001</b>	24,41*	3,6-165,4	<b>0,001</b>

**Tabelle 52: Unterschiede in der IFN- $\gamma$  Expression der Kinder nach PI 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Heu**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse.

\*adjustiert auf Exposition der Kinder

Die IFN- $\gamma$  Expression nach PI 48h Stimulation war ebenfalls positiv assoziiert mit der Tätigkeit Umgang mit Heu, jedoch wiederum mit einem breitem Konfidenzintervall (OR, 28; KI, 4,22-185,84). Der p-Wert betrug 0,001. Nach Adjustierung auf Exposition der Kinder zeigte sich kaum eine Veränderung in den Ergebnissen (p= 0,001; aOR, 24,41; KI, 3,6-165,4).

---

**IFN- $\gamma$  Expression nach PI 48h Stimulation**

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR		
	OR	95% KI	p-Wert	aOR	95% KI	p-Wert
Umgang mit Silage	6,67	1,31-34,06	<b>0,023</b>	5,87*	1,13-30,6	<b>0,036</b>

**Tabelle 53: Unterschiede in der IFN- $\gamma$  Expression der Kinder nach PI 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Silage**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse.

\*adjustiert auf Exposition der Kinder

Die gleiche positive Assoziation konnte für die IFN- $\gamma$  Expression nach PI 48h Stimulation mit der Tätigkeit Umgang mit Silage festgestellt werden (OR, 6,67; KI, 1,31-34,06), ebenfalls mit signifikantem Ergebnis (p= 0,023). Nach Adjustierung auf Exposition der Kinder blieb die positive Assoziation bestehen, wenn auch etwas weniger ausgeprägt, der p-Wert blieb signifikant. (p= 0,036; aOR, 5,87; KI, 1,13-30,6).

---

**TNF- $\alpha$  Expression nach SEB 24h Stimulation**

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR		
	OR	95% KI	p-Wert	aOR	95% KI	p-Wert
Entmisten	5,03	1,53-16,51	<b>0,008</b>	5,37*	1,51-19,11	<b>0,009</b>

**Tabelle 54: Unterschiede in der TNF- $\alpha$  Expression der Kinder nach SEB 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Entmisten der Mütter während der Schwangerschaft**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse.

\*adjustiert auf Exposition der Kinder

Die TNF- $\alpha$  Expression nach SEB 24h Stimulation war positiv assoziiert mit der Tätigkeit Entmisten (OR, 5,03; KI, 1,53-16,51). Der p-Wert betrug 0,008. Nach Adjustierung auf Exposition der Kinder blieben die Ergebnisse nahezu unverändert (p= 0,009; aOR, 5,37; KI, 1,51-19,11).

---

**TNF- $\alpha$  Expression nach SEB 24h Stimulation**

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR		
	OR	95% KI	p-Wert	aOR	95% KI	p-Wert
Reinigen der Tiere	4,15	1,36-12,68	<b>0,013</b>	4,27*	1,39- 13,18	<b>0,011</b>

**Tabelle 55: Unterschiede in der TNF- $\alpha$  Expression der Kinder nach SEB 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Reinigen der Tiere durch die Mütter während der Schwangerschaft**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse.

\*adjustiert auf Exposition der Kinder

Auch die TNF- $\alpha$  Expression nach SEB 24h Stimulation war positiv assoziiert mit der Tätigkeit Reinigen der Tiere mit signifikantem Ergebnis ( $p= 0,013$ ; OR, 4,15; KI, 1,36-12,68). Nach Adjustierung auf Exposition der Kinder blieb dieser Effekt erhalten ( $p= 0,011$ ; aOR, 4,27; KI, 1,39-13,18).

---

**TNF- $\alpha$  Expression nach SEB 48h Stimulation**

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR		
	OR	95% KI	p-Wert	aOR	95% KI	p-Wert
Entmisten	3,21	1,02-10,1	<b>0,046</b>	3,53*	1,05-11,81	<b>0,041</b>

**Tabelle 56: Unterschiede in der TNF- $\alpha$  Expression der Kinder nach SEB 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Entmisten der Mütter während der Schwangerschaft**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse.

\*adjustiert auf Exposition der Kinder

Die gleiche positive Assoziation konnte bei der TNF- $\alpha$  Expression nach SEB 48h Stimulation mit Entmisten gesehen werden (OR, 3,21; KI, 1,02-10,1); hier war das Ergebnis signifikant ( $p= 0,046$ ). Auch hier änderte sich nach Adjustierung auf Exposition der Kinder kaum etwas am Ergebnis ( $p= 0,041$ ; aOR, 3,53; KI, 1,05-11,81).

---

**IL-10 Expression nach LPS 24h Stimulation**

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR
	OR	95% KI	p-Wert	
Kinder bei Heuernte	0,88	0,009-0,91	<b>0,041</b>	n.d. <sup>1</sup>

**Tabelle 57: Unterschiede in der IL-10 Expression der Kinder nach LPS 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Anwesenheit der Kinder bei der Heuernte**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse.

<sup>1</sup> Adjustierung mit SPSS nicht möglich, da ein Feld einen Nullwert aufwies

Die IL-10 Expression nach LPS 24h Stimulation war negativ assoziiert mit der Anwesenheit der Kinder bei der Heuernte (OR, 0,88; KI, 0,009-0,91). Der Unterschied war signifikant mit  $p= 0,041$ . Hier war keine Adjustierung möglich.

---

**IL-10 Expression nach SEB 24h Stimulation**

	Nicht- adjustierte OR			Adjustierte OR		
	OR	95% KI	p-Wert	aOR	95% KI	p-Wert
Kinder bei Heuernte	0,116	0,019-0,7	<b>0,019</b>	0,076*	0,008-0,74	<b>0,076</b>

**Tabelle 58: Unterschiede in der IL-10 Expression der Kinder nach SEB 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Anwesenheit der Kinder bei der Heuernte**

Die Ergebnisse sind als OR mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Die Berechnung erfolgte mittels binär logistischer Regressionsanalyse.

\* adjustiert auf „mind. 2 Expositionen der Mütter während der Schwangerschaft“

Auch die IL-10 Expression nach SEB 24h Stimulation war negativ assoziiert mit der Anwesenheit der Kinder bei der Heuernte (OR, 0,116; KI, 0,019-0,7). Der Unterschied war signifikant mit  $p=0,019$ . Nach Adjustierung auf „mind. 2 Expositionen der Mütter während der Schwangerschaft“ blieb der Effekt ähnlich (aOR, 0,076; KI, 0,008-0,74), das Ergebnis war allerdings nicht mehr signifikant ( $p=0,076$ ).

## 5. Diskussion

### 5.1. Studie

Bei der PASTURE-Studie handelt es sich um eine prospektive, longitudinale Studie. Der Vorteil im Vergleich zu den oft üblichen Querschnittsstudien (beispielsweise die ALEX- oder PARSIFAL-Studie) [84, 99] ist, dass bei longitudinalen Studien die Kinder über mehrere Jahre hinweg begleitet werden und es sich nicht um eine Momentaufnahme handelt wie es bei Querschnittsstudien der Fall ist [100].

Um geeignete Krankenhäuser zu finden, in denen die Frauen rekrutiert werden sollten, wurde zunächst eine Pilotstudie durchgeführt. Eine Pilotstudie hat den Vorteil, dass Daten- und Probensammlungen getestet werden können; in dem Fall die Mitarbeit der Hebammen und eine ausreichende Anzahl an Geburten von Bäuerinnen in dem entsprechenden Krankenhaus [101]. Die in Deutschland ausgewählten Krankenhäuser von Peißenberg, Penzberg, Bad Tölz und Wolfratshausen liegen alle in Südbayern und in Kleinstädten von ähnlicher Größe. Dadurch werden regionalspezifische Unterschiede minimiert.

Des Weiteren ist es in Studien wichtig, systematische Fehler zu minimieren [102]. Deshalb galten allgemeine Ausschlusskriterien gleichermaßen für Bauern und Nichtbauern. Die Rekrutierung fand in Schwangerschaftskursen und durch Hebammen in den Kliniken statt. Bei der Wahl des Termins für die Blutabnahme und für die Interviews wurde auf die Bedürfnisse der Familien eingegangen und auch Termine am Wochenende angeboten, um allen Teilnehmern die Möglichkeit zu geben, die Termine wahrzunehmen. Die Datensammlung erfolgte bei Bauern und Nichtbauern am selben Ort (Blutentnahme im Krankenhaus, Interviews zu Hause) und durch dieselbe Technik. Es wurden validierte Fragebögen verwendet. Die Fragebögen basieren auf Fragen, welche bei der International Study of Allergy and Asthma in childhood (ISAAC), der Allergy and Endotoxin (ALEX) Studie und der PARSIFAL-(Prevention of Allergy- Risk factors for Sensitization in children related to farming and anthroposophic) Studie verwendet wurden [81, 86, 97]. Außerdem wurden auch Fragen aus dem Fragebogen der American Thoracic Society (ATS) miteingeschlossen [98]. Die Fragebögen wurden so konzipiert, dass sie sowohl Erkrankungen der Kinder und Eltern, als auch einen großen Bereich an landwirtschaftlicher Exposition beinhalten. Außerdem wurden Fragen nach möglichen Störfaktoren wie Passivrauchen, Schulbildung der Eltern, Familiengröße usw. in die Fragebögen eingeschlossen. Umfangreiche Maßnahmen zur Qualitätskontrolle wurden in der PASTURE-Studie betrieben, besonders bezüglich Feld- und Laborarbeit [103]. Die Reproduzierbarkeit der Arbeitsschritte wurde durch detaillierte Arbeitsanweisungen standardisiert.

Die Berechnung der benötigten Fallzahl mittels Powerkalkulation ergab, dass für die gesamte PASTURE-Studie 340 bzw. 400 (unter Berücksichtigung der drop-outs während der Studie) Probanden in jedem Studienarm benötigt wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Daten der deutschen Teilnehmer analysiert. Dies hat den Nachteil, dass nur eine kleinere Fallzahl an Probanden zur Verfügung stand und deshalb die Ergebnisse eine geringere Aussagekraft haben. Andererseits lagen jedoch homogenere Daten vor, weil z.B. keine unterschiedlichen Arten von Bauernhöfen und Landwirtschaft in verschiedenen Ländern zusammengefasst wurden. Außerdem sind trotz aller Qualitätssicherungsmaßnahmen zentrenbedingte Unterschiede in der Laborarbeit möglich und deshalb die Ergebnisse innerhalb eines Landes einheitlicher.

Die Anzahl an Bauern und Nichtbauern war in etwa gleich; genauso wies die Studienpopulation keine Unterschiede bezüglich Geschlecht und Erkrankungen der Kinder, Alter, Body Mass Index und Allergien der Mütter usw. auf. Signifikante Unterschiede zwischen Bauern- und Nichtbauernfamilien ergaben sich nur bezüglich

Anzahl der Geschwister, Bauernhofmilchkonsum in der Schwangerschaft, Rauchverhalten, Haltung von Haustieren und Schulbildung (jeweils von den Müttern) und Milchkonsum der Kinder. [82, 104].

Das Studiendesign wurde von den fünf lokalen Ethikkomitees für Studien an Menschen gebilligt.

## 5.2. Methoden

Zytokinkonzentrationen können auf mehrere Arten bestimmt werden. Zum einen unter Verwendung von mono- oder polyklonalen Antikörpern (wie bei ELISA, Durchflusszytometrie und Fluoreszenzimmunoassay), zum anderen durch die Quantifizierung der entsprechenden mRNA-Transkripte.

