

Florian Gerlach

**Art und Ausmaß der lymphoproliferativen Antwort  
auf LPS und SEB Stimulation bei Bauernkindern  
im Vergleich zu Kontrollgruppen**



Aus der Kinderklinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
Der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Reinhardt

Art und Ausmaß der lymphoproliferativen Antwort auf LPS und SEB Stimulation bei  
Bauernkindern im Vergleich zu Kontrollgruppen

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

vorgelegt von  
Florian Gerlach  
aus  
München

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. E. v. Mutius
2. Berichterstatter	Priv. Doz. Dr. M. Mack
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Th. Brocker Prof. Dr. St. Endres Prof. Dr. Dr. H.-E. Wichmann
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	10.07.2003

Am Anfang war es nur ein Gedanke...

# INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	9
1.1 Umwelteinflüsse, die die Entstehung allergischer Erkrankungen beeinflussen	10
1.1.1 Luftverschmutzung	11
1.1.2 Verkehrsbelastung	12
1.1.3 Ozonbelastung	13
1.1.4 Einfluss des Passivrauchens	14
1.1.5 Sozioökonomischer Status	15
1.1.6 Ernährung	16
1.1.7 Allergenexposition	
1.1.8 Familiengröße	18
1.1.9 Infektionen	19
1.2 Th1-Th2 Muster bei allergischen Erkrankungen	24
1.2.1 Bedeutung der T-Helferzellpopulation	24
1.2.2 Die allergische Entzündungsreaktion	26
1.2.3 Allergie und Schwangerschaft	28
1.2.4 Angeborene/ erworbene Immunität	30
2. Zytokine	33
2.1 Interleukin 5	35
2.2 Interleukin 10	36
2.3 Interleukin 12	36
2.4 Interferon $\gamma$	38
2.5 Tumor Nekrose Faktor $\alpha$	39
3. Hypothesen	41

4. Methoden	43
4.1 Studienaufbau und Logistik	43
4.2 Studienpopulation	44
4.3 Fragebögen zur Gesundheit	46
4.4 Interview beim Hausbesuch	47
4.5 Blutuntersuchungen	47
4.6 Staubsammlung/ Endotoxinmessung	48
5. Zytokin/ Zellstimulation, Methodenvergleich	50
5.1 Material/ Lösungen	50
5.2 konventionelle Dichtegradientenseparationstechnik	52
5.3 Separationstechnik in bereits vorgefertigtem Trennmedium (BD Methode)	53
5.4 in-vitro Stimulation mittels Vollblutmethode	53
5.5 Stimulation in vorbeschichteten LPS bzw. SEB-Röhrchen	54
5.6 Methodenvergleich	54
6. Zytokinmessungen durch ELISA	59
6.1 Puffer/ Lösungen	60
6.2 ELISA-Arbeitsschritte	61
7. Statistische Analysen	63
8. Studienteilnahme	64
9. Resultate	66
9.1.1 Endotoxinwerte Bauern versus Nicht-Bauern	66
9.1.2 Auswirkung der Endotoxinexposition auf die Gesundheit	66
9.1.3 Ergebnisse atopischer Zielvariablen versus „Bauernsein“	75
9.1.4 Einfluss von Rohmilch/Stallkontakt im 1.Lebensjahr	78
9.1.5 Einfluss Stallexposition/ Rohmilchkonsum adjustiert für die Endotoxinkonz.	79
9.2 Zytokine	80
9.2.1 Zytokinkonzentration nach Zellstimulation: Bauern versus Nicht-Bauern	80

9.2.2 Endotoxinkonzentration versus Zytokinproduktion	86
9.2.3 Ergebnisse atopischer Zielvariablen versus Zytokinkonzentration	91
9.2.4 Zytokinkonzentration bei atopischen Bauernkindern	92
10. Diskussion	93
11. Zusammenfassung	99
12. Anhang	101
12.1 Fragebogen	101
12.2 Staubnahmeprotokoll	117
13. Quellenverzeichnis	119
13.1 Literatur	119
13.2 Abbildungen	144
13.3 Tabellen	145



## **1.) Einleitung:**

Heuschnupfen und andere allergische Krankheiten sind heute in der westlichen Wohlstandsgesellschaft alltäglich geworden. So wird zum Beispiel die Prävalenz von Heuschnupfen in Großbritannien auf 38,6% und in den Vereinigten Staaten auf 33,6% geschätzt.(1) Indessen war Heuschnupfen, heute eine einfache und leicht erkennbare Krankheit, vor 200 Jahren im Grunde genommen in Europa und Nordamerika unbekannt.(2) Erst im frühen 19. Jahrhundert wurde Heuschnupfen beschrieben und zu dieser Zeit als eine eher unübliche Krankheit angesehen. In diesem Jahrhundert jedoch haben allergische Erkrankungen enorme Bedeutung erlangt.(3) Neben diesem im Lauf der Zeit aufgetretenen Wandel können zusätzlich immer noch signifikante Unterschiede in der Prävalenz allergischer Erkrankungen in verschiedenen Regionen der Welt gefunden werden. Dies ist der Fall, wenn man die Erkrankungsraten westlicher Regionen mit den Erkrankungsraten von Regionen vergleicht, die einen niedrigeren Lebensstandard besitzen (wie z.B. in Regionen Osteuropas oder Ländern der Dritten Welt). Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß die Prävalenz von Heuschnupfen und Asthma in einigen ländlichen Gegenden Afrikas, Ost-Russlands und in Entwicklungsländern außerordentlich niedrig ist, wenn nicht sogar völlig fehlt.(1,4,5) Da genetische Faktoren weder die Prävalenzzunahme über die vergangenen Jahrzehnte noch den signifikanten und teilweise großen Prävalenzunterschied zwischen Regionen mit ähnlichem ethnischen Hintergrund erklären können, ist ein starker Einfluss der Umwelt auf die Ausprägung allergischer Erkrankungen sehr wahrscheinlich. Diese Annahme wird auch dadurch bekräftigt, daß zwar eine familiäre Häufung atopischer Krankheiten vorkommt, aber deren Anteil an der Prävalenzzunahme dieser Krankheiten gering ist.(6)

Das  $\lambda$  für Asthma (d.h. das Risiko, dass ein Geschwisternteil eines Asthmatikers auch Asthma hat, geteilt durch das Risiko, daß ein nicht Verwandter der gleichen Population Asthma hat) beträgt nur um die 2. Im Vergleich dazu beträgt es bei der zystischen Fibrose 500 und bei der Schizophrenie 8,6.

Die Vorstellung, dass Umwelteinflüsse ein Grund für die Entstehung einer Krankheit sind, wurzelt in der Beobachtung von Epidemien und der darauffolgenden Identifizierung ihrer Ursachen, wie etwa bei der Cholera im Falle von John Snow in London oder des Mykobakteriums Tuberkulosis von Robert Koch. Diese Vorstellungen haben im letzten Jahrhundert die medizinische Behandlung enorm verbessert. Die Folge dieser verbesserten Behandlungsmöglichkeiten waren merklich sinkende Sterberaten bei Infektionskrankheiten, die Anfang dieses Jahrhunderts noch die Haupttodesursache waren. An die Stelle der Infektionskrankheiten traten andere Todesursachen wie z.B. kardiovaskuläre Krankheiten oder Krebs.(7) Mit der Zeit sind andere „moderne“ chronische Krankheiten aufgetreten, bei denen solch einseitige Vorstellungen, dass ein Keim seinen Wirt befällt oder ein Faktor nur nachteilig auf ein Individuum einwirkt, sich als falsch erweisen könnten.

Viele Jahrhunderte war es zum Überleben notwendig, sich an eine feindselige Umwelt anzupassen. Durch Selektion könnten solche Anpassungen über Generationen hinweg als der „normale“, „gesunde“ Zustand angesehen werden. Der Mensch ist aber nicht nur neuen Einflüssen ausgesetzt, sondern es könnte auch sein, dass ihm protektive Stimuli aus der Umwelt fehlen. In chronischen Krankheiten könnten sich infolgedessen „normale“, aber nicht mehr richtig angepasste Reaktionen an die moderne Umwelt, der wir ausgesetzt sind, widerspiegeln.

Allergische Erkrankungen haben zahlreiche gemeinsame Kennzeichen, beispielsweise die Bildung von IgE Antikörpern als Reaktion auf Allergene(8), ein verschobenes Gleichgewicht zwischen Zytokinen der Th1- und Th2- Typ Lymphozyten(9) oder eine positive Familienanamnese für atopische Krankheiten.(10) Manchmal können auch mehrere Atopiemerkmale in einem Individuum zum Ausdruck kommen. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten haben viele klinische und epidemiologische Untersuchungen Personen mit unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen von atopischen Krankheiten zu einer Krankheitsklasse zusammengefasst. Diese Zusammengruppierung wurde vorgenommen, um den Mechanismus, welcher der Krankheit zugrunde liegt, zu untersuchen. Dies gilt für die Risikofaktoren und auch das Ansprechen der Betroffenen auf Therapien. Es gibt jedoch zunehmend Hinweise, dass sogar Patienten mit dem gleichen Symptom (z.B. Giemen ) sich merklich unterscheiden können, wenn man die damit verbundenen Erscheinungen berücksichtigt, wie z.B. den Nachweis von IgE Antikörpern gegen Allergene aus der Umwelt, die Reaktion der Bronchien auf direkte und indirekte Stimuli, das Alter in dem die Krankheit erstmals auftrat und das Ansprechen auf die Behandlung.(11) Verschiedene Subtypen von Krankheiten können eventuell zu gleichen klinischen Symptomen führen, welche aber abhängig sind von dem komplexen genetischen Hintergrund und der Vielzahl der Umwelteinflüsse, die auf den Patienten einwirken. Betrachtet man die rasante Zunahme unseres Wissens im Bereich der Erforschung der genetischen Ursachen von Krankheiten, so werden wohl zunehmend Unstimmigkeiten auftreten, die das Verständniss von multifaktoriellen chronischen Erkrankungen, wie es allergische Erkrankungen sind, noch komplexer gestalten.

## **1.1) Umwelteinflüsse, die die Entstehung allergischer Erkrankungen beeinflussen**

Im folgenden wird im einzelnen dargestellt, wie verschiedene Umwelteinflüsse die Entstehung von allergischen Erkrankungen beeinflussen.

### **1.1.1) Luftverschmutzung :**

Die Luftverschmutzung wird von vielen als eines der bedeutenderen Probleme angesehen, die in letzter Zeit auf uns zukamen, und die eine potentielle Gefahr für die Gesundheit und das Wohlbefinden der Bevölkerung darstellt. Bei dem Versuch, die möglichen negativen Effekte der Luftverschmutzung zu verstehen, ist es wichtig zu unterscheiden, ob eine bereits bestehende Krankheit sich verschlimmert, oder ob die Luftverschmutzung bei der Entstehung einer sich neu entwickelnden allergischen Erkrankung mitwirkt. Obwohl sich die Hinweise mehren, dass eine Verschlimmerung von Asthma durch verschiedene luftverschmutzende Stoffe ausgelöst werden kann und dass allergische Reaktionen durch bestimmte Umweltgifte verstärkt werden(12), gibt es hingegen wenige Hinweise, dass Luftverschmutzung die Inzidenz von allergischen Krankheiten erhöht. Die Wiedervereinigung Deutschlands stellte eine einzigartige Gelegenheit dar, die Auswirkungen der Luftverschmutzung auf die Entwicklung von Asthma und atopischer Krankheiten zu untersuchen. In beiden Teilen des Landes waren für mehr als 40 Jahre genetisch ähnliche Populationen grundlegend unterschiedlichen Umwelteinflüssen ausgesetzt. Industrialisierte Gebiete in der ehemaligen Deutschen Demokratischen Republik wiesen übermäßig hohe Pegel an Schwefeldioxid während des Winters (0,105 ppm Jahresdurchschnitt) und Schwebstaub ( $80 \mu\text{g}/\text{m}^3$  Jahresdurchschnitt) auf, wohingegen in westdeutschen Städten die Konzentration von Stickstoffdioxid ( $\text{NO}_2$ ) (0,028 ppm Jahresdurchschnitt) höher war. Letzteres spiegelt den wesentlich dichteren Autoverkehr wieder.(13) Verschiedene Studien an Kindern und Erwachsenen haben übereinstimmend gezeigt, dass die Prävalenz von Asthma, bronchialer Hyperreagibilität, Heuschnupfen und atopischer Erkrankungen im Vergleich zu westdeutschen Städten signifikant niedriger war.(14,15) Ebenso war die Prävalenz von Asthma und atopischer Sensibilisierung niedriger bei Schulkindern, die in dem mehr verschmutzten Ostteil der baltischen Länder lebten, als in West - Schweden mit weniger Luftverschmutzung.

### **1.1.2) Verkehrsbelastung:**

Es wurde die Meinung vertreten, dass andere Arten von Luftschadstoffen, die mit der steigenden Verkehrsbelastung der westlichen Städte in Verbindung stehen, von größerer Bedeutung für das Entstehen von allergischen Erkrankungen sind als die „traditionellen“ Abgase, welche entstehen, wenn man Kohle oder andere fossile Brennstoffe verbrennt.