Die Bestimmung von mRNA mittels PCR stellt eine sensitivere Methode als der von uns verwendete ELISA Test dar, weil sie auch in unstimulierten Zellen funktioniert. Besonders sehr niedrige IL-5 und IFN- $\gamma$  Werte können eventuell durch PCR sensitiver erfasst werden [105]. Nachteil von ELISA gegenüber durchflusszytometrischen Methoden ist, dass hierbei nicht mehrere Zytokine gleichzeitig detektiert werden können und es nicht möglich ist, jedes Zytokin seinem sezernierenden Zelltyp zuzuordnen. Demgegenüber stehen die diversen Vorteile von ELISA. Es handelt sich hierbei um eine äußerst gut etablierte Methode, welche Einsatz in vielfältigsten Bereichen weltweit findet; sie ist kostengünstig und gerade bei großen Probenvolumen einfach und zeitsparend [106-109].

Die meisten Zytokine sind ohne vorherige zelluläre Stimulation in Körperflüssigkeiten gesunder Individuen nicht nachweisbar [110]. Deshalb wurden in dieser Studie die Stimulanzen LPS, P/I und SEB verwendet. Die Stimulanzen wurden zentral in Marburg auf die entsprechende Endkonzentration verdünnt und aliquotiert, um Schwankungen in der Durchführung zu reduzieren und die Stimulationsansätze zu standardisieren.

Ionomycin ist ein Calcium-Ionophor, d.h. es bindet Calcium durch Komplexbindung und ermöglicht seinen Transport durch Zellmembrane [111]. Dadurch kommt es zu einem massiven Calciumeinstrom in die Zelle. PMA ist ein Aktivator der Proteinkinase C. Die Aktivierung von Proteintyrosinkinasen und eine intrazelluläre Calcium-Mobilisierung stellen entscheidende Schritte bei der Aktivierung von T-Zellen durch Antigene dar [112, 113]. Dadurch imitieren Ionomycin und PMA die Antigenaktivierung bei T-Zellen. Die beiden Stimulanzen zeigen hierbei einen synergistischen Effekt, d.h. sie ergänzen und verstärken sich gegenseitig in ihrer Wirkung [112]. Die Kombination von P mit I ist ein sehr starkes Stimulans und stellt eigentlich eine unnatürliche Art von Stimulation dar, die so stark in der Natur nicht vorkommt. Andererseits ist es in Studien weit verbreitet, P/I als Stimulans zu verwenden, besonders beim Nachweis für intrazelluläre Zytokine [59, 114]. P/I induziert gleichermaßen sowohl die Produktion von T<sub>H</sub>1- als auch von T<sub>H</sub>2-Zytokinen [24, 114]. SEB stellt ein Superantigen dar, d.h. es verknüpft die Rezeptorbindungsstellen von MHC II Molekülen einer APC dauerhaft mit der V $\beta$ -Domäne des T-Zellrezeptors einer T-Zelle. SEB simuliert grampositive Bakterien und wird vielfältig als Stimulans verwendet [115-117]. LPS simuliert gramnegative Bakterien, da es sich hierbei um einen Bestandteil der äußeren Zellmembran dieser Bakterien handelt [118].

Die Verwendung verschiedener Stimulanzen kann zu unterschiedlichen Zytokinkonzentrationen führen [119]. Dies ist ein wichtiger Gesichtspunkt bei dem Vergleich verschiedener Studien untereinander. Die von uns gemessenen Zytokine IL-5, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  wurden sowohl nach den Gesichtspunkten ausgewählt, dass es sich hierbei um repräsentative Zytokine für T<sub>H</sub>1-Zellen (IL-12, IFN- $\gamma$ ), T<sub>H</sub>2-Zellen (IL-5), T<sub>reg</sub>-Zellen (IL-10) bzw. für eine Inflammation (TNF- $\alpha$ ) handelt als auch dass diese Zytokine generell gut detektierbar sind.

Ein mögliches Problem beim Nachweis von TNF- $\alpha$  kann sein, dass TNF- $\alpha$  zum Teil im Serum oder in Zellkulturüberständen mittels ELISA nicht nachweisbar ist [120]. Bei uns lag jedoch die Anzahl der nicht detektierbaren Messwerte für TNF- $\alpha$  nicht höher als für die anderen Zytokine und war sehr gering.

Neben der von uns verwendeten Methode, der Zytokinstimulation im Vollblut, gibt es auch noch die Möglichkeit der Stimulation von isolierten PBMCs. Dies stellt jedoch eine zeitaufwendigere und kostenintensivere Methode dar, welche gerade für größere Feldstudien ungeeignet ist [49]. Außerdem werden PBMCs bei ihrer Gewinnung aus ihrer natürlichen Umgebung entfernt, welche Faktoren enthält, die normalerweise die Zytokinproduktion regulieren [55, 121]. Dies kann das Zytokinproduktionsmuster beeinflussen. Gegen die Verwendung von PBMCs spricht auch, dass hierbei oft erhöhte Apoptoseraten festgestellt werden können [122]. Wie de Groot et al. untersucht haben, ist außerdem die Produktion von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  in Vollblut höher [123]. Des Weiteren sind Schwankungen in den Zytokinantworten zwischen den einzelnen Proben im Vollblut geringer als in PBMCs [123]. Deshalb wird Vollblut von einigen Autoren als am geeignetsten angesehen, um Zytokinproduktion *in vitro* zu untersuchen [49, 122, 123].

Eine mögliche Beeinträchtigung bei der Vollblutkulturtechnik ist allerdings, dass hier die Zytokinproduktion in einem bekannten Volumen an Blut gemessen wird. Deshalb ist die Zahl der verwendeten Zellen weder bekannt noch kann sie kontrolliert werden [55]. Folglich können Schwankungen in der Zytokinproduktion zwischen den Personen entweder von einer veränderten Anzahl zytokinproduzierender Zellen oder auch von einer veränderten Fähigkeit dieser Zellen, Zytokine zu produzieren, herrühren [55]. Aus diesem Grund wurde ein Differentialblutbild erstellt und die Zytokinkonzentrationen immer auf die Anzahl an Leukozyten bezogen. Je nach Dauer der Stimulation können sich unterschiedliche Zytokinkonzentrationen ergeben [119]. Hierbei ist es wünschenswert, den Zeitpunkt der Probennahme möglichst bei der höchsten Zytokinkonzentration zu wählen. So wurde in einer Studie von Miles et al festgestellt, dass nach 48h die höchsten Werte für IFN- $\gamma$  gemessen werden konnten (im Vergleich zu 24h und 72h) [49]. Auch für IL-5 (stimuliert mit SEB) wurde nach 48h die höchste Produktion gemessen [117]. Um für unsere Studie die geeignetsten Zeitpunkte herauszufinden, wurden im Vorfeld verschiedene Versuche zur Ermittlung der Zytokinkonzentrationen durchgeführt. Selbstverständlich ist nicht für jedes Zytokin derselbe Zeitpunkt am geeignetsten, jedoch war für alle Zytokine eine ausreichende Synthese nach 24h und 48h nachweisbar, weshalb diese Zeitpunkte gewählt wurden.

Eventuell nicht nachweisbare Zytokine können darauf zurückzuführen sein, dass LPS eventuell nicht das beste Stimulans für alle untersuchten Zytokine (besonders für IFN- $\gamma$ ) ist, sondern dass z. B. eine Kombination aus LPS mit PHA (Phytohemagglutinin) eine verlässlichere Zytokinproduktion bewirken könnte [123].

### 5.3. Ergebnisse

#### 5.3.1. Zytokindaten in Bezug zum Bauernstatus

In einem ersten Schritt wurden die Zytokinwerte als stetige Daten ausgewertet. Hierbei waren TNF- $\alpha$  (SEB 24h), IL-5 (PI 48h), IL-5 (LPS 48h) und IL-5 (SEB 48h) bei den Bauernkindern signifikant erhöht. Tendenziell, aber nicht signifikant waren IL-5 (SEB 24h), IL-10 (SEB 24h) und TNF- $\alpha$  (LPS 48h) bei den Bauernkindern erhöht, während INF- $\gamma$  (LPS 24h) bei den Nichtbauernkindern erhöht war.

Ein Problem bei dieser Auswertungsmethode ist, dass Zytokinwerte zwischen einzelnen Individuen stark schwanken [55, 125, 126]. Diese Schwankungen sind unabhängig von der Stimulationszeit und vom verwendeten Stimulans. Zum Beispiel berichten Jacob et al.

eine 20-fache Abweichung in der TNF- $\alpha$  Produktion bei LPS-stimulierten mononukleären Zellen [125]. Diese inter-individuellen Schwankungen sind möglicherweise teilweise auf Polymorphismen in den Genen zurückzuführen, welche die Zytokinproduktion kontrollieren [55]. Deshalb ist die Auswertung der Zytokinsynthese in Form stetiger Daten nur eingeschränkt aussagekräftig. Ein häufiges Phänomen ist das Auftreten von Zytokinwerten unterhalb des Detektionbereiches [55]. Dadurch war der Median einzelner Zytokine häufig Null, d.h. die Nullwerte könnten möglicherweise das Ergebnis verfälschen. Deshalb wurden im nächsten Schritt die Daten kategorisiert.

Bei der Einteilung in drei Kategorien (Kategorie 0: Zytokinwert =0, Kategorie 1: Zytokinwert  $\leq$ Median, Kategorie 2: Zytokinwert  $>$ Median) war INF- $\gamma$  (LPS 24h) bei den Nichtbauernkindern und IL-5 (SEB 48h) bei den Bauernkindern signifikant erhöht. Auch bei Betrachtung nur der positiven Werte war INF- $\gamma$  (LPS 24h und 48h) bei den Nichtbauernkindern signifikant erhöht.

Dies mag zunächst verwundern, da bei Neugeborenen mit einer sehr niedrigen IFN- $\gamma$  Produktion im Nabelschnurblut ein höheres Risiko besteht, später allergische Erkrankungen oder Asthma zu entwickeln [38, 127-129]. Dies gilt auch für erniedrigte IFN- $\gamma$  Spiegel in späteren Jahren [25, 59, 117]. IFN- $\gamma$  führt unter anderem dazu, dass die IgE Produktion in B-Lymphozyten unterdrückt wird [130]. Daher hätte man bei den Bauernkindern höhere IFN- $\gamma$  Werte vermutet, da bei Bauernkindern ein deutlich niedrigeres Risiko für die Entwicklung atopischer Erkrankungen besteht [80, 131-133]. Dagegen ist eine erhöhte Expression von T<sub>H</sub>2-Zytokinen, besonders IL-5, normalerweise mit atopischen Erkrankungen, wie z.B. atopischer Dermatitis assoziiert [134-136]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Proskesova, in der Zytokinwerte von Kindern mit gesunden und mit allergischen Müttern von der Geburt bis zum ersten Lebensjahr untersucht wurden, konnte jedoch gezeigt werden, dass Kinder allergischer Mütter im ersten Lebensjahr signifikant höhere IFN- $\gamma$  Werte haben [137]. Unterschiede bei der IL-5 Produktion bestanden nicht. Dagegen war IL-10 bei Kindern allergischer Mütter einige Tage nach der Geburt erhöht. Nach einem Jahr entsprachen die IL-10 Werte jedoch denen von Kindern nicht-allergischer Mütter [137]. In einer anderen Studie wurde festgestellt, dass bei Kindern mit atopischer Dermatitis keine Erhöhung der T<sub>H</sub>2-Zytokine vorlag [114]. So scheint nach Auffassung von Machura et al. die T<sub>H</sub>2-Zell Dominanz nicht generell bei Kindern mit atopischer Dermatitis vorzuherrschen [114].