Dieselabgase stellen weltweit den Hauptanteil der Abgaspartikel in den meisten Stadtgebieten dar. In manchen Großstädten machen sie sogar bis zu 90% der Partikelmasse aus.(18) Der mittlere Durchmesser von Partikeln aus Dieselabgasen beträgt etwa 0,2µm, wobei mehr als 90% der Partikel <1µm ist.(19) Dadurch werden diese Partikel in einem hohen Maße in den peripheren Luftwegen abgelagert. Es konnte gezeigt werden, dass Dieselpartikel Allergene von Gräserpollen auf ihrer Oberfläche absorbieren und deshalb als potente Carrier wirken, die sich dann vermehrt in der Lunge ablagern können.(20) Dadurch kann sowohl die Allergenmenge als auch die Antigenität der Pollenallergene gesteigert werden. In der Tat haben verschiedene Studien gezeigt, dass die Exposition mit Dieselpartikeln nach einer Allergenbelastung bei einer in vivo Belastung von Freiwilligen zu einer gesteigerten Expression von Th2 Zytokinen (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) führt.(21) Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Dieselabgaspartikel die Adhäsion eosinophiler Zellen an die Epithelzellen der Nasenschleimhaut erhöhen, eine Degranulierung bewirken(22) und die nasale IgE Produktion induzieren. Die Ergebnisse dieser Studien deuten darauf hin, daß eine Dieselabgasexposition eine bereits vorbestehende allergische Disposition verschlimmern kann, aber nicht unbedingt die Entstehung eines neuen Falles von Atopie bewirkt. Ergebnisse von epidemiologischen Studien deuten darauf hin, dass die Höhe der Exposition von Verkehrsabgasen bei der Entstehung von Asthma und atopischen Krankheiten eine untergeordnete, wenn nicht sogar gar keine Rolle spielt.(24-26) Eine in München durchgeführte Untersuchung ergab, daß eine hohe Belastung durch Straßenverkehrsemissionen bei Kindern die Lungenfunktion vermindert und die Prävalenz respiratorischer Symptome erhöht.(24) Die Prävalenz der allergischen Rhinitis, von Asthma, bronchialer Hyperreagibilität und atopischer Sensibilisierung war nicht mit einem steigenden Verkehrsaufkommen assoziiert. Verschiedene andere Studien haben die Effekte der Fahrzeugabgasexposition in Japan, den Niederlanden, Großbritannien und Deutschland untersucht. Die Prävalenz respiratorischer Symptome wie Giemen, Auswurf und chronische Erkältung korrelieren laut japanischen und dänischen Studien bei weiblichen Patientinnen mit der Nähe ihres Wohnumfeldes zu einer Hauptverkehrsstraße.(27, 28) Allerdings beinhaltete keine der Studien einen objektiven Parameter für die Erkrankung.

In Großbritannien und Schweden durchgeführte Studien ergaben, dass Vorschulkinder, die wegen Asthma und Giemen im Krankenhaus aufgenommen wurden, häufiger in einer Gegend mit hoher Verkehrsdichte und erhöhten  $NO_2$  Belastungen aus Verkehrsabgasen wohnten.(29, 30) Ein

signifikanter Anteil dieser Kinder mag aber in beiden Studien ein vorübergehendes frühes Giemen durch eine virale Infektion gehabt haben, was jedoch nicht mit der Entwicklung von fortschreitendem Asthma im Kindesalter in Verbindung steht. Eine oft zitierte japanische Untersuchung beschreibt eine erhöhte Prävalenz von Zedernpollenallergien in Gebieten mit einer hohen Verkehrsbelastung und begleitend erhöhten Pollenmeßwerten.(31) Die Ergebnisse dieser Studie sollten jedoch mit großer Vorsicht interpretiert werden, da potentielle Störfaktoren wie z.B. der sozioökonomische Status nicht untersucht wurden. Eine Untersuchung von Schulkindern, die in Dresden (Ost-Deutschland) lebten, bewertete die individuelle Höhe der Belastung der Kinder, bezogen auf die jährliche Höhe der gewöhnlichen Luftverschmutzung (Schwefeldioxid,  $NO_2$ , Kohlenmonoxid, Benzen und Ozon). Dabei wurde die Luftverschmutzung in einem 1  $km^2$ -Radius um die Wohnung und die Schule jedes Studienteilnehmers gemessen. Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen den nachteiligen Effekt der Luftverschmutzung in Stadtgebieten auf die Prävalenz von Husten und Bronchitis. Sie zeigen jedoch keine Verbindung zwischen der Höhe der Verschmutzung und der Prävalenz von Heuschnupfen, Atopie und BHR.(25) Ebenso war bei holländischen Schulkindern die Exposition gegenüber Lastwagenverkehr mit respiratorischen Symptomen und einer leichten Verringerung der Lungenfunktion verbunden. Es führte aber nicht zu Atopie und BHR.(26)

### **1.1.3) Ozonbelastung:**

Es wurde gezeigt, dass bereits eine einmalige Ozonexposition Husten, Atemlosigkeit und Brustschmerzen bei der Inspiration hervorruft, zu einer restriktiven Ventilationsstörung mit einem Rückgang der forcierten Vitalkapazität und FEV1 führt, neutrophile Entzündungszellen in der Submukosa der Atemwege induziert und die Reaktivität der Atemwege steigert.(12) Die Empfindlichkeit gegenüber Ozon variiert bei verschiedenen Patienten stark.(32,33) Bei ca. 10-20% der Bevölkerung bewirkt eine Ozonexposition einen Rückgang der Lungenfunktion(34,35), während andere dafür nicht empfindlich sind. Versuche an Tieren und Menschen haben gezeigt, dass der stärkste Rückgang der Vitalkapazität und des FEV1 am 2. Tag nach der Exposition auftritt und dass die Symptome und die spirometrischen Veränderungen ab dem 5. Tag unbedeutend werden. Es bleibt jedoch unklar, ob die ozoninduzierte Übererregbarkeit der Luftwege nach wiederholter Exposition bestehen bleibt. Verschiedene Studien ergaben widersprüchliche Hinweise(38-41), die noch weiterer genauer Untersuchungen bedürfen. Die meisten Studien stellten nach einer Ozonexposition eine signifikante entzündliche Veränderung der Atemwege fest. In der Bronchiallavageflüssigkeit(42-46) und in den Proben von Mukosabiopsien großer Luftwege(45) wurden dabei verschiedene Zytokine und Leukotriene gefunden und eine Zunahme der

neutrophilen, nicht aber der eosinophilen Granulozyten festgestellt. Die Art der Entzündung der Luftwege, die nach einer Ozonexposition auftritt, unterscheidet sich aber wesentlich von den entzündlichen Veränderungen in den Atemwegen asthmatischer Patienten. Aufgrund der auffälligen entzündlichen Reaktionen der Atemwege und der Möglichkeit, dass sich bei Gesunden eine BHR entwickelt, ergibt sich die Befürchtung, dass Ozon die Entwicklung von Asthma bei entsprechend Exponierten begünstigt. Es gibt aber nur wenige epidemiologische Studien, die sich mit dieser Frage beschäftigen. In der amerikanischen „Six Cities“ Studie(47) erhöhte sich die Prävalenz von diagnostiziertem juvenilen Asthma signifikant bei steigenden Ozonkonzentrationen. Im Gegensatz dazu konnte dieser Trend bei den Symptomen von Heuschnupfen nicht gezeigt werden. Außerdem beinhaltet diese Studie keinen objektiven Maßstab für Atopie, Lungenfunktion oder Anregbarkeit der Atemwege. In der multizentrischen Schweizer SCARPOL(48) Studie, die ein ähnliches Studiendesign benutzte, um die Exposition über einen großen Konzentrationsbereich festzustellen, stand weder die Prävalenz von Asthma noch von Heuschnupfen mit einer Langzeitozonbelastung in Verbindung. Bei Erwachsenen konnten ebenfalls keine übereinstimmenden Effekte gezeigt werden, die besagen, dass eine Langzeitozonexposition sich auf die Entstehung von Asthma und Atopie auswirkt.(49,50)

#### **1.1.4) Einfluss des Passivrauchens:**

Es gibt starke übereinstimmende Hinweise, die nahelegen, dass die Exposition von Tabakrauch im Säuglings- und Kindesalter zu einem erhöhten Risiko von Entzündungen der unteren Atemwege führt.(51-52) In einem Bericht über die nachteiligen Effekte von Tabakrauch auf die Gesundheit zog die US Environmental Protection Agency(51) den Schluss, dass Passivrauchen vor allem bei Säuglingen und jüngeren Kindern ursächlich mit einem erhöhten Risiko von Entzündungen der unteren Atemwege wie Bronchitis und Pneumonie verbunden ist. Ausserdem wurde eine geringe, aber signifikante, dosisabhängige Verringerung der Lungenfunktion festgestellt. Des weiteren ergab sich, dass sich bei Kindern mit Asthma die Asthmaepisoden häuften, und die Symptome verschlimmerten. Ferner wurde in dieser Studie die Belastung mit Zigarettenrauch als ein Risikofaktor dafür angesehen, dass sich neue Fälle von Asthma bei bislang symptomfreien Kindern entwickelten. Die Tatsache, dass bei Kindern, deren Mütter während der Schwangerschaft geraucht haben, ein Rückgang der Lungenfunktion mit nachfolgenden Erkrankungen der unteren Atemwege während der ersten Lebensjahre auftritt, mag dafür sprechen, dass sich vorwiegend das Risiko erhöht, eine frühkindliche viralassozierte Obstruktion zu entwickeln. Passivrauchen muss deswegen nicht notwendigerweise das Risiko für die Entstehung eines frühkindlichen Asthma erhöhen. In der großen Geburtenkohortenstudie in Tucson, Arizona, konnte sowohl das

vorübergehende frühe Keuchen als auch das bis zum 6ten Lebensjahr fortbestehende Giemen (was wohl gleichwertig mit der ärztlichen Diagnose „Asthma“, die in anderen Studien gestellt wurden, angesehen werden kann) mit ETS in Beziehung gesetzt werden.(11) Kinder, deren Mütter eine 12 jährige oder geringere Schulbildung aufwiesen und die 10 oder mehr Zigaretten pro Tag rauchten, hatten 2,5 mal häufiger Asthma (odds ratio [OR] 2,5 ;95% Konfidenzintervall [KI] 1,42-4,59, p=0,002) als Kinder deren Mütter den gleichen Bildungsstand aufwiesen, aber nicht bzw. weniger als 10 Zigaretten pro Tag rauchten.(53) In einer britischen Kohortenstudie, die 9670 Kinder bis zum 10ten Lebensjahr beobachtete, wurde ein 14%iger Zuwachs an asthmoider Bronchitis bei Kindern festgestellt, wenn die Mütter 4 oder mehr Zigaretten pro Tag rauchten.(54) Dieser Anteil erhöhte sich auf 49%, wenn die Mutter mehr als 14 Zigaretten am Tag rauchte. Eine südafrikanische Fall-Kontrollstudie, die kürzlich mit 7- bis 9- jährigen Kindern durchgeführt wurde,(55) berichtet, dass bei Müttern, die während der Schwangerschaft rauchten, das Risiko des Kindes, Asthma oder Giemen zu entwickeln, fast 2 fach erhöht war (OR 1,9; 95% KI 1,2-2,8). Ausserdem erhöhte zusätzlich jedes rauchende Familienmitglied diesen Effekt signifikant (OR 1,15; 95% KI 1,0-1,3), was darauf hindeutet, dass das Risiko für Asthma nicht nur durch eine passive Zigarettenrauchexposition in utero zunimmt (obwohl dieser Effekt stärker ist(51)) sondern auch postnatal durch Passivrauchen. Eine umfassende Metaanalyse hat bestätigt, daß die Inzidenz und Prävalenz von Giemen und Asthma sich signifikant erhöht, wenn die Kinder dem Zigarettenkonsum der Mutter ausgesetzt waren.(56) Ferner zeigte dieser Bericht eine geringe, aber wahrscheinlich echte Zunahme der BHR bei Kindern rauchender Mütter auf. Deshalb gibt es überzeugende Hinweise, die nahelegen, daß eine kausale Verbindung zwischen der passiven Exposition gegenüber Zigarettenrauch und der Entstehung des Asthma bronchiale im Kindesalter besteht. Es finden sich jedoch widersprüchliche Ergebnisse in Studien, welche die Effekte der ETS auf die Entstehung atopischer Sensibilisierung bei Kindern untersuchen.(56)

Nach Einsicht von 36 Studien über IgE, Hauttestreagibilität, Heuschnupfen und atopische Ekzeme konnte aufgrund der Ausgewogenheit der Resultate keine Verbindung zwischen dem Rauchen der Eltern (sowohl pränatal als auch postnatal) und der atopischen Sensibilisierung hergestellt werden.(56)

### **1.1.5) Sozioökonomischer Status:**

In der westlichen Überflussesgesellschaft wurden hohe Prävalenzen von Asthma bronchiale und atopischen Erkrankungen im Kindesalter gefunden. In Entwicklungsländern konnte ein Gefälle zwischen den wohlhabenden und den armen Regionen beobachtet werden. In Harare, der Hauptstadt von Zimbabwe, war die Hyperreagibilität der Atemwege, die durch einen freien Lauftest

festgestellt wurde, in den wohlhabenderen Teilen der Stadt signifikant höher als in den ärmeren Stadtvierteln.(57)

In Großbritannien korrelierte die Zugehörigkeit zu einer höheren Sozialschicht signifikant mit einer höheren Prävalenz des atopischen Ekzems.(58) Darüber hinaus wurde bei italienischen Militärrekruten eine auffallende Beziehung zwischen einem gesteigerten sozioökonomischen Status der Eltern und der gesteigerten IgE Produktion auf ein Palette ubiquitärer Allergene gefunden.(59)

Diese Feststellungen können nicht in allen Regionen reproduziert werden. Insbesondere in innerstädtischen Gebieten der USA war bei niederen sozialen Schichten wiederholt eine gesteigerte Morbidität für Asthma zu finden.(60) Deshalb ist es möglich, dass der sozioökonomische Status von Familien eher ein stellvertretendes Maß für typische Lebensgewohnheiten darstellt als einen Risikofaktor an sich. Diese Faktoren bestehen möglicherweise aus Ernährungsgewohnheiten, Familiengröße, der Verfügbarkeit einer medizinischen Versorgung, Tabakrauchbelastung der Umwelt, Exposition gegenüber Allergenen oder bis jetzt noch unbekanntem Faktoren.

#### **1.1.6) Ernährung:**

Der Wandel der Ernährungsgewohnheiten, den der zunehmende Wohlstand bei bestimmten Bevölkerungsgruppen bewirkt, steht möglicherweise mit der Prävalenzzunahme von Asthma und Atopie der letzten Jahrzehnte in Verbindung. Einige prospektive Studien fanden heraus, dass das Stillen von Babys einen zeitweiligen positiven Effekt auf die Inzidenz von atopischer Dermatitis, Nahrungsmittelallergien und frühzeitigem Erkrankungen in den ersten 3 Lebensjahren hat.(61,62) Dieses Ergebnis konnte jedoch nicht von anderen reproduziert werden.(63) Darüber hinaus konnte kein übereinstimmend protektiver Effekt in Bezug auf die spätere Entwicklung von juveniles Asthma gesehen werden. Es mag sein, dass sich die Zusammensetzung der Muttermilch bei den verschiedenen Studienpopulationen unterschied oder Fehlerquellen aufgrund anderer Besonderheiten des Stillens zu den widersprüchlichen Ergebnissen führten. Zahlreiche Studien haben jedoch gezeigt, dass sich bei gefährdeten Säuglingen mit einem atopisch belasteten Familienhintergrund die Gabe von hypoallergenen Hydrolysaten als vorteilhaft erwiesen hat.(64-67) Es war jedoch wieder nur ein vorübergehender Effekt, der für die ersten 18 Lebensmonate die Symptome der atopischen Dermatitis und die gastrointestinalen Beschwerden verminderte. Darüber hinaus konnte die Entwicklung von Asthma und Heuschnupfen im späteren Leben durch diese diätetischen Maßnahmen nicht verhindert werden.(68)

Es haben sich möglicherweise andere Faktoren der Ernährung im Laufe der Jahre verändert. Das Gleichgewicht von ungesättigten zu gesättigten Nahrungsfetten dürfte sich dahingehend geändert haben, dass nun weniger tierische Fette und vermehrt mehrfach ungesättigte Öle oder Trans-



Fettsäuren verbraucht werden.(69) Eine australische Studie(70) wies eine niedrigere Prävalenz von Asthma und BHR bei Kindern nach, die sich in hohem Maße von frischem, ölhaltigen Fisch ernährten. Die Ergebnisse einer Vorgängerstudie zeigten eine Beziehung zwischen einem hohen Fischkonsum und einer verbesserten FEV1 in den Vereinigten Staaten.(71) Kinder, die regelmäßig Fisch essen, nehmen dadurch ausreichende Mengen an Omega-3-Fettsäuren auf, die sie vor BHR schützen konnten. Es wurde auch gezeigt, dass niedrige Konzentrationen von Vitamin C, das als Antioxidanz und Coenzym der Kollagensynthese wirkt, mit einer Prävalenz und Inzidenzzunahme von Asthma und Giemen einhergeht und die Lungenfunktion verschlechtert.(72) Schließlich konnte der Schweregrad von Asthma, nicht aber dessen Beginn, mit einer erhöhten Salzaufnahme bei Männern in Verbindung gebracht werden.(73) Obwohl diese Zusammenhänge von Interesse sind, können sie dennoch nicht den beträchtlichen Anstieg der Prävalenz von Asthma in den vergangenen Jahrzehnten erklären.

### **1.1.7) Allergenexposition:**

Es gibt zunehmend Hinweise, die nahelegen, daß die Höhe der Allergenexposition einen Risikofaktor für die Entwicklung einer atopischen Sensibilisierung bei Kindern darstellt.(74-76) In der deutschen multizentrischen Allergiestudie(76) wurde eine große Kohorte von Neugeborenen bis zum 7. Lebensjahr begleitet. Die Konzentrationen von Hausstaubmilben und Katzenallergenen, die im häuslichen Teppichstaub gemessen wurden, korrelierten stark mit der Entwicklung von Allergien gegen dieses spezifische Allergen während der ersten drei Lebensjahre. Es wurde eine deutliche Dosis-Antwort-Beziehung gefunden und darüber hinaus erkannt, dass der Effekt stark durch die familiäre Disposition für atopische Erkrankungen beeinflusst wird.

Bei Gruppen von Kindern mit einer positiven atopischen Familiengeschichte führte eine Milbenantigenexposition unter 750 ng/g Staub zu einer 3%tigen Sensibilisierungsrate. Hingegen war bei der Gruppe der Kinder ohne eine positive Familienanamnese eine Konzentration bis zu 25.000 ng/mg Staub notwendig, um einen Sensibilisierungsrate von 3% zu erreichen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass kein allgemeingültiger Schwellenwert der Exposition vorhergesagt werden kann, wie einst vorgeschlagen wurde. In der Tat sind Kinder, die mit einem genetischen Risiko belastet sind, selbst gegenüber sehr niedrigen Konzentrationen empfindlich. Es mag sein, dass sich die Allergenkonzentration für die Ausbildung einer Allergie gegenüber diesem Allergen über das Säuglingsalter hinaus erstreckt, da ähnliche Befunde bei Schulkindern berichtet wurden.(75) Ob sich die Belastung mit Allergenen in ähnlicher Weise auf die Entstehung von Asthma auswirkt, wie es bei der Allergieentstehung der Fall ist, muß noch untersucht werden. In einer prospektiven longitudinalen Studie an Säuglingen von atopischen Eltern zeigten Sporik et al (77) eine starke Korrelation zwischen Giemen und der Sensibilisierung gegenüber Milben im

11. Lebensjahr auf. Eine Exposition gegenüber Hausstaubmilben während des Säuglingsalters war nur in geringem Maße mit einer Sensibilisierung im 11. Lebensjahr verbunden. ( $p=0,062$ ). Es war ein signifikant erhöhtes Risiko sichtbar, an Asthma zu erkranken, wenn der Patient während des Säuglingsalters über  $10 \mu\text{g/g}$  Staub dem Der p 1 Antigen (einem Hauptallergen von Milben) ausgesetzt war.

Sollte das Ausmaß der Exposition gegenüber Milben während des Säuglingsalters tatsächlich entscheidend für die Entstehung von Asthma sein, so müssten Kinder, die in großer Höhe in einer milbenfreien Umgebung aufgewachsen sind, eine signifikant niedrigere Prävalenz von Asthma und Giemen haben, als Kinder, die in feuchten „milbenreichen“ Gegenden aufwachsen. Die Ergebnisse zweier Studien, die in den Alpen und Neu Mexiko durchgeführt wurden, konnten jedoch keine Auswirkung einer milbenfreien Umgebung auf das Auftreten von Asthma nachweisen. (78,79) Darüber hinaus zeigten Untersuchungen, die in Wüstengebieten wie in Tucson, Arizona, oder im australischen Inland, wo nur vereinzelt Milben auftreten, durchgeführt wurden, dass die Prävalenz von Asthma dort nicht vermindert war. (80,81)

So ist im Gegensatz zum immunologischen Prozess, der an der Bildung spezifischer IgE Antikörper beteiligt ist, der Mechanismus, welcher eine Asthmaerkrankung hervorruft, nicht durch Veränderungen der Allergenkonzentration beeinflussbar. Das charakteristische Merkmal eines Asthmatikers liegt wohl eher in der Fähigkeit, eine besonders starke IgE Antwort auf andauernde aber nicht saisonal vorkommende Allergene zu bilden. Dabei ist die Stärke der Reaktion davon abhängig, in welchem Maße der Patient dem jeweiligen Allergen ausgesetzt ist.

### **1.1.8) Familiengröße:**

Es gibt zunehmend Hinweise dafür, dass die Zahl der Geschwister zur Ausprägung von Atopien in Familien beiträgt. Viele Autoren haben gezeigt, dass die Anzahl der Geschwister invers korreliert mit der Prävalenz selbst berichteter Inhalationsallergien (82), Heuschnupfen (83-86), atopischem Ekzem (87-89), Hauttestreaktivität (84, 90-93) und der Anwesenheit spezifischer IgE Antikörper im Serum bei Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen. Die meisten Untersuchungen, die umfangreich genug waren, um eine getrennte Analyse des Einflusses von jüngeren und älteren Geschwistern zu ermöglichen, fanden beim Vorhandensein älterer Geschwister eine stärkere Beziehung als bei jüngeren Geschwistern. Die Übereinstimmung und Stärke dieser Art der Vergesellschaftung über alle Gruppen und unterschiedliche Populationen hinweg ist erstaunlich und lässt einen Hauptfaktor vermuten, der diesen Reaktionen zugrunde liegt. Die Beziehung zwischen der Größe der Familie und Asthma oder Hyperreagibilität der Luftwege ist interessanter Weise weniger deutlich. Obwohl einige Forscher eine negative Verbindung zwischen der Anzahl der Geschwister und sämtlichen

Asthmadelinitionen gefunden haben(86, 96-98), konnten andere diese Ergebnisse nicht bestätigen.(85,98,99)

Es wurden einige Hypothesen angeführt, die den Einfluss der Geschwister erklären sollten. Unwahrscheinlich erscheint jedoch, dass das Alter der Mutter der zugrunde liegende kausale Faktor ist, da in diesen und anderen Berichten der „Geschwistereffekt“ nach Berücksichtigung des Alters der Mutter immer noch sichtbar war.

Darüber hinaus konnte das fortgeschrittene Alter der Mutter mit einer gesteigerten Prävalenz von Heuschnupfen und Hautreaktionen in Verbindung gebracht werden,(84) was zu der inversen Beziehung, die bei der Anzahl der Geschwister gefunden wurde, im Widerspruch steht. Strachan(83), der 1989 erstmals dieses Phänomen beschrieb, vermutete, daß frühkindliche Infektionen, übertragen durch unhygienischen Kontakt mit älteren Geschwistern oder pränatal von der Mutter erworben, die durch Kontakt zu ihren älteren Kindern infiziert wurde, die Entstehung von allergischen Erkrankungen verhindern können. Diese starke inverse Beziehung zwischen der Geschwisterzahl und der Ausprägung atopischer Erkrankungen in Familien kann jedoch auch anderen Mechanismen zugeschrieben werden. Es mag sein, daß die Anzahl der Geschwister nur ein Surrogationsmaß für mehrfache Schwangerschaften ist, bei denen sich die fetomaternalen Immunantwort nach jeder Schwangerschaft verändert. Wäre die letztgenannte Auffassung zutreffend, dann stünde nicht nur die Anzahl der älteren Geschwister, sondern auch die Anzahl der Schwangerschaften - einschließlich der Fehlgeburten - mit dem Auftreten von atopischen Erkrankungen bei den Nachkommen in Verbindung.

### **1.1.9) Infektionen:**

Es gibt derzeit eine immer noch andauernde Debatte über den Einfluss, den Virusinfektionen, vorwiegend respiratory syncytial virus (RSV), auf die spätere Ausbildung von Asthma und Atopie haben. Es gibt zwei Haupthypothesen, die die Verbindung zwischen Atemwegsentzündungen und darauffolgenden Abnormitäten der Atemwege zu erklären versuchen.(100)

Eine Hypothese besagt, daß Virusinfektionen, die zu Beginn des Lebens durchgemacht werden, die wachsende Lunge schädigen oder die Immunreaktion des Wirts verändern. Die zweite Hypothese behauptet, daß Infektionen der Atemwege bei Säuglingen und Kindern, bei denen eine Prädisposition besteht, schwerer verlaufen. In letzterem Fall ist eine symptomatische virale Infektion lediglich ein Anzeichen eines ansonsten „stummen“ Zustandes. Hingegen stellten virale Infektionen einen kausalen Risikofaktor dar, wenn die erste Hypothese zuträfe. Diese beiden Hypothesen schließen sich jedoch nicht notwendigerweise gegenseitig aus. Es ist nämlich denkbar, daß schwerwiegende Virusinfektionen des tiefen Atemtraktes vorwiegend bei Säuglingen und

Kindern auftreten, die eine angeborene Prädisposition besitzen, und daß sowohl die Infektion als auch die Prädisposition zu der Entwicklung von obstruktiven Atemwegserkrankungen beiträgt.

RSV Infektionen sind während des ersten Lebensjahres sehr häufig. Laut Long et al(101) sind bis zu ihrem ersten Geburtstag mindestens 80% der Säuglinge mit RSV infiziert, aber nur ca. 1% aller Säuglinge müssen wegen RSV ins Krankenhaus eingewiesen und lediglich 0,1% stationär behandelt werden.

Auf diese Weise erleidet ein großer Teil der Kinder eine inaparente RSV Infektion während des ersten Lebensjahres, was nahelegt, daß es mindestens einen Wirtsfaktor gibt, der die Entwicklung einer Bronchiolitis nach RSV Infekten zur Folge hat. Unterschiedliche Forscher haben über mehrere Jahre hinweg Kinder mit einer nachgewiesenen RSV Bronchiolitis beobachtet. Die meisten Autoren(101-103) berichten von Fällen, die im Vergleich zu Kontrollgruppen eine verminderte Lungenfunktion haben und an einer gesteigerten Übererregbarkeit der Atemwege leiden.

Diese Erkenntnisse sind jedoch auch mit der Idee einer zugrunde liegenden Missbildung der Atemwege vereinbar, und zwar in einem noch höheren Maße als ein nachfolgender Schaden durch die RSV Infektion.

Pullen und Hey(103) beobachteten 130 Säuglinge im Durchschnittsalter von 14 Wochen, die mit einer nachgewiesenen RSV Bronchiolitis im Krankenhaus aufgenommen wurden und verglichen sie mit passenden Kontrollgruppen. 6,2% der Gruppe mit RSV zeigte im Alter von 10 Jahren Giemen. Bei der Kontrollgruppe waren es nur 4,5%. Während der ersten 4 Lebensjahre wurde eine geringe Prävalenzerhöhung an mildem Giemen gefunden (38% vs 15%). Jedoch war, verglichen mit der Kontrollgruppe, keine atopische Sensibilisierung sichtbar. Andere Untersuchungen bestätigten diese Ergebnisse.(101,102) Ein Bericht der longitudinalen Tucson Geburts-Kohortenstudie bestätigt ebenfalls die zuvor genannten Ergebnisse anhand einer Stichprobe aus der „normalen“ Bevölkerung, die frei von dem eventuellen Selektionsbias war, welches bei der Folgeuntersuchung von ausgewählten Krankenhauspopulationen entsteht. In der Tucsoner Studie waren Infektionen der tieferen Atemwege mit RSV, mit einem über die Schuljahre abnehmenden Risiko an wiederkehrenden Giemen zu erkranken, assoziiert. Dieses Risiko war im Alter von 6 Jahren noch 4-fach erhöht, nahm dann aber bis zum 13.Lebensjahr ab, ab dem kein erhöhtes Risiko mehr bestand.(104) Das Auftreten von RSV im tiefen Atemtrakt war darüber hinaus nicht mit der Entwicklung einer atopischen Sensibilisierung verbunden. Ebenso mag es sein, dass viral assoziiertes Giemen in geringem Maße mit Atopie und BHR in Verbindung steht und eine bessere Prognose als atopisches Asthma besitzt.(105) In verschiedenen Studien wurde über eine entgegengesetzte Beziehung zwischen Asthma und der Gesamtbelastung respiratorischer Infektionen berichtet. In Papua, Neuguinea, beobachtete Anderson(106), dass Infektionen der Atemwege bei Kindern, die im Hochland lebten, häufiger auftrat. Auf den Fidschiinseln untersuchte Flynn(107,108) zwei verschiedene Kindergruppen. Die eine Gruppe bestand aus Ureinwohnern, die

oft wegen Pneumonien im Krankenhaus aufgenommen wurden. Die andere Gruppe setzte sich aus anderen Fidschianern zusammen, deren Aufnahmequote wegen Asthma dreimal so hoch war wie bei der ersten Gruppe.