Bei genauerer Betrachtung der drei Datenkategorien lag der Hauptunterschied zwischen Bauern- und Nichtbauernkindern in der Anzahl der nicht detektierbaren Messwerte. So konnte man bei den Nichtbauernkindern deutlich mehr nicht detektierbare Messwerte feststellen. Dies galt insbesondere für IL-5 (SEB 48h und LPS 48h), IL-10 (SEB 24h), IL-12 (SEB24h), IFN- $\gamma$  (SEB 24h) und TNF- $\alpha$  (SEB 24h). Offenbar kam es bei den Bauernkindern tendenziell zu einer erhöhten Expression aller gemessenen Zytokine.

Bei der Aufteilung der Daten in zwei Kategorien (Kategorie 0: Zytokinwert =0, Kategorie 1: Zytokinwert  $>$ 0) bestanden bei den Bauernkindern erhöhte IL-5 Werte nach Stimulation mit PI, LPS und SEB (nach 48h). Nach binär logistischer Regressionsanalyse und Adjustierung auf potentielle confounder blieb dieser Effekt bestehen. Jedoch war auch hier auffällig, dass bei allen gemessenen Zytokinen die Nichtbauernkinder eine erhöhte Anzahl an nicht detektierbaren Messwerten aufwiesen.

### 5.3.2. Zytokindaten in Zusammenhang mit den Tätigkeiten der Bäuerinnen

In unserer Studie konnten bei den Bäuerinnen, die während ihrer Schwangerschaft entmisteten oder die Tiere reinigten, signifikant erhöhte TNF- $\alpha$  bei ihren Kindern im ersten Lebensjahr festgestellt werden. Hohe TNF- $\alpha$  Konzentrationen nach der Geburt, aber auch in späteren Jahren, waren in anderen Studien mit einem niedrigeren Risiko für

atopische Erkrankungen assoziiert [38, 114, 138]. Ebenso wiesen Kinder von Müttern, die in der Schwangerschaft Umgang mit Heu oder Silage hatten, erhöhte IFN- $\gamma$  Werte auf. Hierzu komplementär sind Ergebnisse bei Nichtbauernkindern aus der Region Antwerpen, bei welchen eine erhöhte pränatale Exposition gegenüber Hausstaubmilben mit einem niedrigeren Prozentsatz an IFN- $\gamma$  produzierenden CD4+ T Lymphozyten assoziiert war [59]. Andere Studien konnten dies jedoch nicht bestätigen [139-141].

Bezüglich der IL-5 Werte waren die Ergebnisse uneinheitlich. Tendenziell waren die Werte bei den während der Schwangerschaft arbeitenden Bäuerinnen (z.B. bei Umgang mit Silage und Kompost) eher erniedrigt, jedoch gab es auch Beispiele, bei denen es sich umgekehrt verhielt (z.B. Umgang mit Heu und Reinigen der Tiere), wenngleich diese Ergebnisse nicht signifikant waren.

IL-10 war bei den Kindern erhöht, deren Mütter während der Schwangerschaft Tiere reinigten. IL-10 hat antiinflammatorische Eigenschaften und stimuliert das humorale Immunsystem [142, 143]. In einer Studie von van der Velden et al. trat bei einjährigen Kindern eine allergen-induzierte IL-10 Produktion nur bei Nichtatopikern auf [144]. In einer anderen Studie wurde bei Patienten mit allergischen Erkrankungen eine ungenügende Unterdrückung von T-Zellantworten durch regulatorische T-Zellen beobachtet [145]. Diese fehlende Unterdrückung war IL-10 abhängig. Dies deutet darauf hin, dass das Reinigen von Tieren in der Schwangerschaft durch Induktion von IL-10 möglicherweise einen protektiven Effekt vor allergischen Erkrankungen hat.

Für IL-12 konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Da äußere Einflüsse die Zytokinproduktion beeinflussen können, war es wichtig, in der Regressionsanalyse auf mögliche confounder zu adjustieren [55]. Hierbei wurden als mögliche confounder von den Müttern Alter, Body Mass Index, Anzahl der Geschwister, Bauernhofmilchkonsum während der Schwangerschaft, Asthma, allergischer Schnupfen, Hautausschlag, Neurodermitis, Allergie während der Schwangerschaft, Rauchen, Haustiere und Schulabschluss betrachtet, als mögliche confounder von den Kindern Husten ohne Erkältung, pfeifender Atem ohne Erkältung, Hautausschlag, Diagnose Bronchitis, Diagnose Asthma, Diagnose Neurodermitis, Diagnose Lungenentzündung, Diagnose Pseudokrupp, Nahrungsmittelunverträglichkeit, Konsum von unabgekochter bzw. abgekochter Bauernhofmilch, Vorzugsmilch, pasteurisierter Milch, H-Milch und Milchpulver.

Die beobachteten Effekte blieben nach Adjustierung auf mögliche confounder bestehen.

So scheinen diese Tätigkeiten, welche alle mit einer erhöhten Exposition gegenüber Mikroorganismen bzw. Allergenen verbunden sind, zu einer Erhöhung von T<sub>H</sub>1-Zytokinen (IFN- $\gamma$ ), generell inflammatorischen Zytokinen (TNF- $\alpha$ ) und zum Teil auch von regulatorischen Zytokinen (IL-10) zu führen. T<sub>H</sub>2-Zytokine dagegen sind tendenziell (IL-5) erniedrigt.

Dies unterstützt die These, dass frühzeitige, kontinuierliche und wiederholte Konfrontation mit Mikroorganismen den Organismus weniger empfänglich für die Entwicklung von Asthma und Allergien macht [146]. So konnten mehrere Querschnittsstudien belegen, dass Kontakt zu Vieh und unpasteurisierte Milch zu einer Toleranzentwicklung gegenüber Umweltallergenen führt [147]. Auch in Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass ein Schutz vor allergischer Sensibilisierung durch die Inhalation von LPS und anderen mikrobiellen Produkten erreicht werden kann [148, 149]. Allerdings bewirkt bei Kindern, die ein sehr hohes Risiko haben, an Asthma zu erkranken (beide Eltern Atopiker), eine Reduzierung der Exposition gegenüber Umweltantigenen weniger Atemwegssymptome im ersten Lebensjahr [139].

Unsere Ergebnisse bestätigen außerdem die in der PARSIFAL-Studie aufgestellte These, dass nur bestimmte Arten von Bauernhöfen und Tätigkeiten der Bauern einen protektiven Effekt vor Asthma haben [86].

### 5.3.3. Zytokindaten in Bezug zur Exposition der Bauernkinder

Die Kindheit stellt die Periode im Leben dar, in der das höchste Risiko der T-Zellsensibilisierung gegenüber Umweltantigenen besteht [150]. Deshalb war es uns auch wichtig, den Einfluss der Exposition der Kinder im ersten Lebensjahr genauer zu betrachten.

Bei unserer Untersuchung des Einflusses der Anwesenheit der Kinder bei der Fütterung, der Heuernte und im Stall im ersten Lebensjahr auf die Zytokindaten konnte nur bezüglich der IL-10 Werte (bei LPS und SEB 24h Stimulation) eine signifikante Erniedrigung bei den Kindern festgestellt werden, welche bei der Heuernte anwesend waren. Offenbar hat die Anwesenheit der Kinder bei der Heuernte gegenteilige Effekte wie das Reinigen der Tiere durch die Mütter. Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass bei arbeitsbedingten Atemwegssymptomen landwirtschaftliche Pflanzenstäube zu den stärksten auslösenden Faktoren zählen [151]. Es besteht wohl ein Unterschied zwischen der Exposition gegenüber Mikroorganismen, die im Stall und im Umgang mit Tieren auftreten und der Exposition gegenüber pflanzlichen Stäuben. Bei den Tätigkeiten der Mütter während der Schwangerschaft hatten dagegen offenbar beide Arten der Exposition einen protektiven Einfluss.

Ansonsten wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Interessanterweise hat anscheinend eine pränatale Exposition gegenüber Mikroorganismen (durch die Tätigkeiten der Mütter während der Schwangerschaft) einen größeren Einfluss als eine Exposition während des ersten Lebensjahres der Kinder. Diese Vermutung, dass die T-Zellprägung schon *in utero* stattfindet, bestätigen mehrere Studien [105, 152-155]. Der Zeitpunkt, zu dem Zellen des Fötus beginnen, auf Allergene zu reagieren, liegt in etwa um die 22. Schwangerschaftswoche [156]. In einer anderen Studie konnte unter Verwendung eines menschlichen Perfusionsmodells festgestellt werden, dass ein Transfer von inhalativen und von Nahrungsmittelallergenen durch die Plazenta hindurch stattfindet [157].

Jedoch spielen nicht nur Einflüsse während der Schwangerschaft und die Exposition im ersten Lebensjahr der Kinder eine Rolle bei der Entwicklung von Atopien. So konnte in einer dänischen Studie gezeigt werden, dass auch Bauern, die nicht auf einem Bauernhof aufgewachsen waren, ein niedrigeres Atopierisiko im Vergleich zu einer Kontrollgruppe aufwiesen [158]. Teilweise war der Einfluss der momentanen Exposition sogar größer als eine Exposition in der Kindheit [159].

Sicherlich tragen auch Ernährungsgewohnheiten, wie der Konsum von Fettsäuren und Antioxidantien einschließlich Vitamin C und E, zu den Unterschieden zwischen Bauern und Nichtbauern bei und sind assoziiert mit einem erniedrigten Allergierisiko [160]. So trinken Bauern häufiger Bauernhofmilch oder Vollmilch und essen mehr Butter, aber weniger Margarine [159]. Auch der Konsum von frischem Gemüse beeinflusst wahrscheinlich das Atopierisiko. In einer Studie wurde festgestellt, dass Bauern zwar nicht häufiger frisches Gemüse essen, jedoch ist das Gemüse häufiger aus dem eigenen Garten und dies ist assoziiert mit einem niedrigeren Atopierisiko [159]. Dies lässt vermuten, dass hier der mikrobielle Gehalt des Bodens eine Rolle spielt.

Es ist deshalb sicherlich kein einzelner Faktor, welcher Bauernkinder vor der Entwicklung von allergischen Erkrankungen schützt, sondern ein komplexes Zusammenspiel von Umwelt- und Lebensstilfaktoren.

#### 5.3.4. Unabhängigkeit der Tätigkeiten der Bäuerinnen während der Schwangerschaft und der Exposition der Kinder im ersten Lebensjahr

Bei der Untersuchung, ob ein Zusammenhang zwischen den Tätigkeiten der Bäuerinnen während der Schwangerschaft und der Exposition der Kinder im ersten Lebensjahr besteht, oder ob die beobachteten Effekte unabhängig voneinander sind wurde eine weitgehende Unabhängigkeit der Ergebnisse festgestellt. Lediglich bei der IFN- $\gamma$  Expression nach PI 24h Stimulation und der Tätigkeit Umgang mit Silage bzw. bei der IL-10 Expression nach SEB 24h und der Anwesenheit der Kinder bei der Heuernte war das Ergebnis nach Adjustierung nur noch auffällig, aber nicht mehr signifikant; bei allen anderen Ergebnissen blieben nach Adjustierung die Odds ratio, das Konfidenzintervall und die Signifikanz nahezu unverändert. Dies deutet darauf hin, dass die beobachteten Effekte - wie ein deutlicher Einfluss der Tätigkeiten der Bäuerinnen während der Schwangerschaft auf die Zytokinwerte der Kinder im ersten Lebensjahr und ein weniger starker Einfluss der Exposition der Kinder im ersten Lebensjahr auf die Zytokinwerte - tatsächlich vorhanden sind und nicht verfälscht wurden durch eine gegenseitige Abhängigkeit.

## 6. Zusammenfassung

### **Hintergrund:**

Allergische Erkrankungen haben in den letzten sechzig Jahren besonders bei Kindern und Jugendlichen deutlich zugenommen. Hierbei ist auffällig, dass bei Kindern, die auf einem Bauernhof aufwachsen, ein niedrigeres Risiko besteht, an Heuschnupfen und Asthma zu erkranken. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch unklar. Deshalb wurde die PASTURE-Studie (PASTURE= „Protection against Allergy: A Study in Rural Environments“) ins Leben gerufen, mit dem Ziel, genetische, immunologische und mikrobielle Faktoren, die zu diesem Allergieschutz führen, zu identifizieren und zu charakterisieren. Hierbei handelt es sich um eine prospektive longitudinale Studie, welche in ländlichen Gegenden von fünf europäischen Ländern durchgeführt wurde und zwar in Deutschland (Oberbayern), in der Schweiz (östlicher Teil), in Österreich (Raum Salzburg), in Finnland (Kuopio) und in Frankreich (Besançon).

### **Zielsetzung:**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, inwieweit sich die Zytokinexpression im Blut einjähriger Kinder aus 184 Bauernfamilien bzw. Nichtbauernfamilien, welche in der gleichen Gegend in Bayern leben, unterscheidet. Im Nebenschritt sollte untersucht werden, welchen Einfluss eine Exposition gegenüber Mikroorganismen und Allergenen auf das Allergierisiko hat. Hierbei sollte festgestellt werden, welchen Einfluss bestimmte Tätigkeiten der Mütter während der Schwangerschaft haben und inwiefern die Exposition der Kinder gegenüber diesen Faktoren im ersten Lebensjahr eine Rolle spielt.

### **Methoden:**

Anhand umfangreicher standardisierter Fragebögen, u.a. während der Schwangerschaft, im zweiten Lebensmonat und im ersten Lebensjahr der Kinder wurden Lebensstilfaktoren, Krankheiten, Ernährungsgewohnheiten, Kontakt zu Tieren und Exposition gegenüber Mikroorganismen und Allergenen der Familien erfasst. Peripheres Blut einjähriger Kinder wurde mit Phorbol ester/Ionomycin, Lipopolysaccharid und Staphylokokken enterotoxin B für 24h bzw. 48h stimuliert. In den Überständen wurden mittels ELISA die Zytokine IL-5, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  quantitativ erfasst.

### **Ergebnisse:**

Bei den Bauernkindern waren Zytokinwerte häufiger oberhalb der Nachweisgrenze feststellbar, insbesondere IL-5 war nach Stimulation mit P/I, LPS und SEB nach 48h erhöht. Tätigkeiten der Bäuerinnen während der Schwangerschaft hatten einen deutlichen Einfluss auf die Zytokinwerte der Kinder; so war „reinigen der Tiere“ mit erhöhten TNF- $\alpha$  und IL-10 Werten, „entmisten“ mit erhöhten TNF- $\alpha$  Werten und „Umgang mit Heu oder Silage“ mit erhöhten IFN- $\gamma$  Werten assoziiert. Die IL-5 Werte dagegen waren tendenziell erniedrigt (bei Umgang mit Silage und Kompost). Die Anwesenheit der Kinder bei der Heuernte war assoziiert mit erniedrigten IL-10 Werten. Die beobachteten Effekte bei den Tätigkeiten der Bäuerinnen während der Schwangerschaft und der Exposition der Kinder im ersten Lebensjahr waren unabhängig voneinander.

### **Schlussfolgerung:**

Das häufigere Auftreten von Zytokinwerten oberhalb der Nachweisgrenze deutet auf eine stärkere Aktivierung des Immunsystems bei den Bauernkindern hin; erstaunlich ist jedoch, dass besonders das T<sub>H</sub>2-Zytokin IL-5 erhöht war. Die erhöhten TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-10 bzw. erniedrigten IL-5-Werte bei bestimmten Tätigkeiten der Mütter während der Schwangerschaft deuten darauf hin, dass bei Kindern im ersten Lebensjahr T<sub>H</sub>1- und T<sub>reg</sub>-Zytokine erhöht und T<sub>H</sub>2-Zytokine erniedrigt sind, wenn deren Mütter in der Schwangerschaft einer erhöhten Exposition mit Allergenen und mikrobiellen Stimuli ausgesetzt sind. Die Exposition der Kinder während des ersten Lebensjahres hat

anscheinend einen geringeren Effekt als die pränatale Exposition; hier war lediglich die Anwesenheit der Kinder bei der Heuernte assoziiert mit erniedrigten IL-10 Werten. Es bleibt abzuwarten, ob die Analyse der anderen an der PASTURE-Studie beteiligten Länder diese Thesen bestätigt.

## 7. Anhang

### 7.1. Literaturverzeichnis

1. von Mutius, E., *Influences in allergy: epidemiology and the environment*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(3): p. 373-9; quiz 380.
2. Lipozencic, J., *A hundred years of "allergy" Clemens von Pirquet's essay "allergie", published on July 24, 1906 in Munchener Medizinische Wochenschrift*. Acta Dermatovenerol Croat, 2006. **14**(3): p. 206.
3. Calder, P.C., et al., *Early nutrition and immunity - progress and perspectives*. Br J Nutr, 2006. **96**(4): p. 774-90.
4. Kabesch, M. and R.P. Lauener, *Why Old McDonald had a farm but no allergies: genes, environments, and the hygiene hypothesis*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(3): p. 383-7.
5. Eder, W., M.J. Ege, and E. von Mutius, *The asthma epidemic*. N Engl J Med, 2006. **355**(21): p. 2226-35.
6. von Mutius, E., *Pro: the increase in asthma can be ascribed to cleanliness*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(7): p. 1106-7; discussion 1108-9.
7. Nowak, D., C. Suppli Ulrik, and E. von Mutius, *Asthma and atopy: has peak prevalence been reached?* Eur Respir J, 2004. **23**(3): p. 359-60.
8. Zöllner, et al., *No increase in the prevalence of asthma, allergies and atopic sensitisation among children in Germany: 1992- 2001*. Thorax, 2005. **60**: p. 545-548.
9. von Mutius, E., *Paediatric origins of adult lung disease*. Thorax, 2001. **56**(2): p. 153-7.
10. Janeway, C., et al., *Immunologie*. Vol. 5. 2002, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
11. Mutschler, E., et al., *Arzneimittelwirkungen*. Vol. 8. 2001, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
12. Rosenwasser, L., *New insights into the pathophysiology of allergic rhinitis*. Allergy Asthma Proc, 2007. **28**(1): p. 10-5.
13. van Oosterhout, A.J. and N. Bloksma, *Regulatory T-lymphocytes in asthma*. Eur Respir J, 2005. **26**(5): p. 918-32.
14. Coyle, A.J. and J.C. Gutierrez-Ramos, *The role of ICOS and other costimulatory molecules in allergy and asthma*. Springer Semin Immunopathol, 2004. **25**(3-4): p. 349-59.
15. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
16. Renz, H. and U. Herz, *The bidirectional capacity of bacterial antigens to modulate allergy and asthma*. Eur Respir J, 2002. **19**(1): p. 158-71.
17. Parronchi, P., et al., *Genetic and environmental factors contributing to the onset of allergic disorders*. Int Arch Allergy Immunol, 2000. **121**(1): p. 2-9.
18. Romagnani, S., *Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(3): p. 395-400.
19. Piccinni, M.P., et al., *Role of hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines in successful pregnancy*. J Neuroimmunol, 2000. **109**(1): p. 30-3.
20. Geha, R.S., H.H. Jabara, and S.R. Brodeur, *The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 721-32.
21. Gould, H.J., et al., *The biology of IGE and the basis of allergic disease*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 579-628.

22. Martinez, F.D. and P.G. Holt, *Role of microbial burden in aetiology of allergy and asthma*. Lancet, 1999. **354 Suppl 2**: p. SII12-5.
23. Renz, H., et al., *T(H)1/T(H)2 immune response profiles differ between atopic children in eastern and western Germany*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **109**(2): p. 338-42.
24. Bullens, D.M., et al., *Allergen-specific T cells from birch-pollen-allergic patients and healthy controls differ in T helper 2 cytokine and in interleukin-10 production*. Clin Exp Allergy, 2004. **34**(6): p. 879-87.
25. van Reijsen, F.C., et al., *Skin-derived aeroallergen-specific T-cell clones of Th2 phenotype in patients with atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 1992. **90**(2): p. 184-93.
26. Prescott, S.L., *New concepts of cytokines in asthma: is the Th2/Th1 paradigm out the window?* J Paediatr Child Health, 2003. **39**(8): p. 575-9.
27. Eder, W. and E. von Mutius, *Hygiene hypothesis and endotoxin: what is the evidence?* Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2004. **4**(2): p. 113-7.
28. Karagiannidis, C., et al., *Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(6): p. 1425-33.
29. Thompson, C. and F. Powrie, *Regulatory T cells*. Curr Opin Pharmacol, 2004. **4**(4): p. 408-14.
30. Gambineri, E., T.R. Torgerson, and H.D. Ochs, *Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis*. Curr Opin Rheumatol, 2003. **15**(4): p. 430-5.
31. Bellinghausen, I., et al., *Human CD4+CD25+ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(4): p. 862-8.
32. Grindebacke, H., et al., *Defective suppression of Th2 cytokines by CD4CD25 regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season*. Clin Exp Allergy, 2004. **34**(9): p. 1364-72.
33. Ling, E.M., et al., *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): p. 608-15.
34. Akdis, C.A., K. Blaser, and M. Akdis, *Genes of tolerance*. Allergy, 2004. **59**(9): p. 897-913.
35. Cottrez, F., et al., *T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo*. J Immunol, 2000. **165**(9): p. 4848-53.
36. Karlsson, M.R., J. Rugtveit, and P. Brandtzaeg, *Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy*. J Exp Med, 2004. **199**(12): p. 1679-88.
37. Hartl, D., et al., *Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(5): p. 1258-66.
38. Macaubas, C., et al., *Association between antenatal cytokine production and the development of atopy and asthma at age 6 years*. Lancet, 2003. **362**(9391): p. 1192-7.
39. Kuperman, D.A., et al., *Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma*. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 885-9.
40. Maziak, W., *Asthma and farming*. Lancet, 2002. **359**(9306): p. 623-4.
41. Huang, S.K., et al., *IL-13 expression at the sites of allergen challenge in patients with asthma*. J Immunol, 1995. **155**(5): p. 2688-94.