In Übereinstimmung mit den Krankenhauseinweisungsraten zeigten die Kinder der Urfidschianer eine dreimal so hohe Prävalenz von Asthma und Übererregbarkeit der Atemwege als die anderen Fidschianer. Im Gegensatz dazu waren bei den anderen Fidschianern Infektionen der Atemwege mehr als zweimal häufiger als bei den urfidschianischen Kindern.

In osteuropäischen Ländern wurde eine höhere Prävalenz von Bronchitis und Atemwegsinfektionen festgestellt, wogegen die atopische Sensibilisierung, Heuschnupfen, Asthma und BHR signifikant niedriger waren als in Schweden und Westdeutschland.(14-16) Die Ergebnisse neuerer Studien bestätigen darüber hinaus den potentiell protektiven Effekt von frühkindlichen Infektionen auf die Entwicklung von Atopien und in geringerem Maße von Asthma während der späteren Kindheit. Shaheen et al(109) beobachteten in Guinea-Bissau (Westafrika) Kinder im Alter zwischen 0 und 6 Jahren bis ins junge Erwachsenenalter. Die Patienten, die in ihrer Kindheit Masern hatten, wiesen nur halb so oft eine atopische Sensibilisierung auf (definiert als eine positive Reaktion auf einen Skin Pricktest mit Aeroallergenen) als jene, die geimpft waren und deshalb keine Masern hatten (12,8% vs 25,6%). Eine Untersuchung aus Süditalien zeigt, daß Militärrekruten, die Hepatitis A seropositiv waren, eine signifikant niedrigere Prävalenz für atopische Sensibilisierung gegenüber gewöhnlichen Allergenen und atopischen Erkrankungen hatten - verglichen mit Gleichgestellten ohne Hepatitis A Antikörpern.(110) Hepatitis A wurde dabei als ein Indikator für Hygiene herangezogen. In einer ostdeutschen Studie war die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung von Allergien im Alter von 5 bis 14 Jahren signifikant vermindert, wenn das Kind einer Kleinfamilie in Alter zwischen 6 und 11 Monaten in eine Kinderkrippe gegeben wurde im Vergleich zu Kindern, die mit 12 bis 23 Monaten oder nach dem 2. Geburtstag die Kinderkrippe besuchten (15,7% vs 21,8% vs 27%).

In der prospektiven Tucson Kohortenstudie hatten Kinder, die während der ersten 3 Lebensjahre an einer nicht giemenden Infektion der unteren Atemwege erkrankten (wie z.B. Pneumonie oder Tracheobronchitis) im Alter von 6 Jahren eine verminderte Reaktion auf Hautteste und verminderte Gesamt-IgE-Level.(112) Ob parasitäre Infektionen, wie sie beispielsweise in den Entwicklungsländern auftreten, eventuell einen protektiven Effekt ausüben, wurde bis jetzt noch nicht ausreichend erforscht. Es mag sein, dass der Einfluss von Mikroben sowohl durch Parasiten als auch durch Pathogene, die durch den Darm aufgenommen werden, eine andere Art der Exposition darstellen, welche die normale Darmbesiedelung in der Kindheit verändern. Es mag auch sein, dass dadurch das Entstehen und die Aufrechterhaltung einer oralen Toleranz gegenüber harmlosen Antigenen weitgehend verhindert wird.(113,114) Obwohl diese Hypothesen höchst interessant sind, konnten sie bis jetzt noch nicht durch epidemiologische Beweise untermauert

werden, da der Versuch, die intestinale Flora zu messen, beträchtliche methodische Schwierigkeiten aufwirft. Als ein interessantes „menschliches Modell“ könnte sich in diesem Zusammenhang die von mehreren Autoren beschriebene Beobachtung erweisen, dass das Aufwachsen auf einem Bauernhof einen beträchtlichen Schutz gegen die Entwicklung atopischer Krankheiten darstellt.(115-117) In einer Bevölkerungsgruppe 6-15 jähriger Schweizer Schulkinder war die Wahrscheinlichkeit, saisonale Symptome des Heuschnupfens zu haben (adjustierte OR 0,34; 95% KI 0,12-0,89) und eine atopische Sensibilisierung zu entwickeln (was mit einem radioallergosorbent Test gemessen wurde) (adjustierte OR 0,31; 95% KI 0,12-0,89) bei Kindern, die auf einem Bauernhof aufwuchsen, stark vermindert im Vergleich zu ihren Mitschülern, die aus derselben ländlichen Gegend stammten, deren Eltern aber keine Bauern waren.(115) Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei einer Studie an bayerischen Schulkindern im Alter zwischen 5-7 Jahren. Es wurde offenbar, dass die Prävalenz von Heuschnupfen bei den Kindern, die auf dem Bauernhof aufwuchsen, niedriger war als bei ihren Altersgenossen aus dem gleichen Dorf, die nicht auf einem Bauernhof aufwuchsen (1,8% vs 4,9% KI 0,28-0,99). Eine österreichische Studie an 8-10 Jahre alten Kindern bestätigt die Ergebnisse.

Bei allen Untersuchungen wurde ausserdem ein geringer positiver Effekt auf die Prävalenz von Asthma gefunden (adjustierte OR 0,65; 95% KI 0,39-1,09 in Bayern), wohingegen die bäuerliche Tätigkeit der Eltern sich nicht auf die Entwicklung von atopischen Ekzemen auswirkte.

Die Lebensbedingungen von Bauernfamilien unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht vom Lebensstil anderer Familien: eine umfangreichere Familiengröße, mehr Haustiere, öfteres Heizen mit Kohle oder Holz, ein verringerter Zigarettenkonsum der Mütter, erhöhte Feuchtigkeit und andere Ernährungsgewohnheiten. Keiner dieser Faktoren konnte bis jetzt die deutliche inverse Beziehung zwischen einer Kindheit auf dem Bauernhof und der Atopie erklären. In einer österreichischen Studie konnte durch den Kontakt mit Geflügel und Stallvieh ein großer Teil der Beziehung zwischen Landwirtschaft und Atopie erklärt werden. Ebenso konnte in der bayerischen Untersuchung eine stark inverse dosisabhängige Beziehung zwischen der Exposition gegenüber Stallvieh und der Prävalenz atopischer Erkrankungen gefunden werden (adjustierte OR 0,41; 95% KI 0,23-0,74 für häufigen Stallviehkontakt).(117) Darüber hinaus wiesen österreichische Kinder, die regelmäßig Kontakt mit Tieren des Bauernhofes hatten, aber nicht auf dem Bauernhof aufwuchsen, eine signifikant niedrigere atopische Sensibilisierung auf (13,5% vs 34, 8%, P=0,1) als Kinder ohne solchen Kontakt. Diese Entdeckungen lassen vermuten, daß in den Ställen, und folglich auch in den Häusern der Bauernfamilien, Faktoren zu finden sind, denen der Schutz zuzuschreiben ist, der mit dem bäuerlichen Lebensstil einhergeht. Ein möglicher Faktor neben anderen ist die Exposition gegenüber Produkten von Bakterien wie dem Endotoxin und dem LPS in den Ställen, die durch Bindung an den CD14 Rezeptor zu einer gesteigerten IL-12 Produktion führen und dadurch den Th1-Pathway aktivieren.(122,123) Vor kurzer Zeit wurden im CD14 Gen

Polymorphismen gefunden,(124) die für die Reaktion eines Patienten auf Produkte von Bakterien, die aus der Umwelt auf ihn einwirken, von Interesse sein könnten. Eine gesteigerte oder veränderte mikrobielle Exposition mag aber auch durch den Konsum von unpasteurisierter Milch entstehen. Es ist notwendig, weitere Untersuchungen durchzuführen, die das Ausmass der mikrobiellen Belastung, die Immunantwort des Kindes und dessen genetischen Hintergrund in Bezug auf eine bäuerliche Umgebung berücksichtigen.

Diese Ergebnisse haben Forscher veranlasst darüber nachzudenken, ob der Einsatz von Antibiotika und Impfungen eventuell einen nachteiligen Effekt haben. Diese Diskussion wurde durch einen Artikel von Shirakawa et al(125) angeregt, der berichtet, dass asthmatische Symptome und verschiedene Atopiemerkmale bei BCG geimpften japanischen Schulkindern signifikant weniger auftraten, wenn sie einen positiven Tuberkulintest aufwiesen - im Vergleich zu tuberkulin negativen Respondern. Außerdem war es bei Tuberkulin positiven Kindern wesentlich häufiger, dass sich die atopischen Symptome im Alter von 7 bis 12 Jahren besserten. Die Untersuchungsergebnisse lösten eine heftige Diskussion darüber aus, wie sie zu deuten seien. Es mag sein, dass die inverse Beziehung zwischen dem allergischen Zustand und der Tuberkulinreaktivität einfach das Ungleichgewicht der TH-1/TH-2 Antwort widerspiegelt, die für atopische Patienten charakteristisch ist. Es wurde gezeigt, dass atopische Patienten im Gegensatz zu nicht Atopikern in geringerem Maße allergische Hautreaktionen vom verzögerten Typ aufweisen, wenn sie einem wiederkehrenden Allergen ausgesetzt sind.(126) Es mag sein, dass dieses Ungleichgewicht eher mit genetischen und konstitutionellen Faktoren in Verbindung steht als mit der Exposition von Mykobakterien. Die Ergebnisse einer schwedischen Forschergruppe stützten eine solche Interpretation, da sie zeigten, dass eine einmalige BCG-Impfung nach der Geburt die Prävalenz atopischer Krankheiten im Schulalter nicht beeinflusst.(127)

Die Rolle der Masernimpfung wurde ebenfalls in Frage gestellt. Es muss jedoch hinterfragt werden, ob die Verallgemeinerung der Ergebnisse von Guinea - Bissau, Westafrika auf westliche Bevölkerungen möglich ist. In der Tat konnten mehrere Studien keinen nachteiligen Effekt von Impfungen während des Kindesalters auf die Entwicklung allergischer Erkrankungen feststellen.(128,129) Ferner gibt es keine Beweise, die nahelegen, dass der Gebrauch von Antibiotika ursächlich mit dem Beginn von Kinderasthma und Allergien in Verbindung steht. Eine retrospektive Studie von Farooqi und Hopkin(130), die eine Verbindung zwischen Antibiotikagebrauch und Asthma zeigt, muss mit großer Vorsicht interpretiert werden, da eine einseitige Ausrichtung durch umgekehrte Schlussfolgerung (ie Kinder mit bereits bestehenden Asthmasymptomen könnten auf Grund ihrer Krankheit mehr Antibiotika bekommen) nicht ausgeschlossen werden kann. Diese Studie wies ausserdem auf das mögliche Risiko der Keuchhustenimpfung hin, das auch in einer anderen neuseeländischen Studie beschrieben wurde.(131) In der jüngst erschienenen Studie wurden bei 23 Kindern, die keine Diphtherie -

Pertussis - Tetanus und Polio Impfung erhielten, keine Asthmaanfälle, Arztbesuche aufgrund von Asthma oder anderer allergischer Krankheiten bis zum 10. Lebensjahr berichtet. Die Fallzahl ist jedoch sehr klein, und andere Studien konnten keine signifikante Verbindung zum Impfstatus zeigen.(128,129)

## **1.2) TH-1-TH-2 Muster bei allergischen Erkrankungen**

Obwohl sich allergische Erkrankungen an verschiedenen Organen manifestieren können, wie z.B. den Schleimhäuten des oberen und unteren Respirationstraktes sowie des Gastrointestinaltraktes, den Bindehauten des Auges und an der Haut, ist in den letzten Jahren deutlich geworden, dass diesen unterschiedlichen Organmanifestationen ein relativ einheitliches, immunologisches fehlgeleitetes Entzündungsgeschehen zugrunde liegt. Aus zellbiologischer Sicht handelt es sich somit bei Allergien und Asthma um eine systemische Erkrankung, deren Ursache auch im Immunsystem zu suchen ist.

Die gemeinsame Grundlage der verschiedenen phänotypischen Ausprägungen von Allergie und Asthma ist die Entwicklung einer besondersartigen Entzündungsreaktion. Am Ort der entzündlichen Reaktion befinden sich eine Vielzahl von überwiegend hochgradig aktivierten Zellen. Insbesondere aus regulatorischer Sicht stehen hierbei T-Lymphozyten im Mittelpunkt, die als Dirigenten der allergischen Immunantwort angesehen werden können. Neben den T-Zellen, die als einzige in der Lage sind, Allergene und Antigene spezifisch zu erkennen, finden sich einerseits aktivierte Monozyten und Makrophagen sowie andere antigenpräsentierende Zellpopulationen und andererseits, auf der Seite der Effektoren, die eosinophilen Granulozyten und Mastzellen. Zwischen diesen Zellpopulationen entspannt sich ein wohl reguliertes und definiertes Kommunikationsnetzwerk.

### **1.2.1) Bedeutung der T-Helferzellpopulation**

1989 ergaben umfangreiche Studien bei Mäusen, daß T-Helfer-Lymphozyten entsprechend den sezernierten Zytokinen in zwei Typen kategorisiert werden können, die später auch im Menschen auf Grund ihres Zytokinmusters unterschieden werden konnten. Zu den ursprünglich beschriebenen zwei T-Helferzellpopulationen (TH-1 und TH-2) ist kürzlich ein weiterer T-Zelleffektortyp charakterisiert und identifiziert worden, der als T-Helfer (TH)-3 bezeichnet wird.

Diese T-Zelleffektorpopulationen definieren sich durch ihr Zytokinprofil, welches sie nach Aktivierung sezernieren. Hierbei sind bestimmte „Leitzytokine“ von besonderer Bedeutung, über



die sich der T-Zelleffektor-Phänotyp identifizieren lässt. TH-1-Zellen sind charakterisiert durch die Produktion von IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\alpha$ , während TH-2-Zellen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-3 und IL-9 sezernieren. Hingegen produzieren TH-3-Zellen vor allem TGF- $\beta$ , in geringem Maße auch IL-4 und IL-10. Die Leitzytokine sind hierbei für TH-1-Zellen IFN- $\gamma$ , für TH-2-Zellen IL-4 und für TH-3-Zellen TGF- $\beta$ .(134)

Diese Zellpopulationen spielen in physiologischen regulatorischen Abläufen des Immunsystems eine wichtige Rolle.

Im Rahmen der Infektabwehr sind es vor allem TH-1-Zellen, die ihren entscheidenden Beitrag leisten und bei allen Erregertypen bis auf die Helminthen eine dominierende Rolle spielen. Je nach Erregertypus kommt es hierbei entweder zur Induktion von CD-4 oder CD-8-positiven Zellen vom TH-1-Typ.

TH-2-Zellen kommen zwei zentrale Funktionen in der natürlichen Regulation der immunologischen Abläufe zu: Zum einen spielen sie eine wichtige Rolle in der Abwehr von Helminthen und Metazoen. Zum anderen sind sie offensichtlich für die erfolgreiche Aufrechterhaltung der Schwangerschaft von essentieller Bedeutung. Offensichtlich reicht eine TH-1-Strategie nicht aus, um mit diesen großen Krankheitserregern effektiv fertig zu werden. Daher ist im Laufe der Evolution eine alternative Strategie entwickelt worden, bei der eosinophile Granulozyten und IgE-vermittelte zytotoxische Reaktionen einen besonderen Stellenwert haben. Sowohl die IgE-Produktion als auch die Regulation der eosinophilen Aktivität stehen unter direkter Kontrolle von TH-2-Zellen.

TH-3-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Induktion und Aufrechterhaltung von Toleranzwobei vor allem orale Toleranzmechanismen über diese T-Zelleffektorpopulation gesteuert werden. Ebenso ist dieser Typ an der Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft beteiligt und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der (sekretorischen) IgA-Produktion.(135)

Die Ausbildung von Effektorantworten vom TH-1- bzw. TH-2-Typ findet ihren Ausdruck in der Entwicklung verschiedener Überempfindlichkeitsreaktionen. Ein Prototyp für eine erfolgreiche (TH-1)-Antwort ist die Ausbildung der Allergie vom verzögerten Typ (Typ IV Allergie). Ein klassisches Beispiel hierfür ist die Tuberkulinantwort, die nach erfolgreicher Abwehr von mykobakteriellen Antigenen in der Ausbildung einer spezifischen Immunantwort vom TH-1-Typ gegen diese Antigene besteht. Bei wiederholter Exposition mit dem selben Antigen (z.B. im Tuberkulintest) entwickelt sich am Ort der Antigenapplikation nach 48 bis 72 Stunden eine Rötung und Schwellung, die Ausdruck einer T-Zellinfiltration von überwiegend TH-1 Zellen darstellt, welche IFN- $\gamma$  produzieren.

Ausdruck einer bestehenden TH-2 Immunität ist die Ausbildung einer allergischen Sofortreaktion (Typ I Allergie), die IgE-abhängig ist. Der quantitative Nachweis von IgE-Antikörpern bzw. der

funktionelle Nachweis von IgE-Antikörpern im Hauttest ist somit immer ein indirekter Beleg für eine vorhandene (allergenspezifische) TH-2-Immunantwort.

Nachdem die unterschiedlichen T-Zelleffektorpopulationen aufgrund ihres Zytokinprofils und damit ihrer funktionellen Bedeutung entschlüsselt werden konnten, war die Frage nahe liegend, inwieweit diese T-Zelleffektorantwort auch bei verschiedenen Erkrankungen eine funktionelle Bedeutung haben könnte. Mittlerweile sind eine Vielzahl von T-Zell-abhängigen immunvermittelten Erkrankungen mit T-Zellpolarisierungen entweder in Richtung TH-1 oder TH-2 charakterisiert worden. Eine Übersicht hierzu findet sich in Tabelle 1.

	TH-1	TH-2	TH-3
T-Zellen	CD4, CD8, $\gamma/\delta$	CD4, CD8, $\gamma/\delta$	CD4
Zytokine	IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\beta$	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-9	TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10
Polarisierungssignale	IL-12, IFN- $\alpha$	IL-4	IL-4
Inhibiert durch	IL-4, IL-10	IFN- $\gamma$	IL-12, IFN- $\gamma$
Physiologische Rolle	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Abwehr von vielen Bakterien, Pilzen, Viren, Protozoen</li> <li>- Tumor-Abwehr</li> <li>- IgM, IgG</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Abwehr von Helminthen/Metazoen</li> <li>- Erfolgreiche Schwangerschaft</li> <li>- IgE, IgA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- (orale) Toleranz</li> <li>- Erfolgreiche Schwangerschaft</li> <li>- IgA</li> </ul>
Pathologische Rolle	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Organspezifität, Autoimmunerkrankungen</li> <li>- Kontaktekzem</li> <li>- Psoriasis</li> <li>- M. Crohn</li> <li>- Abstoßung von Alлотransplantaten</li> <li>- <i>Helicobacter pylori</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Atopische Erkrankungen</li> <li>- Systemische Sklerose</li> <li>- Progression von AIDS in HIV-Infizierten</li> <li>- chronische GvHD</li> <li>- Omenn's Syndrome</li> </ul>	?
Effektor-Zellen	Neutrophile Granulozyten	Eosinophile und basophile Granulozyten, Mastzellen	?
Allergie-Typ	Delayed-Type-Hypersensitivity (Typ IV-Allergie)	IgE-vermittelte Soforttypreaktion (Typ-I-Allergie)	?

Tabelle 1. Das TH-1/ TH-2/ TH-3-Konzept

Prototypen für TH-1-vermittelte Erkrankungen sind insbesondere die organspezifischen Autoimmunerkrankungen, das Kontaktekzem, die Psoriasis und der Morbus Crohn. Hingegen sind allergische und atopische Manifestationen klassische TH-2-Erkrankungen.(136)

### **1.2.2) Die allergische Entzündungsreaktion**

Das Zytokin IL-4 ist nicht nur zentrales „Leitzytokin“ für TH-2-Immunität, sondern spielt in der Tat auch eine wichtige Rolle in einer Reihe von regulatorischen Schnittstellen im Rahmen der allergischen Entzündungsreaktionen. Viele der immunologischen Fehlregulationen, die im Rahmen

der allergischen Entzündung beobachtet werden können, lassen sich zumindest zum Teil durch eine überschießende Produktion von IL-4 erklären.(137)

Unter dem Einfluss von IL-4 werden vermehrt HLA-DR Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert, wodurch die Antigen- und Allergenpräsentation gefördert wird. IL-4 reguliert den niedrigaffinen IgE-Rezeptor (CD23) in seiner Dichte auf aktivierten B-Lymphozyten herauf. B-Lymphozyten können über ihre Oberflächenimmunglobuline Antigene und Allergene abfangen, internalisieren, verarbeiten und auf HLA-DR-Molekülen T-Zellen präsentieren. B-Zellen sind schon seit längerer Zeit bekannt als ein Typ von antigenpräsentierenden Zellen, der die Ausbildung einer TH-2-Immunantwort fördert. Eine Bindung von IgE an den niedrigaffinen IgE-Rezeptor und eine Bindung von Allergen an die IgE-Moleküle kann somit eine verstärkte Allergenpräsentation bündeln, was wiederum die TH-2 Immunität erweitert. IL-4 ist der wichtigste Vermehrungsfaktor für bereits existierende TH-2-Zellen. Ferner inhibiert IL-4 die TH-1-Immunität. Ein weiterer zentraler Effekt im Rahmen der allergischen Entzündungsreaktion ist die Einflussnahme dieses Zytokins auf die IgE-Produktion. Neben anderen Faktoren ist IL-4 somit verantwortlich für die überschießende IgE-Produktion bei allergischen Erkrankungen. Auch auf Effektorzellen der allergischen Reaktion wirkt dieses Zytokin. So steht z.B. die Mastzellaktivität unter der direkten Kontrolle von IL-4. IL-4 spielt darüber hinaus eine entscheidende Rolle bei der Stimulation der IgE und IgG4 Synthese. Es bewirkt dabei in unreifen B-Zellen einen Isotyp-Wechsel von IgM- zur Immunglobulinklasse IgE bzw. IgG4.

Ein weiteres wichtiges Zytokin, welches in der IgE-Regulation von Bedeutung ist, ist IL-13. Auch IL-13 wird von TH-2-Zellen produziert (138). Jedoch haben im Unterschied zu B-Zellen T-Zellen keinen IL-13-Rezeptor, so dass das von T-Zellen produzierte IL-13 im wesentlichen auf B-Zellen wirkt. Hier allerdings fördert IL-13 mindestens im gleichen Ausmaß wie IL-4 die IgE-Produktion.

Eosinophile Granulozyten, die zu den wichtigsten Effektoren der allergischen Immunantwort zählen, stehen ebenfalls unter dem direkten Einfluss von TH-2-Zytokinen. Hier spielt insbesondere IL-5 eine wichtige Rolle (139). Unter dem Einfluss von IL-5 reifen eosinophile Granulozyten verstärkt im Knochenmark heran, Adhäsionsmoleküle werden (unter gemeinsamem Einfluss von TNF- $\alpha$ ) auf Endothelzellen exprimiert, wodurch die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten an den Ort der Entzündung stattfindet. Ausserdem verlängert IL-5 die Überlebensdauer dieser Zellen am Ort der Entzündungsreaktion, vor allem durch Hemmung der Apoptose. An der Unterdrückung der Apoptose sind neben IL-5 auch GM-CSF und möglicherweise weitere Zytokine beteiligt. Eosinophile Granulozyten und Mastzellen sind wiederum ihrerseits selbst Produzenten wichtiger TH-2-Zytokine. So konnte z.B. belegt werden, dass nicht nur IL-4 und IL-5 in aktivierten Mastzellen produziert und sezerniert werden, sondern auch IL-9 verstärkt produziert wird. IL-9 ist eines der neueren Zytokine, welches TH-2-Zellen zugeschrieben wird und das eine wichtige fördernde Rolle für diverse T-Zell- und Mastzellaktivitäten ausübt.

### 1.2.3) Allergie und Schwangerschaft

Aus immunologischer Sicht ist die Schwangerschaft eine inkompatible Organtransplantation, bei der das fetale Gewebe Histokompatibilitätsantigene sowohl von Vater als auch Mutter exprimiert. Der erfolgreiche Verlauf der Schwangerschaft hängt damit maßgeblich davon ab, eine Abstoßungsreaktion gegen die väterlichen Histokompatibilitätsantigene zu verhindern. Dies ist insgesamt ein komplexes Unterfangen, welches nach wie vor nicht vollständig geklärt ist. Jedoch konnte die Entwicklung des TH-1/TH-2 Konzepts einen weiteren wichtigen Aspekt zum Verständnis der Verhinderung einer solchen Abstoßungsreaktion beitragen (Abb.1).

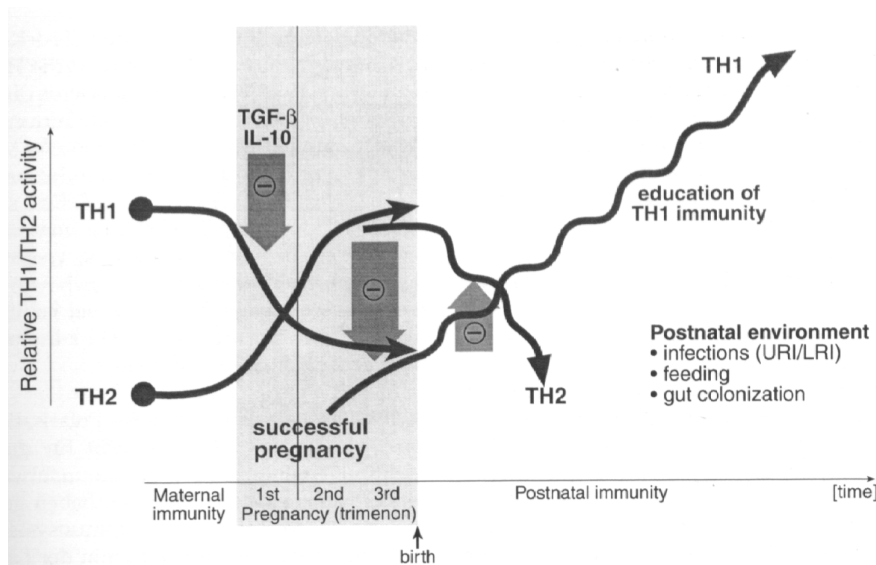


Abb.1. Physiologische Heranreifung der TH-1/ TH-2-Immunität während (grauer Bereich) und nach (rechte Diagrammhälfte) der Schwangerschaft.

Die fetoplazentare Einheit ist ein immunologisch hochaktives Gewebe. An dieser Aktivität sind sowohl die mütterliche als auch die fetale Seite beteiligt.

Auf der mütterlichen Seite ist dieses vor allem das Decidua-Gewebe (140). Ein wichtiger Zelltyp, der eine gewisse Uterospezifität aufweist, sind die so genannten „large granulated lymphocytes“ (LGL-Zellen). Ausserdem sind in diesem Gewebe relativ häufig aktivierte Makrophagen anzutreffen, die sich durch eine hohe PGE2-Produktion auszeichnen. Ferner finden sich aktivierte CD8-T-Zellen und T-Zellen vom T-Zellrezeptor  $\gamma/\lambda$  Phänotyp. Diesen Zellen gemein ist ein besonderes Zytokinspektrum, welches definiert wird durch TGF- $\beta$  2, IL-4 und IL-10.

Damit zeigt sich auf der mütterlichen Seite eine klare TH-2/ TH-3-Polarisation.

Auf der fetalen Seite sind es insbesondere die Trophoblasten, die die äußere Zellbarriere zwischen mütterlichem und kindlichem Gewebe darstellen (141). Trophoblasten produzieren hohe Konzentrationen von IL-10 und Progesteron. Dem Progesteron wiederum fällt offensichtlich die Funktion zu, die T-zellvermittelte Immunantwort in Richtung TH-2 zu polarisieren.