42. Romagnani, S., et al., *Increased numbers of Th2-like CD4+ T cells in target organs and in the allergen-specific repertoire of allergic patients. Possible role of IL-4 produced by non-T cells.* Int Arch Allergy Appl Immunol, 1991. **94**(1-4): p. 133-6.
43. Bellinghausen, I., J. Knop, and J. Saloga, *The role of interleukin 10 in the regulation of allergic immune responses.* Int Arch Allergy Immunol, 2001. **126**(2): p. 97-101.
44. Borish, L., et al., *Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma.* J Allergy Clin Immunol, 1996. **97**(6): p. 1288-96.
45. Trinchieri, G., *Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes.* Blood, 1994. **84**(12): p. 4008-27.
46. Aniansson Zdzolek, H., et al., *Reduced IL-2-induced IL-12 responsiveness in atopic children.* Pediatr Allergy Immunol, 2003. **14**(5): p. 351-7.
47. Jung, T., et al., *Decreased frequency of interferon-gamma- and interleukin-2-producing cells in patients with atopic diseases measured at the single cell level.* J Allergy Clin Immunol, 1995. **96**(4): p. 515-27.
48. Koning, H., et al., *T cells subsets and cytokines in allergic and non-allergic children. II. Analysis and IL-5 and IL-10 mRNA expression and protein production.* Cytokine, 1997. **9**(6): p. 427-36.
49. Miles, E.A., L. Bakewell, and P.C. Calder, *Production of lymphocyte-derived cytokines by whole umbilical cord blood cultures stimulated with mitogens and allergens.* Cytokine, 2003. **21**(2): p. 74-83.
50. Huang, S.H., et al., *Interleukin-17 and the interleukin-17 family member network.* Allergy Asthma Proc, 2004. **25**(1): p. 17-21.
51. Kawaguchi, M., et al., *IL-17F sequence variant (His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity.* J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(4): p. 795-801.
52. Schmitz, J., et al., *IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines.* Immunity, 2005. **23**(5): p. 479-90.
53. Habib, T., A. Nelson, and K. Kaushansky, *IL-21: a novel IL-2-family lymphokine that modulates B, T, and natural killer cell responses.* J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(6): p. 1033-45.
54. Bilborough, J., et al., *IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis.* J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(2): p. 418-25.
55. Yaqoob, P., E.A. Newsholme, and P.C. Calder, *Comparison of cytokine production in cultures of whole human blood and purified mononuclear cells.* Cytokine, 1999. **11**(8): p. 600-5.
56. Prescott, S.L., et al., *Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile.* J Immunol, 1998. **160**(10): p. 4730-7.
57. Holt, P.G., et al., *Drug development strategies for asthma: in search of a new paradigm.* Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 695-8.
58. Ramsey, C.D. and J.C. Celedon, *The hygiene hypothesis and asthma.* Curr Opin Pulm Med, 2005. **11**(1): p. 14-20.
59. Hagendorens, M.M., et al., *Prenatal exposure to house dust mite allergen (Der p 1), cord blood T cell phenotype and cytokine production and atopic dermatitis during the first year of life.* Pediatr Allergy Immunol, 2004. **15**(4): p. 308-15.
60. Kopp, M.V., et al., *Allergen-specific T cell reactivity in cord blood: the influence of maternal cytokine production.* Clin Exp Allergy, 2001. **31**(10): p. 1536-43.

61. Ohshima, Y., et al., *Dysregulation of IL-13 production by cord blood CD4+ T cells is associated with the subsequent development of atopic disease in infants.* *Pediatr Res*, 2002. **51**(2): p. 195-200.
62. Prescott, S.L., et al., *Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children.* *Lancet*, 1999. **353**(9148): p. 196-200.
63. Zutavern, A., et al., *Pre-natal and post-natal exposure to respiratory infection and atopic diseases development: a historical cohort study.* *Respir Res*, 2006. **7**: p. 81.
64. Rautava, S., et al., *The hygiene hypothesis of atopic disease--an extended version.* *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2004. **38**(4): p. 378-88.
65. Kramer, U., et al., *Age of entry to day nursery and allergy in later childhood.* *Lancet*, 1999. **353**(9151): p. 450-4.
66. Illi, S., et al., *The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma.* *J Allergy Clin Immunol*, 2004. **113**(5): p. 925-31.
67. Del Giudice, M.M., A. Rocco, and C. Capristo, *Probiotics in the atopic march: highlights and new insights.* *Dig Liver Dis*, 2006. **38 Suppl 2**: p. S288-90.
68. Hahn, E.L. and L.B. Bacharier, *The atopic march: the pattern of allergic disease development in childhood.* *Immunol Allergy Clin North Am*, 2005. **25**(2): p. 231-46, v.
69. Lauener, R. and P. Eigenmann, [*The course of allergy: principles for early diagnosis, prevention and early therapy of allergic diseases*]. *Ther Umsch*, 2001. **58**(5): p. 262-5.
70. Schaub, B., R. Lauener, and E. von Mutius, *The many faces of the hygiene hypothesis.* *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **117**(5): p. 969-77; quiz 978.
71. Eder, W., et al., *Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers.* *J Allergy Clin Immunol*, 2004. **113**(3): p. 482-8.
72. Strachan, D.P., *Hay fever, hygiene, and household size.* *Bmj*, 1989. **299**(6710): p. 1259-60.
73. Nowak, D., H.E. Wichmann, and H. Magnusson, *Asthma and atopy in Western and Eastern communities--current status and open questions.* *Clin Exp Allergy*, 1998. **28**(9): p. 1043-6.
74. Karmaus, W. and C. Botezan, *Does a higher number of siblings protect against the development of allergy and asthma? A review.* *J Epidemiol Community Health*, 2002. **56**(3): p. 209-17.
75. Ball, T.M., et al., *Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood.* *N Engl J Med*, 2000. **343**(8): p. 538-43.
76. Illi, S., et al., *Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study.* *Bmj*, 2001. **322**(7283): p. 390-5.
77. Bach, J.F., *Six questions about the hygiene hypothesis.* *Cell Immunol*, 2005. **233**(2): p. 158-61.
78. Yazdanbakhsh, M., P.G. Kremsner, and R. van Ree, *Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis.* *Science*, 2002. **296**(5567): p. 490-4.
79. Zutavern, A., et al., *Atopic dermatitis, extrinsic atopic dermatitis and the hygiene hypothesis: results from a cross-sectional study.* *Clin Exp Allergy*, 2005. **35**(10): p. 1301-8.
80. Von Ehrenstein, O.S., et al., *Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers.* *Clin Exp Allergy*, 2000. **30**(2): p. 187-93.
81. Riedler, J., et al., *Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey.* *Lancet*, 2001. **358**(9288): p. 1129-33.
82. Waser, M., et al., *Determinants of endotoxin levels in living environments of farmers' children and their peers from rural areas.* *Clin Exp Allergy*, 2004. **34**(3): p. 389-97.

83. Radon, K., et al., *Childhood visits to animal buildings and atopic diseases in adulthood: an age-dependent relationship*. Am J Ind Med, 2004. **46**(4): p. 349-56.
84. Alm, J.S., et al., *Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle*. Lancet, 1999. **353**(9163): p. 1485-8.
85. Schram, D., et al., *Bacterial and fungal components in house dust of farm children, Rudolf Steiner school children and reference children--the PARSIFAL Study*. Allergy, 2005. **60**(5): p. 611-8.
86. Ege, M.J., et al., *Not all farming environments protect against the development of asthma and wheeze in children*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(5): p. 1140-7.
87. Alfven, T., et al., *Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle--the PARSIFAL study*. Allergy, 2006. **61**(4): p. 414-21.
88. Waser, M., et al., *Exposure to pets, and the association with hay fever, asthma, and atopic sensitization in rural children*. Allergy, 2005. **60**(2): p. 177-84.
89. Peters, M., et al., *Inhalation of stable dust extract prevents allergen induced airway inflammation and hyperresponsiveness*. Thorax, 2006. **61**(2): p. 134-9.
90. Behrens, T., et al., *Self-reported traffic density and atopic disease in children. Results of the ISAAC Phase III survey in Muenster, Germany*. Pediatr Allergy Immunol, 2004. **15**(4): p. 331-9.
91. Dezateux, C., et al., *Impaired airway function and wheezing in infancy: the influence of maternal smoking and a genetic predisposition to asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **159**(2): p. 403-10.
92. Martinez, F.D., et al., *Diminished lung function as a predisposing factor for wheezing respiratory illness in infants*. N Engl J Med, 1988. **319**(17): p. 1112-7.
93. Schaub, B. and E. von Mutius, *Obesity and asthma, what are the links?* Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2005. **5**(2): p. 185-93.
94. Waser, M., et al., *Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe*. Clin Exp Allergy, 2007. **37**(5): p. 661-70.
95. Kalliomaki, M., et al., *Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial*. Lancet, 2001. **357**(9262): p. 1076-9.
96. Celedon, J.C., et al., *Lack of association between a polymorphism in the interleukin-13 gene and total serum immunoglobulin E level among nuclear families in Costa Rica*. Clin Exp Allergy, 2002. **32**(3): p. 387-90.
97. Asher, M.I., et al., *International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods*. Eur Respir J, 1995. **8**(3): p. 483-91.
98. Ferris, B., *Recommended respiratory disease questionnaires for use with adults and children in epidemiological research*. Am Rev Respir Dis, 1978. **188**: p. 1-79.
99. Karadag, B., et al., *The role of parasitic infections in atopic diseases in rural schoolchildren*. Allergy, 2006. **61**(8): p. 996-1001.
100. Cook, R.R., *Overview of good epidemiologic practices*. J Occup Med, 1991. **33**(12): p. 1216-20.
101. Coggon, D., *Planning research*. Occup Med (Lond), 1997. **47**(4): p. 247-8.
102. Blettner, M., C. Heuer, and O. Razum, *Critical reading of epidemiological papers. A guide*. Eur J Public Health, 2001. **11**(1): p. 97-101.
103. von Mutius, E. and S. Schmid, *The PASTURE project: EU support for the improvement of knowledge about risk factors and preventive factors for atopy in Europe*. Allergy, 2006. **61**(4): p. 407-13.
104. Holmberg, S., et al., *Low back pain comorbidity among male farmers and rural referents: a population-based study*. Ann Agric Environ Med, 2005. **12**(2): p. 261-8.

105. Prescott, S.L., et al., *Developing patterns of T cell memory to environmental allergens in the first two years of life*. Int Arch Allergy Immunol, 1997. **113**(1-3): p. 75-9.
106. Engvall, E. and P. Perlman, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 1971. **8**(9): p. 871-4.
107. Lequin, R.M., *Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Clin Chem, 2005. **51**(12): p. 2415-8.
108. Schuurs, A.H. and B.K. van Weemen, *Enzyme-immunoassay: a powerful analytical tool*. J Immunoassay, 1980. **1**(2): p. 229-49.
109. Van Weemen, B.K. and A.H. Schuurs, *Immunoassay using antigen-enzyme conjugates*. FEBS Lett, 1971. **15**(3): p. 232-236.
110. Martin, K., et al., *Simultaneous analysis of cytokines and co-stimulatory molecules concentrations by ELISA technique and of probabilities of measurable concentrations of interleukins IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, CXCL8 (IL-8), IL-10, IL-13 occurring in plasma of healthy blood donors*. Mediators Inflamm, 2006. **2006**(5): p. 65237.
111. Liu, C. and T.E. Hermann, *Characterization of ionomycin as a calcium ionophore*. J Biol Chem, 1978. **253**(17): p. 5892-4.
112. Lee, G. and M. Gilman, *Dual modes of control of c-fos mRNA induction by intracellular calcium in T cells*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(7): p. 4579-87.
113. Morley, S.J., *Signalling through either the p38 or ERK mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway is obligatory for phorbol ester and T cell receptor complex (TCR-CD3)-stimulated phosphorylation of initiation factor (eIF) 4E in Jurkat T cells*. FEBS Lett, 1997. **418**(3): p. 327-32.
114. Machura, E., et al., *Intracellular production of IL-2, IL-4, IFN-gamma, and TNF-alpha by peripheral blood CD3(+) and CD4 (+) T cells in children with atopic dermatitis*. Eur J Pediatr, 2007. **166**(8): p. 789-95.
115. Campbell, D.E. and A.S. Kemp, *Proliferation and production of interferon-gamma (IFN-gamma) and IL-4 in response to Staphylococcus aureus and staphylococcal superantigen in childhood atopic dermatitis*. Clin Exp Immunol, 1997. **107**(2): p. 392-7.
116. Konig, B., K. Neuber, and W. Konig, *Responsiveness of peripheral blood mononuclear cells from normal and atopic donors to microbial superantigens*. Int Arch Allergy Immunol, 1995. **106**(2): p. 124-33.
117. Smart, J.M. and A.S. Kemp, *Increased Th1 and Th2 allergen-induced cytokine responses in children with atopic disease*. Clin Exp Allergy, 2002. **32**(5): p. 796-802.
118. Couturier, C., et al., *Binding sites for endotoxins (lipopolysaccharides) on human monocytes*. J Immunol, 1991. **147**(6): p. 1899-904.
119. Lagrelius, M., et al., *Cytokine detection by multiplex technology useful for assessing antigen specific cytokine profiles and kinetics in whole blood cultured up to seven days*. Cytokine, 2006. **33**(3): p. 156-65.
120. Favre, N., G. Bordmann, and W. Rudin, *Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR*. J Immunol Methods, 1997. **204**(1): p. 57-66.
121. Yaqoob, P., E.A. Newsholme, and P.C. Calder, *The effect of dietary lipid manipulation on rat lymphocyte subsets and proliferation*. Immunology, 1994. **82**(4): p. 603-10.
122. Hodge, G., S. Hodge, and P. Han, *Increased levels of apoptosis of leukocyte subsets in cultured PBMCs compared to whole blood as shown by Annexin V binding: relevance to cytokine production*. Cytokine, 2000. **12**(12): p. 1763-8.