Da eine zytolytische und zytotoxische Reaktion, wie sie bei Aborten gefunden wird, über TH-1-Zellen wesentlich vermittelt wird, erscheint es wichtig und essentiell, diese TH-1-Kapazität während der Schwangerschaft und zumindest dort wiederum lokalisiert im Uterus zu unterdrücken. Ein wichtiger Mechanismus, durch den eine solche Suppression der TH-1-Kompetenz durchgeführt werden kann, ist die Heraufregulierung der TH-2-Immunantwort, die insbesondere durch IL-4 die Entwicklung von TH-1-Immunität verhindert. Ein weiterer Mechanismus wird auch den TGF-beta2-produzierenden TH-3-Zellen zugewiesen. Diese Zellen spielen offensichtlich an der Entwicklung immunologischer Toleranzmechanismen eine wesentliche Rolle. Dieses Konzept scheint auch von klinischer Relevanz zu sein, da z.B. bei habituellen Aborten eine hochregulierte TH-1-Immunantwort gefunden werden konnte.

Untersuchungen haben gezeigt, dass das T-Zell und B-Zell-Immunsystem bereits zum Zeitpunkt der Geburt in der Lage ist, eine spezifische Antwort zu entwickeln bzw. dass sich bereits zu diesem Zeitpunkt spezifische Immunitäten nachweisen lassen. Es konnten antigenspezifische T-Zellen im Nabelschnurblut nachgewiesen werden, von denen ferner nachgewiesen wurde, dass diese T-Zellen fetalen und nicht maternalen Ursprungs sind (142). Das T- und B-Zellimmunsystem ist etwa um die 15. Schwangerschaftswoche herum so weit entwickelt, dass es eine spezifische Immunantwort ausbilden kann. Somit sind potentiell alle Antigene, die ab diesem Zeitpunkt die plazentare Grenzschicht überwinden können, in der Lage, das Immunsystem des Feten entsprechend zu primen. Es stellt sich die Frage nach dem zytokinetischen Phänotyp dieser Zellen. Offensichtlich entwickeln sich unter dem Einfluss der TH-2/ TH-3-Polarisation an der fetomaternalen Grenzschicht besonders TH-2-Zellen im Uterus. Es lassen sich geringe Konzentrationen von IgE-Antikörpern im fetalen Gewebe im zweiten und dritten Schwangerschaftsdrittel nachweisen, neonatale T-Zellen zeichnen sich durch eine vorübergehend erhöhte IL-4-Produktion aus (142). Sekretorische Antikörper der IgA-Klasse mit einer Antigenpezifität insbesondere für Nahrungsmittelantigene sind konstant bei Neugeborenen nachweisbar. Bei Allergikern und Atopikern sind diese sogar erhöht (143).

Es scheint sinnvoll, dass sich gerade gegenüber Nahrungsmittelantigenen bereits im Uterus eine spezifische Immunantwort entwickelt. Diesen Antigenen ist das Immunsystem des Neugeborenen schon kurz nach der Geburt in relativ hohen Konzentrationen ausgesetzt. Da es sich hierbei aber um harmlose Antigene handelt, die sogar lebensnotwendigen Charakter haben, ist es von entscheidender Bedeutung, dass die sich nach Antigenkontakt entwickelnde Immunantwort vom Typ der immunologischen Toleranz ist. Toleranz ist ein aktiver immunologischer Prozess, der in

jedem Falle Antigenkontakt und Antigenerkennung voraussetzt. Eine Toleranz gegenüber den harmlosen Nahrungsmittelantigenen muss schon beim Erstkontakt nach der Geburt ausgebildet sein. Hierzu tragen die sich bereits im Uterus entwickelnden antigenspezifischen T-Zellen vom TH-2-Phänotyp offenbar entscheidend bei.

Eine wichtige Konsequenz dieses Konzepts ist in einer relativen Abschwächung der TH-1-Immunität zu sehen. IFN- $\gamma$  als Leitzytokin einer TH-1-Immunantwort wird nur in sehr geringem Ausmaß und von einer sehr kleinen Zellpopulation beim Neugeborenen gebildet, d.h. in physiologischer Weise kommt ein Neugeborenes mit einer zumindest vorübergehenden TH-1-Schwäche zur Welt. Beim Allergiker scheinen nun zwei Prozesse parallel oder sogar in wechselseitiger Verstärkung abzulaufen (Abbildung 2). Zum einen ist die T-Helfer-1 Schwäche bei Atopikerkindern offensichtlich noch stärker ausgeprägt als bei gesunden, und zum anderen ist die TH-2-Immunität nicht nur von vorübergehendem Charakter wie bei gesunden Neugeborenen, sondern bleibt bestehen und verstärkt sich sogar in den folgenden Lebensabschnitten (144,145).

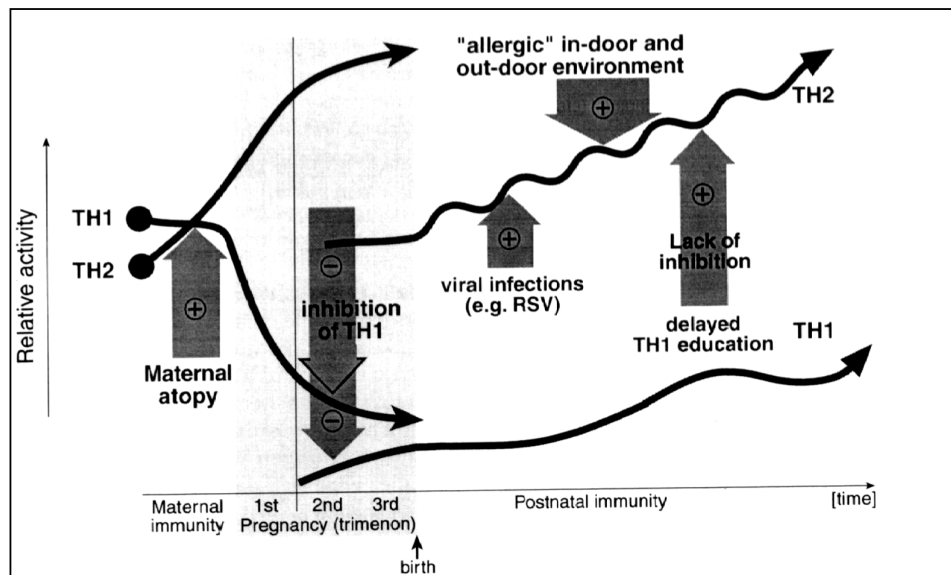


Abb. 2. Konzept einer gestörten TH-1/TH-2-Ausreifung beim allergischen Kind während (grauer Bereich) und nach (rechte Diagrammhälfte) der Schwangerschaft.

#### 1.2.4) Angeborene/ erworbene Immunität

Jeder lebende Organismus ist ständigen Angriffen bzw. schädlichen Einflüssen aus seiner Umgebung ausgesetzt. Um zu überleben muss daher jeder Organismus Abwehrmechanismen entwickeln, die ihm eine Resistenz oder eine Immunität gegenüber solchen Angriffen verleihen.

Diese Abwehrmechanismen reichen von physikalischen Barrieren, wie etwa der Zellwand, bis zu hochentwickelten Systemen, wie z.B. der erworbene Immunantwort. Der Begriff Immunität verweist auf alle Mechanismen, die vom Körper verwendet werden, um ihn vor Umgebungseinflüssen zu schützen, die dem Körper fremd sind. Diese Einflüsse können Mikroorganismen oder ihre Produkte sein, Nahrungsmittel, Chemikalien, Pharmazeutika, Pollen und Tierhaare oder Tierschuppen. Die Immunität wird in die zwei Hauptkategorien, nämlich angeborene Immunität und erworbene Immunität, eingeteilt.

Die angeborene (nicht adaptive) Immunität beinhaltet all die Abwehrmechanismen, mit denen ein Individuum geboren wird und die stets verfügbar und gegenwärtig sind, und zwar in sehr kurzer Zeit, um das Individuum vor der Bedrohung durch Fremdmaterial zu schützen. Die Elemente der angeborenen Immunität schließen sowohl die Körperoberfläche, als auch die inneren Komponenten des Körpers ein. So stellen z.B. die Haut, die mukösen Membranen und der Hustenreflex eine effektive Barriere gegen Umgebungselemente dar. Gemeinsam mit diesen physikalischen Barrieren sind chemische Einflüsse wie z.B. der pH-Wert, sezernierte Fettsäuren und das Enzym Lysozym wirksame Schutzmechanismen gegen die Invasion vieler Mikroorganismen. Weitere wichtige Wesenszüge einer angeborenen Immunität sind zahlreiche innere Elemente wie z.B. Fieber, Interferon, Komplement, sowie andere durch Leukozyten freigesetzte Substanzen und verschiedene Serumproteine wie z.B.  $\beta$ -Lysin, Lysozym, die Polyamine und die Kinine. Elemente der angeborenen Immunität sind auch Zellen wie Granulozyten, Makrophagen, Mikrogliazellen des zentralen Nervensystems und die Zytotrophoblasten der plazentaren Villi. Alle diese Zellen sind an der Eliminierung und Zerstörung von Fremdmaterial beteiligt, das die physikalischen und chemischen Barrieren des angeborenen Immunsystems erfolgreich durchdrungen hat. Diese Abwehrmechanismen sind relativ unspezifisch, aber bereits vor der Exposition mit infektiösen Mikroorganismen oder anderen fremden Makromolekülen vorhanden. Sie werden durch die Exposition auch nicht vermehrt und können fremde Substanzen im eigentlichen Sinn nicht unterscheiden. An angeborenen spezifischen immunologischen Schutzmechanismen sind vor allem die diaplazentar an das Kind übertragenen mütterlichen Antikörper zu erwähnen, die ihm einen transienten Schutz geben und Ausdruck der erworbenen Immunität der Mutter sind.

Die erworbene Immunität ist spezialisierter als die angeborene Immunität und wirkt synergistisch, indem sie den Schutz, der von der angeborenen Immunität gestellt wird, ergänzt. Evolutionstechnisch gesehen ist die erworbene Immunität noch relativ jung und existiert lediglich bei Wirbeltieren. Die Entdeckung der erworbenen Immunität wird dem englischen Chirurgen Edward Jenner zugeschrieben, der im späten 18. Jahrhundert experimentell einen jungen Mann gegen Pocken immunisierte. Das Konzept der Impfung oder Immunisierung wurde von Louis Pasteur und Karl Ehrlich, fast hundert Jahre nach Jenners Experiment, erweitert. Obwohl ein Individuum mit der Fähigkeit geboren wird, den Schutz, der durch die erworbene Immunität

verfügbar ist, zu aktivieren, ist diese Form der Immunität gegenüber einem Agens doch erst dann verfügbar, wenn das Individuum mit diesem Agens Kontakt gehabt hat. Wie der Name schon sagt, muss diese Form der Immunität erworben werden. Der Erstkontakt mit dem Agens (Immunisierung) löst eine Reihe von Vorgängen aus, die zur Aktivierung sowohl der durch T-Lymphozyten vermittelten zellulären als auch der durch B-Lymphozyten vermittelten humoralen Reaktionen mit einer Spezifität gegenüber dem fremden Agens führt. Durch diesen Prozess erwirbt das Individuum die Immunität und ist in der Lage, bei wiederkehrendem Kontakt die Abwehrmechanismen immer effizienter zu stimulieren. Diesen Vorgang nennt man das „immunologische Gedächtnis“, was auch die Grundlage für die Schutzimpfungen gegen infektiöse Krankheiten darstellt. Im Unterschied zur angeborenen Immunität bietet die erworbene Immunität einen spezifischen Schutz, aber nur gegen das Agens, das die Immunisierung ausgelöst hat.(181, 182)

Die Haut und Schleimhäute sind wesentliche Bestandteile der natürlichen Immunität, da sie als physikalische Barrieren gegenüber der Außenwelt fungieren. Die spezifische Immunantwort auf diesen Oberflächen als der erste Kontaktstation für fremde Substanzen erhöht zugleich deren natürliche Immunität. Nach wiederholtem Kontakt mit einem Allergen sind gerade diese Oberflächen wie z.B. Haut, Konjunktiven, Nasen-, Rachen- oder Bronchialschleimhaut die allergisierten Organsysteme und reagieren mit einer allergischen Entzündungsreaktion. Bei einer Allergie handelt es sich um eine erworbene spezifische Änderung der Reaktionsfähigkeit des Immunsystems gegenüber körperfremden, eigentlich unschädlichen Substanzen, die trotzdem als Allergen erkannt werden, und dadurch zu einer überschießenden Immunantwort (meist IgE vermittelte Reaktion Typ I nach Coombs und Gell) führen. Welche Ursachen nun zu einer allergischen Reaktion führen ist noch nicht definitiv geklärt. Wie aber bereits erwähnt mag es sein, dass der Verlust von protektiv wirkenden Faktoren aus der Umwelt diese „Entgleisung“ und Fehlreaktion des Immunsystems begünstigt.



## 2.) Zytokine

Bei Zytokinen handelt es sich um einen Überbegriff, unter dem Interleukine, Interferone koloniestimulierende Faktoren und Wachstumsfaktoren zusammengefasst werden. Zytokine sind für gewöhnlich extrazelluläre Proteine, die meist weniger als 80 kD messen, und viele von ihnen sind glykolysiert. Sie werden von einer Vielzahl verschiedener Zelltypen produziert, die bei der Zell-Zell Interaktion beteiligt sind, und wirken über spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen. Im allgemeinen wirken Zytokine auf nah benachbarte Zellen und haben somit eine vorherrschend parakrine Wirkung. Jedoch können sie ebenso auf entfernte Zellen (endokrin) und sogar in autokriner Weise auf ihre Ausgangszelle wirken. Zytokine können als ein Funktionssystem zur Zell-Zell Kommunikation angesehen werden, wobei dabei besonders die Wachstumsfaktoren und die Chemokine zu nennen sind. Die Wirkung der Zytokine auf ihre Zielzellen beeinflusst eine Vielzahl an Zellfunktionen und beinhaltet unter anderem Zellaktivierung, Proliferation, Chemotaxis, Immunsteuerung, Freisetzung anderer Zytokine oder Mediatoren, Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose. Innerhalb der Familie der Zytokine ist es scheinbar so, dass eine Pleiotropie und Fülle der Zytokinwirkungen vorliegt, wobei jedes Zytokin viele sich überschneidende Funktionen besitzt und jede dieser Funktionen eventuell von mehr als nur einem Zytokin vermittelt wird.