123. De Groote, D., et al., *Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation.* Cytokine, 1992. **4**(3): p. 239-48.
124. Foa, R., et al., *Production of tumor necrosis factor-alpha by B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: a possible regulatory role of TNF in the progression of the disease.* Blood, 1990. **76**(2): p. 393-400.
125. Jacob, C.O., et al., *Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(3): p. 1233-7.
126. Molvig, J., et al., *Endotoxin-stimulated human monocyte secretion of interleukin 1, tumour necrosis factor alpha, and prostaglandin E2 shows stable interindividual differences.* Scand J Immunol, 1988. **27**(6): p. 705-16.
127. Kondo, N., et al., *Reduced interferon gamma production by antigen-stimulated cord blood mononuclear cells is a risk factor of allergic disorders--6-year follow-up study.* Clin Exp Allergy, 1998. **28**(11): p. 1340-4.
128. Rinas, U., G. Horneff, and V. Wahn, *Interferon-gamma production by cord-blood mononuclear cells is reduced in newborns with a family history of atopic disease and is independent from cord blood IgE-levels.* Pediatr Allergy Immunol, 1993. **4**(2): p. 60-4.
129. Warner, J.A., et al., *Is deficiency of interferon gamma production by allergen triggered cord blood cells a predictor of atopic eczema?* Clin Exp Allergy, 1994. **24**(5): p. 423-30.
130. Pene, J., et al., *IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(18): p. 6880-4.
131. Braun-Fahrlander, C., *Allergic diseases in farmers' children.* Pediatr Allergy Immunol, 2000. **11 Suppl 13**: p. 19-22.
132. Ernst, P. and Y. Cormier, *Relative scarcity of asthma and atopy among rural adolescents raised on a farm.* Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(5): p. 1563-6.
133. Kilpelainen, M., et al., *Farm environment in childhood prevents the development of allergies.* Clin Exp Allergy, 2000. **30**(2): p. 201-8.
134. Akdis, C.A., et al., *Regulation of allergic inflammation by skin-homing T cells in allergic eczema.* Int Arch Allergy Immunol, 1999. **118**(2-4): p. 140-4.
135. Romagnani, S., *The role of lymphocytes in allergic disease.* J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(3): p. 399-408.
136. Spergel, J.M. and A.S. Paller, *Atopic dermatitis and the atopic march.* J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(6 Suppl): p. S118-27.
137. Prokesova, L., et al., *Cytokine levels in healthy and allergic mothers and their children during the first year of life.* Pediatr Allergy Immunol, 2006. **17**(3): p. 175-83.
138. Takahashi, T., et al., *Production of IL-4, IL-2, IFN-gamma, and TNF-alpha by peripheral blood mononuclear cells of patients with atopic dermatitis.* J Dermatol Sci, 1992. **3**(3): p. 172-80.
139. Custovic, A., et al., *Effect of environmental manipulation in pregnancy and early life on respiratory symptoms and atopy during first year of life: a randomised trial.* Lancet, 2001. **358**(9277): p. 188-93.
140. Miller, R.L., et al., *Prenatal exposure, maternal sensitization, and sensitization in utero to indoor allergens in an inner-city cohort.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(6): p. 995-1001.

141. Smillie, F.I., et al., *Lymphoproliferative responses in cord blood and at one year: no evidence for the effect of in utero exposure to dust mite allergens*. Clin Exp Allergy, 2001. **31**(8): p. 1194-204.
142. Koulis, A. and D.S. Robinson, *The anti-inflammatory effects of interleukin-10 in allergic disease*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(6): p. 747-50.
143. Rousset, F., et al., *Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(5): p. 1890-3.
144. van der Velden, V.H., et al., *Selective development of a strong Th2 cytokine profile in high-risk children who develop atopy: risk factors and regulatory role of IFN-gamma, IL-4 and IL-10*. Clin Exp Allergy, 2001. **31**(7): p. 997-1006.
145. Kearley, J., et al., *Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent*. J Exp Med, 2005. **202**(11): p. 1539-47.
146. von Mutius, E., et al., *Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(9): p. 1230-4.
147. Riedler, J., et al., *Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(2): p. 194-200.
148. Jahn-Schmid, B., et al., *Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs modulate the allergic TH2 response of BALB/c mice to Bet v 1, the major birch pollen allergen*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **104**(5): p. 1015-23.
149. Tulic, M.K., et al., *Modification of the inflammatory response to allergen challenge after exposure to bacterial lipopolysaccharide*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **22**(5): p. 604-12.
150. Holt, P.G., et al., *Genetic 'risk' for atopy is associated with delayed postnatal maturation of T-cell competence*. Clin Exp Allergy, 1992. **22**(12): p. 1093-9.
151. Spiewak, R., et al., *Atopy, allergic diseases and work-related symptoms among students of agricultural schools: first results of the Lublin study*. Ann Agric Environ Med, 2001. **8**(2): p. 261-7.
152. Devereux, G., A. Seaton, and R.N. Barker, *In utero priming of allergen-specific helper T cells*. Clin Exp Allergy, 2001. **31**(11): p. 1686-95.
153. Piccinni, M.P., et al., *Aeroallergen sensitization can occur during fetal life*. Int Arch Allergy Immunol, 1993. **102**(3): p. 301-3.
154. Szepefalusi, Z., et al., *Transplacental priming of the human immune system with environmental allergens can occur early in gestation*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(3): p. 530-6.
155. Warner, J.A., et al., *Prenatal origins of allergic disease*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(2 Pt 2): p. S493-8.
156. Jones, A.C., et al., *Fetal peripheral blood mononuclear cell proliferative responses to mitogenic and allergenic stimuli during gestation*. Pediatr Allergy Immunol, 1996. **7**(3): p. 109-16.
157. Szepefalusi, Z., et al., *Direct evidence for transplacental allergen transfer*. Pediatr Res, 2000. **48**(3): p. 404-7.
158. Portengen, L., et al., *Low prevalence of atopy in young Danish farmers and farming students born and raised on a farm*. Clin Exp Allergy, 2002. **32**(2): p. 247-53.
159. Remes, S.T., et al., *Which factors explain the lower prevalence of atopy amongst farmers' children?* Clin Exp Allergy, 2003. **33**(4): p. 427-34.
160. Fogarty, A. and J. Britton, *The role of diet in the aetiology of asthma*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(5): p. 615-27.

7.2. Tabellenverzeichnis	Seite
Tabelle 1: Zytokine und ihre Funktionen.....	12
Tabelle 2: Zytokinstimulationsansatz.....	21
Tabelle 3: Charakterisierung der Studienpopulation (Mütter).....	28
Tabelle 4: Charakterisierung der Studienpopulation (Väter).....	29
Tabelle 5: Charakterisierung der Studienpopulation (Kinder).....	31
Tabelle 6: Charakterisierung der Bauernhöfe.....	32
Tabelle 7: Tätigkeiten der Bäuerinnen.....	33
Tabelle 8: Dauer der Arbeit der Bäuerinnen während der Schwangerschaft.....	33
Tabelle 9: Zytokinwerte sortiert nach Stimulanzen.....	36
Tabelle 10: Unterschiede in der Zytokinexpression zwischen Bauern und Nichtbauern mit verschiedenen Stimulanzen (Zytokinkategorien 0,1,2).....	42
Tabelle 11: Unterschiede in der Zytokinexpression zwischen Bauern und Nichtbauern (Zytokinkategorien 0,1).....	47
Tabelle 12: Unterschiede in der Zytokinexpression im Vergleich zur Haustierhaltung (Zytokinkategorien 0,1).....	48
Tabelle 13: Unterschiede in der Zytokinexpression im Vergleich zum Konsum unabgekochter Bauernhofmilch der Kinder (Zytokinkategorien 0,1).....	48
Tabelle 14: Unterschiede in der IL-5 Expression nach P/I 48h Stimulation zwischen Bauern und Nichtbauern (Zytokinkategorien 0,1).....	49
Tabelle 15: Unterschiede in der IL-5 Expression nach LPS 48h Stimulation zwischen Bauern und Nichtbauern (Zytokinkategorien 0,1).....	49
Tabelle 16: Unterschiede in der IL-5 Expression nach SEB 48h Stimulation zwischen Bauern und Nichtbauern (Zytokinkategorien 0,1).....	49
Tabelle 17: Unterschiede in der Zytokinexpression der Kinder bei unterschiedlichen Arbeiten der Mütter während der Schwangerschaft auf dem Bauernhof (Zytokinkategorien 0,1).....	52
Tabelle 18: Unterschiede in der Zytokinexpression der Bauernkinder bei allergischem Schnupfen der Mütter (Zytokinkategorien 0,1).....	52
Tabelle 19: Zusammenhang zwischen Umgang mit Silage und allergischem Schnupfen bei den Müttern.....	53
Tabelle 20: Unterschiede in der Zytokinexpression der Bauernkinder bei Haustierhaltung (Zytokinkategorien 0,1).....	53
Tabelle 21: Unterschiede in der Zytokinexpression der Bauernkinder bei Neurodermitis der Mütter (Zytokinkategorien 0,1).....	53
Tabelle 22: Zusammenhang zwischen Umgang mit Silage und Neurodermitis bei den Müttern.....	54
Tabelle 23: Unterschiede in der Zytokinexpression der Bauernkinder bei Bauernhofmilchkonsum der Mütter (Zytokinkategorien 0,1).....	54
Tabelle 24: Zusammenhang zwischen Umgang mit Silage und Bauernhofmilchkonsum bei den Müttern.....	54
Tabelle 25: Unterschiede in der Zytokinexpression der Bauernkinder bei Allergien während der Schwangerschaft der Mütter (Zytokinkategorien 0,1).....	55
Tabelle 26: Zusammenhang zwischen Umgang mit Silage bzw. Umgang mit Heu und Allergie während der Schwangerschaft bei den Müttern.....	55
Tabelle 27: Unterschiede in der Zytokinexpression der Bauernkinder bei Diagnose Neurodermitis (Zytokinkategorien 0,1).....	55
Tabelle 28: Unterschiede in der Zytokinexpression der Bauernkinder bei Konsum von unabgekochter Bauernhofmilch (Zytokinkategorien 0,1).....	56