Die Wirkung eines einzelnen Zytokins im Hinblick auf eine Erkrankung ist schwierig vorherzusagen, da sie von anderen Zytokinen beeinflusst werden kann, die gleichzeitig von der gleichen Zelle freigesetzt oder von den Zielzellen durch deren Aktivierung produziert werden. Die Wirkungen von Zytokinen werden durch Bindung an hochaffine Rezeptoren auf der Zielzelloberfläche vermittelt, die gewöhnlicherweise in geringer Zahl auf den Zellen vorkommen. Die Anzahl dieser Rezeptoren kann jedoch durch die Aktivierung der Zelle erhöht werden, wobei die Zytokinwirkung auch von der Modulation der exprimierten Rezeptoren abhängt. Zytokine können ihrerseits die Expression von Rezeptoren induzieren, was sowohl die Antwort der Ursprungs als auch der Zielzelle beeinflussen kann. Einige Zytokine können ihre Produktion autokrin anregen, hingegen können andere die Synthese verschiedener Zytokine stimulieren, welche dann über einen Rückkoppelungsmechanismus die Produktion des ersten Zytokins bewirken und dadurch dessen Wirkungen verstärken.

Zytokine spielen eine wesentliche Rolle in der Regelung und Aufrechterhaltung entzündlicher Prozesse bei chronisch entzündlichen Reaktionen der Atemwege, wie zum Beispiel beim Asthma Bronchiale, da sie in der Lage sind, viele der für diese Erkrankung charakteristischen proinflammatorischen Effekte zu induzieren. Aufgrund ihrer Pleiotropie und der sich überlappenden Eigenschaften fällt es schwer, die zahlreichen Zytokine einzuteilen, die an

asthmatischen und atopischen Erkrankungen beteiligt sind. Unter Berücksichtigung der spezifischen Fehlregulationen und dem jetzigen Verständnis der Pathogenese des Asthma Bronchiale kann man sie zu folgenden Gruppen zusammenfassen:(146)

- 1.) Lymphokine: IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17
- 2.) Pro-inflammatorische Zytokine: IL-1, TNF, IL-6, IL-11, GM-CSF, SCF
- 3.) Anti-inflammatorische Zytokine: IL-10, IL-1ra, IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-18
- 4.) Chemotaktische Zytokine (Chemokine): RANTES, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5, MIP-1 $\alpha$ , Eotaxin, IL-8
- 5.) Wachstumsfaktoren: PDGF, TGF- $\beta$ , FGF, EGF, IGF.

Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation und Differenzierung der Th0-Helferzellen in ihre verschiedenen Subtypen. Sie beeinflussen das Verhältnis der Th1- zu Th2-Lymphozyten. Die differenzierten T-Helferzellen lassen sich ihrerseits durch das von ihnen sezernierte Zytokinmuster charakterisieren. Zu den von den Th1-Zellen sezernierten Typ-1 Zytokinen zählen IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12 und TNF- $\beta$ , die unter anderem die Bildung von Th2-Zellen und die IgE-Produktion hemmen. Th-2 Zellen produzieren die sogenannten Th2-Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. Ein Th2 Zytokinprofil fördert die Bildung von spezifischen IgE-Antikörpern. Somit kommt den Faktoren, die die Ausdifferenzierung von Th1- bzw Th2-Helferzellen regulieren, eine wesentliche Bedeutung bei der Entstehung atopischer Erkrankungen zu.(147)

Nach der Zellstimulation mit LPS haben wir das Ausmaß der Zytokinproduktion durch ELISA bestimmt, und zwar von den Th1-Zytokinen haben wir IFN- $\gamma$  und IL-12; von den Th2-Zytokinen IL-5 und IL-10 gemessen. Außerdem wurde das proinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  gemessen. Im folgenden werden die gemessenen Zytokine kurz erläutert.

## **2.1) Interleukin 5**

IL-5 stellt ein wichtiges Zytokin und Marker für Entzündungsreaktionen beim Asthmatiker dar. IL-5 wird durch eine Subpopulation aktivierter T-Lymphozyten, den TH-2 Zellen, produziert. Im Serum von Patienten mit exazerbiertem Astma Bronchiale konnten erhöhte Werte von IL-5 gemessen werden, die nach einer Behandlung mit Kortikosteroiden wieder abfielen.(148)

IL-5 wirkt auf die Proliferation und terminale Differenzierung sowie auf die IgA- und IgM Synthese antigenstimulierter B-Zellen. Darüber hinaus wird durch IL-5 die IgE-Synthese gefördert. Weiterhin wird die mukosale IgA Antwort induziert. IL-5 wirkt als chemotaktischer und aktivierender Faktor auf eosinophile und basophile Granulozyten. IL-5 kann sowohl die Produktion, Reifung als auch die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten beeinflussen. Es wirkt vorwiegend auf die fortgeschrittenen Stadien der eosinophilen Granulozytenreifung und Aktivierung(149,150) und kann auch deren Überlebensdauer verlängern.(151) IL-5 stellte sich als das wichtigste Zytokin heraus, welches in vivo bei der Entwicklung eosinophilen Granulozyten beteiligt ist. Die Applikation von exogenem IL-5 hat in vielen in vivo Modellen zu einer ausgeprägten Eosinophilie geführt.(152) IL-5 transgene Mäuse, deren IL-5 Transkription an den CD-2 Marker gekoppelt waren, wiesen eine lebenslange Eosinophilie in T-zellreichen Geweben wie Knochenmark, Milz und Peritoneum auf, mit jedoch nicht so vielen Zellen in der Mukosa der Bronchialschleimhaut.(153) IL-5 transgene Mäuse zeigen ein normales Verhalten, was darauf hindeutet, dass eosinophile Granulozyten zur Degranulation und dadurch bedingtem Gewebeschaden noch anderer Faktoren bedürfen. Eine intratracheale Gabe des auf eosinophile Granulozyten chemotaktisch wirkenden Eotaxins führt bei diesen Mäusen zu einer verstärkten Akkumulation von eosinophilen Granulozyten in den Lungen, die mit einer bronchialen Hyperreagibilität einhergeht, wohingegen dieser Effekt bei Mäusen vom Wildtyp nicht auftritt.(154) IL-5 kann das Knochenmark dazu veranlassen, eosinophile Granulozyten freizusetzen. Es bedarf aber anderer lokal wirkender chemotaktischer Stoffe, um deren Gewebeinfiltration zu induzieren.(155) Andererseits induziert in die Atemwege von Asthmatikern instilliertes IL-5 eine signifikante Eosinophilie(156). Inhalativ verabreichtes IL-5 induziert eine Eosinophilie im Sputum und bronchiale Hyperreagibilität, jedoch ohne das Kaliber der Atemwege zu beeinflussen (157).

## **2.2) Interleukin 10**

Interleukin 10 (IL-10) wurde zuerst unter der Bezeichnung „cytokine synthesis inhibitory factor“ bekannt, da es ursprünglich als ein Produkt von Th-2 Mäusezellen gekennzeichnet wurde, welches die Zytokinproduktion der Th1-Zellen unterdrückt.(158)

Im menschlichen Körper haben Th0, Th1, Th2 ähnliche CD4+ T-Zellklone, zytotoxische T-Zellen, Mastzellen, Keratinozyten, aktivierte Monozyten und im Blut zirkulierende CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten die Fähigkeit, IL-10 zu produzieren.(159, 160) Ein wesentlicher Anteil der IL-10 Sekretion findet in der gesunden Lunge vorwiegend durch Alveolarmakrophagen statt, wobei zirkulierende Monozyten mehr IL-10 synthetisieren als die Alveolarmakrophagen.(161)

IL-10 ist ein pleiotropes Zytokin, das auf eine Vielzahl von verschiedenen Zelltypen sowohl immunstimulatorische als auch immunsuppressive Eigenschaften ausüben kann. Es spielt bei der Regulation von Immunreaktionen eine wichtige Rolle, da es die Aktivierung der Zytokinsynthese in anderen Zellen bremsen kann und hemmend auf Makrophagen, T-Zellen und natürliche Killerzellen wirkt. Zusätzlich zu seinem inhibitorischen Effekt auf die Zytokinproduktion der Th1 Zellen hemmt IL-10 stark die Produktion der Makrophagen-Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF und TNF- $\alpha$ . Ausserdem führt IL-10 zu einer Hemmung der IL-12 Produktion der Makrophagen und zu einer Hemmung der Th1-Antwort. Weiterhin inhibiert IL-10 die Proliferation von antigenspezifischen T-Zellen durch Hemmung der Antigen-präsentierenden Kapazität von Monozyten über die Herunterregulierung des Klasse II MHC-Antigens auf Monozyten.(162) IL-10 hemmt die IFN- $\gamma$  und IL-2 Produktion der Th1-Lymphozyten und die IL-4 bzw. IL-5 Produktion von Th2-Zellen (163). Sowohl die Überlebensdauer der eosinophilen Granulozyten als auch die durch IL-4 induzierte IgE-Produktion wird durch IL-10 inhibiert. Es hemmt die IL-4 induzierte Umwandlung von peripheren mononukleären Blutzellen in IgE-sezernierende Zellen, potenziert aber die IgE-Produktion von bereits IgE-sekretorisch umgewandelten B-Lymphozyten.(164)

## **2.3) Interleukin 12**

Interleukin 12 (IL-12), welches ursprünglich als „natural killer cell stimulatory factor“ oder auch als „Cytotoxic lymphocyte maturation factor“ bezeichnet wurde, stellt ein wichtiges Zytokin der frühen Th-1 Antwort da. IL-12 wird von antigenpräsentierenden Zellen, wie z.B. B-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen, sezerniert.(165,166)

In Th1 Lymphozyten induziert IL-12 die Synthese von IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF. IL-12 und TNF- $\alpha$  stellen dabei Co-Stimulatoren für die IFN- $\gamma$  Produktion dar. Auf Th2 Zellen hat IL-12 eine hemmende Wirkung, führt dadurch zu einer verminderten IL-4, IL-5 und IL-10 Synthese und hemmt die Differenzierung der T-Lymphozyten in IL-4 produzierende Zellen.(167) IL-12 hemmt indirekt durch IFN- $\gamma$  Freisetzung die IL-4 abhängige IgE-Bildung.(168) Auf diese Weise kann IL-12 die Th1 Zelldifferenzierung regulieren, während es die Ausbildung der Th2-Zellklone unterdrückt.(167) IL-12 kommt somit eine wichtige Rolle bei der Vermeidung von überschießender IgE-Produktion und allergischen Entzündungsreaktionen nach Kontakt mit Allergenen zu. Es konnte an Blutkulturen von Patienten mit allergischem Asthma nachgewiesen werden, dass dort im Vergleich zu gesunden Patienten die Produktion von IL-12 und IL-12 induziertem IFN- $\gamma$  reduziert war.(169) In Abbildung 3 ist graphisch dargestellt, wie als Reaktion auf Bakterien oder Parasiten IL-12 von Monozyten/Makrophagen und anderen akzessorischen Zellen sezerniert wird und dadurch die Th1-Zellentwicklung und Proliferation beeinflusst. IL-12 wirkt dabei sowohl direkt auf die Th1-Lymphozyten und seine Vorstufen als auch teilweise indirekt, indem es die IFN- $\gamma$  Produktion von T-Zellen und natürlichen Killerzellen unter Mitwirkung von TNF und IL-1 anregt. INF- $\gamma$  bewirkt dabei durch einen positiven Rückkoppelungsmechanismus eine gesteigerte IL-12 Produktion der Monozyten/Makrophagen. Im Gegensatz dazu haben die von den Th2-Zellen sezernierten Zytokine wie IL-10 oder IL-4 eine stark hemmende Wirkung auf die IL-12 Produktion im Sinne eines negativen Rückkoppelungsmechanismus.

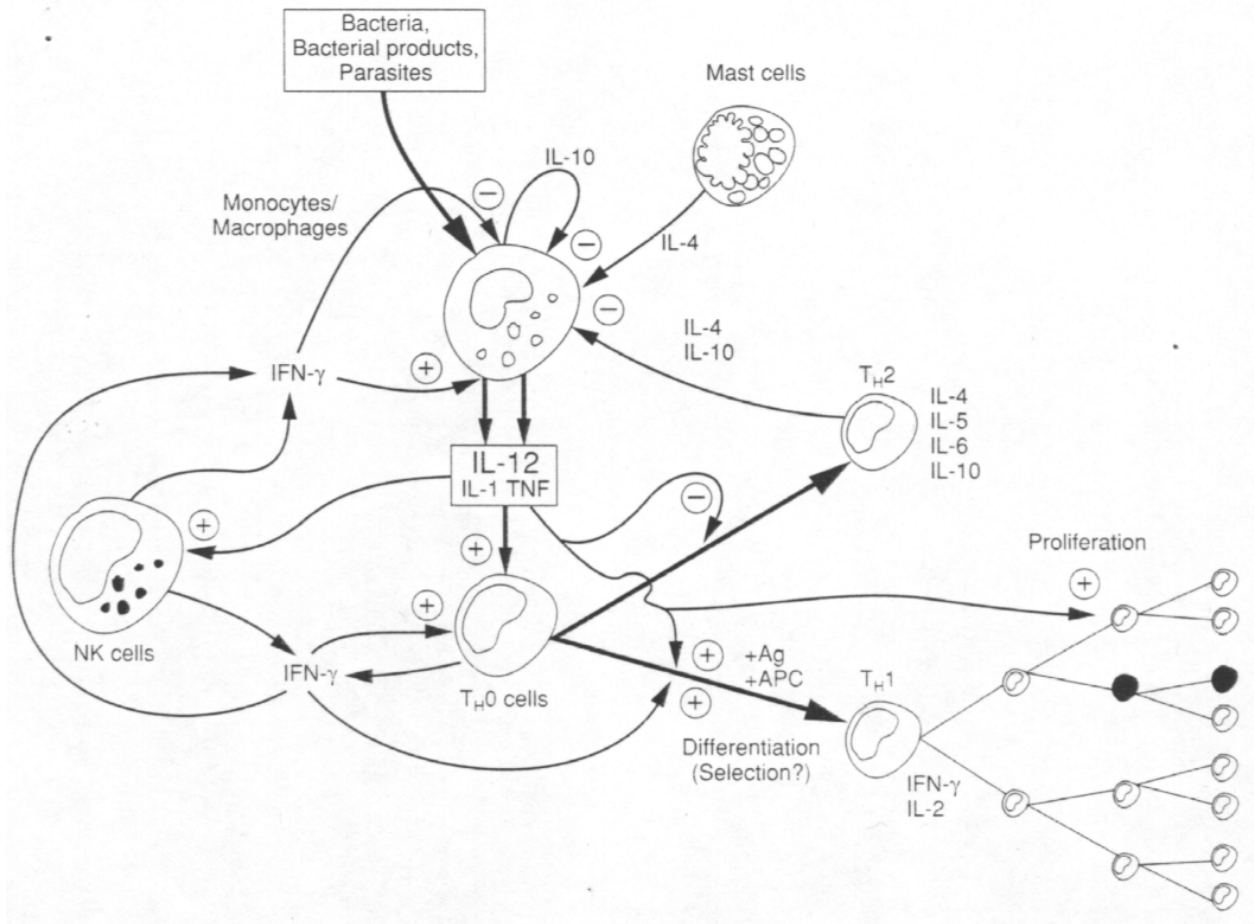


Abbildung 3: Rolle des IL-12 bei der Bildung von Th1-Zellen.