Tabelle 29: Unterschiede in der Zytokinexpression der Bauernkinder bei Konsum von H-Milch (Zytokinkategorien 0,1) .....	56
Tabelle 30: Zusammenhang zwischen Reinigen der Tiere durch die Mütter während der Schwangerschaft und H-Milchkonsum der Kinder .....	56
Tabelle 31: Unterschiede in der IL-5 Expression der Kinder nach SEB 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Reinigen der Tiere durch die Mütter während der Schwangerschaft.....	57
Tabelle 32: Unterschiede in der IL-5 Expression der Kinder nach PI 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Heu .....	57
Tabelle 33: Unterschiede in der IL-5 Expression der Kinder nach LPS 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Silage.....	58
Tabelle 34: Unterschiede in der IL-5 Expression der Kinder nach LPS 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Kompost.....	58
Tabelle 35: Unterschiede in der IFN- $\gamma$ Expression der Kinder nach PI 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Heu .....	58
Tabelle 36: Unterschiede in der IFN- $\gamma$ Expression der Kinder nach PI 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Silage.....	59
Tabelle 37: Unterschiede in der IFN- $\gamma$ Expression der Kinder nach PI 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Heu .....	59
Tabelle 38: Unterschiede in der IFN- $\gamma$ Expression der Kinder nach PI 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Silage.....	59
Tabelle 39: Unterschiede in der TNF- $\alpha$ Expression der Kinder nach LPS 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Entmisten der Mütter während der Schwangerschaft.....	60
Tabelle 40: Unterschiede in der TNF- $\alpha$ Expression der Kinder nach SEB 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Entmisten der Mütter während der Schwangerschaft.....	60
Tabelle 41: Unterschiede in der TNF- $\alpha$ Expression der Kinder nach SEB 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Reinigen der Tiere durch die Mütter während der Schwangerschaft.....	60
Tabelle 42: Unterschiede in der TNF- $\alpha$ Expression der Kinder nach LPS 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Entmisten der Mütter während der Schwangerschaft.....	61
Tabelle 43: Unterschiede in der TNF- $\alpha$ Expression der Kinder nach SEB 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Entmisten der Mütter während der Schwangerschaft.....	61
Tabelle 44: Unterschiede in der Zytokinexpression der Kinder bei unterschiedlicher Exposition der Kinder auf dem Bauernhof (Zytokinkategorien 0,1) .....	62
Tabelle 45: Unterschiede in der IL-10 Expression der Kinder nach LPS 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Anwesenheit der Kinder bei der Heuernte .....	63
Tabelle 46: Unterschiede in der IL-10 Expression der Kinder nach SEB 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Anwesenheit der Kinder bei der Heuernte .....	63
Tabelle 47: Zusammenhang zwischen der Exposition der Mütter während der Schwangerschaft und der Exposition der Kinder im ersten Lebensjahr .....	64

Tabelle 48: Unterschiede in der IL-5 Expression der Kinder nach LPS 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter mit Silage während der Schwangerschaft.....	64
Tabelle 49: Unterschiede in der IL-5 Expression der Kinder nach PI 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Heu.....	65
Tabelle 50: Unterschiede in der IFN- $\gamma$ Expression der Kinder nach PI 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Heu.....	65
Tabelle 51: Unterschiede in der IFN- $\gamma$ Expression der Kinder nach PI 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Silage.....	65
Tabelle 52: Unterschiede in der IFN- $\gamma$ Expression der Kinder nach PI 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Heu.....	66
Tabelle 53: Unterschiede in der IFN- $\gamma$ Expression der Kinder nach PI 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Umgang der Mütter während der Schwangerschaft mit Silage.....	66
Tabelle 54: Unterschiede in der TNF- $\alpha$ Expression der Kinder nach SEB 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Entmisten der Mütter während der Schwangerschaft.....	66
Tabelle 55: Unterschiede in der TNF- $\alpha$ Expression der Kinder nach SEB 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Reinigen der Tiere durch die Mütter während der Schwangerschaft.....	67
Tabelle 56: Unterschiede in der TNF- $\alpha$ Expression der Kinder nach SEB 48h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Entmisten der Mütter während der Schwangerschaft.....	67
Tabelle 57: Unterschiede in der IL-10 Expression der Kinder nach LPS 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Anwesenheit der Kinder bei der Heuernte.....	67
Tabelle 58: Unterschiede in der IL-10 Expression der Kinder nach SEB 24h Stimulation (Zytokinkategorien 0,1) bei Anwesenheit der Kinder bei der Heuernte.....	68

### 7.3. Abbildungsverzeichnis

Seite

Abbildung 1: T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2 Polarisierung.....	10
Abbildung 2: Einfluss von regulatorischen T-Zellen.....	11
Abbildung 3: Diagramm über die Rekrutierung der Studienteilnehmer.....	26

## 7.4. Fragebögen

### 7.4.1. Auszüge aus dem Schwangerschaftsfragebogen



Schwangerschaftsfragebogen

für

Deutschland

Ulm, Oktober 2002

**1. Befragten-ID:**

*vom Interviewer auszufüllen*

SBID

**2. Interviewer-ID:**

*vom Interviewer auszufüllen*

SIDI

**3 Interviewform**

*vom Interviewer auszufüllen*

persönlich? ..... 1

S03

telefonisch? ..... 2

**4. Datum des Interviews:**

*vom Interviewer auszufüllen*

S04\_01

S04\_02

S04\_03

Tag/ Monat/ Jahr

**5. Beginn des Interviews (Uhrzeit):**

*Interviewer, bitte genaue Uhrzeit eintragen*

S05\_01

S05\_02

Std/ Min

**6. Wann wurden Sie geboren?**

S06\_01

S06\_02

S06\_03

Tag/ Monat/ Jahr

**7. Wie groß sind Sie?**

\_\_\_\_\_cm

S07

**8. Welches Körpergewicht hatten Sie vor Beginn der Schwangerschaft?**

\_\_\_\_\_kg

S08

**9. Ist dies ihre erste Schwangerschaft?**

 *Abgebrochene Schwangerschaften oder Fehlgeburten werden mitgezählt.*

Ja.....1

Nein.....2

S09

**10. Wann ist der errechnete Geburtstermin?**

S10\_01

S10\_02

S10\_03

Tag/ Monat/ Jahr

Ü2  *vorlesen*

**Die nächsten Fragen beziehen sich auf Atemwegsbeschwerden.**

**11. Hatten Sie jemals ein pfeifendes oder keuchendes Geräusch im Brustkorb?**

S11

Ja.....1

Nein.....2 ⇒ **weiter mit**

**Frage 17**

**17. Hatten Sie jemals Asthma?**

S17

Ja.....1

Nein.....2 ⇒ **weiter mit**

**Frage 24**

**18. Wurde die Diagnose von einem Arzt bestätigt?**

Ja.....1

S18

Nein.....2

21. Haben Sie auch während dieser Schwangerschaft Asthma-Beschwerden gehabt?

Ja.....1

S21

Nein.....2

⇒ weiter mit

Frage 23

42. Hatten Sie jemals allergischen Schnupfen, z.B. „Heuschnupfen“?

Ja.....1

S42

Nein.....2

⇒ weiter mit Überleitung Ü5 (S.17)

43. Wurde die Diagnose von einem Arzt bestätigt?

Ja.....1

S43

Nein.....2

46. Haben Sie auch während dieser Schwangerschaft Heuschnupfen-Beschwerden gehabt?

Ja.....1

S46

Nein.....2

⇒ weiter mit Überleitung Ü5 (S.17)

48. Hatten Sie jemals einen juckenden Hautausschlag, der für mindestens 6 Monate immer wieder schlimmer und besser geworden ist?

Ja.....1

S48

Nein.....2

⇒ weiter mit

Frage 54

51. Hatten Sie jemals Neurodermitis, auch endogenes oder atopisches Ekzem genannt?

Ja.....1

S51

Nein.....2

⇒ weiter mit

Frage 54

52. Wurde die Diagnose von einem Arzt bestätigt?

Ja.....1

S52

Nein.....2

Ü10 *vorlesen*

Die folgenden Fragen beziehen sich auf Ihr Lebensumfeld.

78. Wie würden Sie den Ort, an dem Sie wohnen, beschreiben?

*Vorgaben vorlesen*

S78

eine Kleinstadt.....1

ein Dorf .....2

ein alleinstehendes Haus außerhalb des Ortes .....3

79. Leben Sie auf einem Bauernhof?

Ja.....1

S79

Nein.....2

⇒ weiter mit

Frage 98

80. Bewirtschaftet Ihre Familie den Hof?

Ja.....1

S80

Nein.....2

⇒ weiter mit

Frage 98

81. Sind Sie selbst aktiv an der Bewirtschaftung des Hofes beteiligt?

Ja.....1

S81

Nein.....2

⇒ weiter mit

Frage 86

82. Seit wann arbeiten Sie auf diesem Hof?

Seit dem Jahre \_\_\_\_\_

S82

83. Haben Sie früher schon auf einem Bauernhof gearbeitet?

Ja.....1

S83

Nein.....2

⇒ weiter mit

Frage 85

84. Wie viele Jahre haben Sie auf dem Bauernhof gearbeitet?

\_\_\_\_\_ Jahre

S84

85. Wie viel arbeiteten Sie selbst vor dieser Schwangerschaft auf Ihrem Hof?

☞ *Vorgaben vorlesen*

☞ *nur eine Antwort möglich*

Ganztags .....1

Halbtags.....2

weniger als halbtags .....3

S85

**88. Wie groß ist die bewirtschaftete Fläche (in Hektar)?**

*Falls die Probandin Fragen zum Hof nicht beantworten kann, bitte versuchen, nach dem Interview den Ehemann zu befragen! Falls Ehemann nicht erreichbar, bitte später versuchen, die Information telefonisch zu erhalten.*

\_\_\_\_\_ Hektar

S88

**89. Welche Nutztiere werden gehalten, und in welcher Zahl?**

*Vorgaben einzeln vorlesen und Anzahl notieren*

*Falls Tierart nicht vorhanden ist, bitte Anzahl = 0 kodieren*

*von sonstigen Tierarten Namen und Anzahl notieren, falls vorhanden*

Milchkühe	S89 01	Anzahl	
sonstige Rinder / Kälber / Jungvieh	S89 02	Anzahl	
Schweine	S89 03	Anzahl	
Geflügel (Hühner, Puten, Enten, Gänse etc.)	S89 04	Anzahl	
Pferde ( Ponys, Esel etc. )	S89 05	Anzahl	
Schafe / Ziegen	S89 06	Anzahl	
Hasen / Kaninchen	S89 07	Anzahl	
Sonstige: _____	S89s	S89 08	Anzahl

**90. Bei welcher der nachfolgenden Tätigkeiten sind Sie normalerweise beteiligt oder bei deren Durchführung anwesend?**

☞ *Vorgaben einzeln vorlesen und bei „ja“ oder „nein“ ankreuzen*

☞ *Bei sonstigen Veränderungen zusätzlich notieren*

		Ja	Nein
Melken .....	S90 01	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2
Entmisten .....	S90 02	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2
Einstreuen .....	S90 03	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2
Waschen der Melkutensilien .....	S90 04	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2
Reinigen der Tiere .....	S90 05	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2
Umgang mit Heu .....	S90 06	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2
Umgang mit Silage .....	S90 07	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2
Umgang mit Kompost .....	S90 08	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2
Vieh überwachen, Medikamente verabreichen .....	S90 09 S90 10	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2
Kehren des Bodens / Reinigung von Ställen oder Scheunen .....		<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2
Bewegen der Tiere innerhalb des Stalls .....	S90 11	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2
Tätigkeiten mit engem Kontakt zum Vieh .....	S90 12	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2
(z.B. Zähne-Schneiden, Anbringen der Ohrmarken, Kastrierung)			
Dreschen oder Getreidemahlen	S90 13	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2
Eier im Geflügelstall einsammeln .....	S90 14	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2
Reinigung des Hühnerstalles .....	S90 15	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2
Sonstiges: _____	S90 16s	S90 16	<input type="checkbox"/> 1

not ticked=2

**92. Wie häufig im Durchschnitt haben Sie während dieser Schwangerschaft im Stall gearbeitet oder sich dort aufgehalten?**

**Im 1. bis 3. Schwangerschaftsmonat,**

wie viele Tage pro Woche?

S92\_01a

Wie viele Stunden pro Tag?

S92\_01b

**Im 4. bis 6. Schwangerschaftsmonat,**

wie viele Tage pro Woche?

S92\_02a

Wie viele Stunden pro Tag?

S92\_02b

0.01= add. text indicating a very short time

**Im 7. bis 9. Schwangerschaftsmonat,**

wie viele Tage pro Woche?

S92\_03a

Wie viele Stunden pro Tag?

S92\_03b

**116. Haben Sie Haustiere?**

Ja.....1

S116

Nein.....2

⇒ weiter mit

**Frage 124**

125. Haben Sie in Ihrem Leben insgesamt mehr als 5 Schachteln Zigaretten geraucht?

Ja.....1

S125

Nein.....2

⇒ weiter mit

Frage 135

126. Haben Sie das Rauchen inzwischen aufgegeben?

Ja.....1

S126

⇒ weiter mit

Frage 127

Nein.....2

⇒ weiter mit

Frage 132

127. Bitte geben Sie an, wie viele Zigaretten Sie durchschnittlich geraucht haben, als Sie noch rauchten?

*Durchschnitt bezogen auf die gesamten Jahre in denen die Probandin geraucht hat.*



\_\_\_ Zigaretten pro Tag

S127

130. War das während dieser Schwangerschaft?

Ja.....1

S130

Nein.....2

⇒ weiter mit

Frage 135

132. Bitte geben Sie an, wie viele Zigaretten Sie im Durchschnitt pro Tag rauchen?

\_\_\_ Zigaretten pro Tag

S132

133. Bitte geben Sie an, wie viele Zigaretten Sie durchschnittlich pro Tag rauchten, bevor Sie wussten, dass Sie schwanger sind?

*Durchschnitt bezogen auf die gesamten Jahre, in denen die Probandin geraucht hat.*

\_\_\_ Zigaretten pro Tag S133

137. Haben Sie während dieser Schwangerschaft Frischmilch direkt vom Bauernhof getrunken?

Ja.....1 S137

Nein.....2 ⇒ weiter mit

Frage 141

138. Kochen Sie diese Milch normalerweise vor dem Trinken ab?

Ja, aber nur während der Sommermonate .....1

Ja, immer .....2 S138

Nein .....3

146. Wie ist Ihr gegenwärtiger Familienstand? Sind Sie:

*Vorgaben vorlesen*

*Sonstige Angaben bitte zusätzlich notieren*

S146

Verheiratet .....1

in einer festen Beziehung lebend, aber nicht verheiratet .....2

geschieden oder getrennt lebend .....3

sonstiges \_\_\_\_\_ S146s .....4

147. Wie viele Geschwister haben Sie?

Bitte zählen Sie alle Geschwister mit, mit denen Sie während Ihrer Kindheit zusammengelebt haben.

Geschwister \_\_\_\_\_ Anzahl S147

**148. Welches ist Ihr höchster Schul- bzw. Hochschulabschluss?**

-  *Liste 6 vorlegen*
-  *Vorgaben einzeln vorlesen*
-  *Bitte nur den höchsten Abschluss ankreuzen*

S148

- kein Schulabschluss.....  **1**
- Hauptschule/ Volksschule .....  **2**
- Realschule/ Mittlere Reife .....  **3**
- Abitur/ Fachabitur.....  **4**
- Hoch- / Fachhochschule.....  **5**

Andere Ausbildung **6** – welche?

S148s

7.4.2. Auszüge aus dem 1-Jahresfragebogen

ID: \_\_\_\_\_ ID



Fragebogen zum 1. Lebensjahr

Ihres Kindes

Ulm, September 2003

## Fragen zur Gesundheit Ihres Kindes

### Husten

Wahrscheinlich hatte Ihr Kind bereits irgendwann einmal Husten. Wir würden gern Näheres über die Art des Hustens erfahren.

**1. Hatte Ihr Kind seit unserem letzten Hausbesuch Husten, ohne dass es erkältet war (d.h. ohne Schnupfen und ohne Fieber über 38,5°C)?**

E01

Ja.....  1

Nein .....  2 ⇒ weiter mit Frage 4

**5. Wie häufig hatte Ihr Kind seit unserem letzten Hausbesuch pfeifende oder keuchende Atemgeräusche, ohne dass es erkältet war?**

E05

Nie .....  1

Seltener als einmal pro Monat.....  2

Einmal pro Monat.....  3

Mindestens zweimal pro Monat.....  4

### Hauterkrankungen

**10. Hatte Ihr Kind seit unserem letzten Hausbesuch einen juckenden Hautausschlag mit Kratzen und Reiben der Haut?**

E10

Ja.....  1

Nein .....  2 ⇒ weiter mit Frage 24

### Ärztliche Diagnosen

**25. Wurde bei Ihrem Kind seit unserem letzten Hausbesuch von einem Arzt/ einer Ärztin eine der folgenden Erkrankungen diagnostiziert?**

nie      einmal      mehrmals

Spastische Bronchitis, obstruktive Bronchitis  
oder asthmatische Bronchitis .....  1 .....  2 .....  3 E25\_01

Asthma.....  1 .....  2 .....  3 E25\_02

Neurodermitis bzw. atopisches Ekzem .....  1 .....  2 .....  3 E25\_03

Lungenentzündung .....  1 .....  2 .....  3 E25\_04

Pseudokrupp.....  1 .....  2 .....  3 E25\_05

**38. Hat Ihr Kind seit unserem letzten Hausbesuch Kuhmilch oder Ziegenmilch (verdünnt oder unverdünnt) getrunken?**

Bitte beachten Sie, dass hier nicht Säuglingsmilchprodukte gemeint sind.

	ja	nein	
Kuhmilch direkt vom Bauernhof, ohne Abkochen .....	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	E38_01
Kuhmilch direkt vom Bauernhof, abgekocht .....	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	E38_02
Vorzugsmilch .....	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	E38_03
<b>Schweiz: Vorzugsmilch (z.B. Demeter), Rohmilch</b>			
<b>Österreich: keine Antwortkategorie Vorzugsmilch!</b>			
Pasteurisierte Frischmilch (Kuhmilch) .....	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	E38_04
H-Milch (Kuhmilch) .....	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	E38_05
<b>Schweiz: UHT-Milch, H-Milch</b>			
Zubereitungen aus Milchpulver (Kuhmilch) .....	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	E38_06
Nicht pasteurisierte Ziegenmilch .....	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	E38_07

**42. Verträgt Ihr Kind bestimmte Nahrungsmittel nicht?**

Ja.....  1 E42

Nein .....  2 ⇒ weiter mit Frage 49

**Fragen zur landwirtschaftlichen Umgebung**

Die Fragen, die wir Ihnen nun stellen, beziehen sich auf Ihren Kontakt zur Landwirtschaft bzw. Ihre landwirtschaftliche Tätigkeit. Bitte denken Sie daran, dass es ausschließlich um die Zeit seit unserem letzten Hausbesuch, d.h. ungefähr um die letzten 10 Monate geht.

**52. Hat Ihr Kind seit unserem letzten Hausbesuch auf einem Bauernhof gelebt oder haben Sie oder Ihre Familie in dieser Zeit einen Hof bewirtschaftet?**

Ja.....  1 E52

Nein .....  2 ⇒ weiter mit Frage 77

### Fragen zum Stallaufenthalt Ihres Kindes

Wir haben Sie bereits im Tagebuch zu Stallaufenthalten Ihres Kindes befragt. Da dies aber für uns ein wichtiges Thema ist, möchten wir Ihnen hier nochmals einige Fragen zu Stallbesuchen Ihres Kindes stellen.

**72. Wie häufig wurde Ihr Kind seit unserem letzten Hausbesuch mit in den Stall genommen? Wir meinen damit Ställe von Großvieh wie Kühe, Schweine, Pferde, Schafe, Ziegen.**

Gar nicht .....  not ticked = 2 ...  **1** ⇒ weiter mit Frage 74

E72\_01

Durchschnittlich E72\_02 Tage pro Woche

An diesen Tagen durchschnittlich E72\_03 Stunden pro Tag

**73. War Ihr Kind seit unserem letzten Hausbesuch regelmäßig während der Fütterung der Tiere oder in der ersten Stunde nach der Fütterung im Stall anwesend? Mit regelmäßig meinen wir mindestens einmal pro Woche.**

Ja .....  **1**

E73

Nein .....  **2**

**74. Haben Sie Ihr Kind zur letzten Heuernte mitgenommen?**

Ja .....  **1**

E74

Nein .....  **2**

## 7.5. Danksagung

Diese Arbeit wurde am Kubus Forschungszentrum der Dr. von Haunerschen Kinderklinik der LMU unter Betreuung von Frau Prof. Dr. Erika von Mutius und unter Mitbetreuung von Frau PD Dr. Susanne Krauss-Etschmann, Klinische Kooperationsgruppe pädiatrische Immunregulation, durchgeführt.

Als erstes möchte ich mich recht herzlich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Erika von Mutius dafür bedanken, dass sie mir die Arbeit an dieser Dissertation ermöglichte und für ihr Interesse und ihre Hilfe bei dieser Arbeit.

Besonderen Dank auch an PD Dr. Susanne Krauss-Etschmann für ihr Engagement bei der Betreuung meiner Arbeit und ihre Ideen und Ratschläge bei der Analyse und Interpretation der Daten.

Herzlichen Dank auch an Dr. Sabina Illi für ihre Hilfe in statistischen Fragen.

Außerdem möchte ich mich bei allen Beteiligten der PASTURE- Studie bedanken, die ihren Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Vielen Dank auch an meine Kollegen aus dem Labor Christine Adderson, Isabelle Kusche, Eva Schnabel, Yumiko Matsuba, Silke Chavez, Anastasia Schneider, Anke Runge, Tatiana Binder, Thomas Brunner, Sandra Zimmermann, Sonja Güthoff, Johannes Aicher, Cornelia Dalibor, Gaby Heilig, Dr. Rania Shadid und besonders an Dr. Daniela Plabst für ihren Beistand und die vielen netten Stunden im Labor.

Ich möchte diese Arbeit meiner Familie widmen, meinen Großeltern, meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Freund Gernot Göhner, als ganz besonderen Dank für ihr Verständnis, offenes Ohr und ihre stetige moralische Unterstützung. Danke für alles!

## 7.6. Lebenslauf

### **Sylvia Christina Maier**

#### Persönliche Daten

Geburtsdatum	21.8.1978
Geburtsort	München
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand:	ledig

#### Schulbildung

1985-1989	Grundschule an der Haldenbergerstrasse, München
1989-1998	Louise-Schröder-Gymnasium, München, neusprachlicher Zweig
06/1998	Abitur

#### Auslandsaufenthalte

10/1998- 07/1999	Au-pair Aufenthalt mit Französisch-Sprachkursen in Lyon und Paris
05/2004- 11/2004	Forschungsarbeit an der University of British Columbia in Vancouver, Kanada (s. Praktika)

#### Studium

11/1999- 09/2003	Studium der Pharmazie an der LMU in München
03/2005	Approbation zur Apothekerin
04/2005- 12/2007	Dissertation an der Dr. von Haunerschen Kinderklinik in München bei Prof. E. v. Mutius Nebenher als Apothekerin in der Elefanten- und Brahmsapotheke in München tätig

#### Praktika

04/2000	Famulatur in der Rosenapotheke in München
09/2000	Famulatur in der Apotheke des Krankenhauses am Friedrichshain in Berlin
08/2002	Mitarbeiterin im Arbeitskreis von Prof. Vollmar, Pharmazeutische Biologie
11/2003- 04/2004	Pharmaziepraktikantin in der Isarapotheke in München
05/2004- 11/2004	Forschungsarbeit im Rahmen des PJ an der University of British Columbia in Vancouver, Kanada bei Prof. Cullis, Department of Biochemistry

## Erklärung über eigenständige Abfassung der Arbeit

### Erklärung

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

### Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den

---

Sylvia Maier