## **2.4) Interferon $\gamma$**

IFN- $\gamma$  wird physiologischerweise hauptsächlich nach Aktivierung von T-Zellen, B-Zellen und natürlichen Killer-Zellen durch Antigene, Mitogene oder Alloantigene synthetisiert. Sowohl CD4-positive als auch CD8-positive Lymphozyten produzieren IFN- $\gamma$ .(170,171) IFN- $\gamma$  stellt ein wichtiges Zytokin da, welches in der späten Phase der Th-1 Immunantwort produziert wird.

INF- $\gamma$  übt beträchtliche und mannigfaltige immunregulatorische Einflüsse auf eine Vielzahl von Zellen aus. Es wird vorwiegend von Th1-Lymphozyten produziert und übt einen hemmenden Effekt auf Th2-Zellen aus.(172) IFN- $\gamma$  zeigt, wie auch die beiden anderen Interferone, antivirale und antiparasitäre Aktivität und wirkt antimitotisch bzw. antiproliferativ auf natürliche und transformierte Zellen. In ihren proliferationshemmenden Eigenschaften wirken IFN- $\gamma$  und die Tumornekrosefaktoren (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ) synergistisch. Im Vergleich zu den anderen Interferonen ist die wachstumshemmende Wirkung von IFN- $\gamma$  stärker ausgeprägt. Im Gegensatz zu den anderen Interferonen, die vorwiegend antivirale

Eigenschaften aufweisen, wirkt IFN- $\gamma$  hauptsächlich als ein immunmodulatorisches Zytokin.(170) INF- $\gamma$  hat eine ausgeprägte und relativ spezifische hemmende Wirkung auf die IL-4 induzierte IgE und IgG1 Synthese der B-Zellen.(172). Es induziert einerseits in Monozyten und Makrophagen die Sekretion des TNF- $\alpha$ , andererseits wirkt es hemmend auf die IL-10 Produktion von Monozyten(173) und steigert dadurch ebenfalls die TNF- $\alpha$  Transkription.(174) Bei Patienten mit Asthma konnte eine verringerte Produktion von IFN- $\gamma$  durch die T-Lymphozyten nachgewiesen werden.(175) An Mäusen konnte gezeigt werden, dass IFN- $\gamma$  bei allergischen Reaktionen in der Lage ist, die Übererregbarkeit der Atemwege und die Eosinophilie zu reduzieren.(176)

### **2.5 Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  spielt eine wichtige Rolle bei akuten Entzündungsreaktionen und hat auch wichtige Funktionen in der Regulation von Immunreaktionen.

TNF- $\alpha$  wird vorwiegend von aktivierten Monozyten und Makrophagen gebildet. Unstimulierte mononukleäre Phagozyten exprimieren zwar mRNA für TNF- $\alpha$ , die Bildung des Proteins erfolgt jedoch nicht. Erst die Aktivierung der Zellen durch verschiedene Auslöser wie Bestandteile von Bakterien (etwa LPS) und Protozoen, Lymphokine oder Phagozytose von Mikroorganismen führt zur Freisetzung des Proteins TNF- $\alpha$  und zur Transkription weiterer TNF- $\alpha$ -DNA. Die TNF- $\alpha$  Sekretion der Monozyten/ Makrophagen wird durch andere Zytokine wie IL-1, GM-CSF und IFN- $\gamma$  stark gesteigert. Darüber hinaus sind auch aktivierte T-Zellen, eosinophile Granulozyten und Epithelzellen der Atemwege in der Lage, TNF- $\alpha$  freizusetzen.(177,178)

Viele der Wirkungen des TNF- $\alpha$  finden in Kombination mit anderen Zytokinen als Teil des Zytokinnetzwerkes statt. Bei neutrophilen Granulozyten und Makrophagen bewirkt es eine Steigerung der Phagozytose und der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität gegen Mikroorganismen, Parasiten und Tumorzellen, wobei TNF- $\alpha$  zusammen mit IL-1 wahrscheinlich das Auslösesignal der IFN- $\gamma$ -induzierten Makrophagenaktivierung darstellt. TNF- $\alpha$  steigert die Expression von Klasse II MHC-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen und erhöht die IL-1 Produktion dieser Zellen. Weiterhin beeinflusst TNF- $\alpha$  zusammen mit IL-1 auch T- und B-Lymphozyten und unterstützt die Aktivierung von antigenstimulierten T-Zellen und die Regulation der Antikörperproduktion. Es wirkt darüber hinaus co-stimulatorisch auf aktivierte T-Lymphozyten und verstärkt die Proliferation und verstärkte Expression von IL-2 Rezeptoren. Eine wichtige Rolle spielt TNF- $\alpha$  vor allem bei der

Induktion weiterer Zytokine. So stimuliert es die Bildung von IL-1, IL-6, koloniestimulierenden Faktoren, Prostaglandin E2 und Kollagenase in Makrophagen und koloniestimulierenden Faktoren in Endothelzellen und Fibroblasten. TNF- $\alpha$  hat verstärkende Effekte auf die chronischen Entzündungsreaktionen der Atemwege bei Asthmatikern und spielt dadurch beim Asthma eine wichtige Rolle.(179) Es konnte auch gezeigt werden, dass in Bronchialbiopsien von asthmatischen Patienten eine verstärkte TNF- $\alpha$  mRNA Expression vorliegt.(180)



### **3.) Hypothesen**

Asthma ist die häufigste chronische Krankheit des Kindesalters und für einen wesentlichen Teil der Morbidität und Gesundheitskosten verantwortlich. Obwohl von einer Vielzahl von Umweltfaktoren angenommen wurde, dass sie eine Schlüsselrolle in der Entwicklung von allergischen Erkrankungen und Asthma spielen, bleiben die Ursachen dieser Erkrankungen ungeklärt. Eine höchst interessante Hypothese ist, dass Veränderungen in der Art und dem Ausmaß von Stimulation mit mikrobiellen Produkten der Umwelt, welche mit den Verbesserungen im öffentlichen Gesundheitswesen und Hygienestandards assoziiert sind, die Prädisposition erhöht, an chronischen allergischen Erkrankungen im Kindesalter zu erkranken. Eine Exposition gegenüber Mikroorganismen kann dabei auch ohne eine Infektion vorkommen. Belebte und unbelebte Bestandteile von Mikroorganismen können in verschiedenen Konzentrationen sowohl im Innenraum als auch Aussenraum gefunden werden. Diese mikrobiellen Substanzen werden von dem angeborenen Immunsystem erkannt, jedoch ohne eine manifeste Infektion auszulösen und induzieren dabei eine inflammatorische Reaktion. Endotoxin und andere mikrobielle Bestandteile beeinflussen die Regulation einer Vielzahl von Vorgängen des Immunsystems, wie zum Beispiel die Interleukin - 12 und Interferon -  $\gamma$  Produktion. Diese Faktoren wirken hemmend auf die Entstehung von Th-2-Zellen und wirken auf diese Weise einer allergischen Sensibilisierung entgegen. Die vorherrschende Art der Reaktion auf ein spezifisches Antigen (Th-1-ähnlich oder Th-2-ähnlich) wird bei der ersten Begegnung mit dem Antigen festgelegt. Im Säuglingsalter wird die Th-2 Polarisierung des fetalen Immunsystems fortschreitend durch eine Th-1-Dominanz ersetzt.

Daher mag es sein, dass eine Exposition mit mikrobiellen Produkten eine entscheidende Rolle während der Reifung des angeborenen Immunsystems eines Kindes spielt und dadurch zu einer Toleranzentstehung gegenüber anderen Bestandteilen der natürlichen Umwelt wie z.B. Pollen oder Tierhaaren führt. Somit könnte eine mikrobielle Belastung während der frühen Kindheit eine Schlüsselrolle für die Entstehung einer nicht -atopischen Immunreaktion darstellen.

- a) Ein vom Phänotyp in Richtung TH-2-Immunität verschobenes TH-1/TH-2 Zytokinmuster ist mit allergischen Erkrankungen assoziiert.
- b) Allergische Erkrankungen bzw. Atopie treten bei Bauernkindern seltener auf als bei nicht Bauernkindern.

- c) Der Grund für die bei Bauernkindern vermindert auftretenden allergischen Erkrankungen besteht u.a. darin, dass bei ihnen ein verstärktes TH-1-Zytokinprofil mit erhöhtem IFN- $\gamma$  und IL-12 vorliegt.
  
- d) Ein weiterer Grund für das verringerte Auftreten allergischer Erkrankungen bei Bauernkindern ist die erhöhte Exposition dieser Kinder mit Endotoxinen. Die Gegenwart dieser Endotoxine begünstigt ein TH-1-Zytokinprofil mit assoziiert erhöhtem IFN- $\gamma$  und IL-12.
  
- e) Dennoch gibt es allergische/ atopische Bauernkinder, was auf deren mangelnde Fähigkeit zurückzuführen ist, ausreichend IFN- $\gamma$  zu produzieren.

## 4.) Methoden

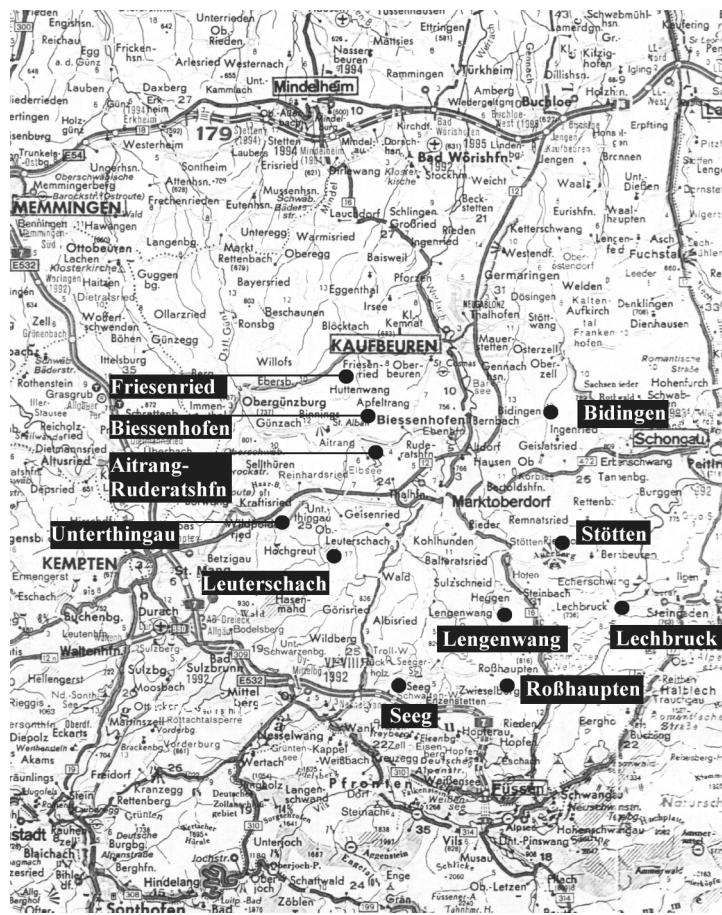
Es handelt sich um eine Querschnittsstudie von Kindern aus den Schulklassen 1-6 einiger Grund- und Teilhauptschulen im Ostallgäu/Bayern.

Die Durchführung der Studie wurde von der Ethik-Kommission der Bayerischen Landesärztekammer nach Prüfung des Studiendesigns genehmigt.

### 4.1) Studienaufbau und Logistik

Die Studie wurde im Bereich Ostallgäu durchgeführt, da nach Informationen des Gesundheitsamtes und des Schulamtes in diesem Gebiet noch eine hohe Dichte an Bauernfamilien anzutreffen ist (>10%).

Abbildung 4: Karte aus dem Studiengebiet (Ostallgäu/Bayern)



Über die Regierung von Schwaben erhielten wir die Erlaubnis zur Durchführung der Studie in dieser Region. Mit dem Einverständnis und der Hilfe vom zuständigen Schulamt konnten 11 Schulen im Ostallgäu ausgesucht werden, die im ländlichen Gebiet liegen (Abbildung 3).

Alle ansässigen Kinderärzte erhielten von uns ein Informationsschreiben über die Studie mit der Bitte, die Durchführung zu unterstützen, falls von den Eltern Nachfragen kämen. Das zuständige Gesundheitsamt Ostallgäu wurde ebenfalls über den Sinn und Zweck dieser Studie schriftlich informiert.

Nach telefonischer und schriftlicher Information der jeweiligen Schuldirektoren wurden die einzelnen Schulen von uns besucht und die Lehrer bei einer Informationsveranstaltung über den Hintergrund und Sinn der Studie aufgeklärt. In diesem Rahmen wurden Termine für die Verteilung der Fragebögen sowie für die Blutentnahmen vereinbart.

Fragebögen wurden mit gesondertem Elternanschreiben klassenweise an alle Kinder der teilnehmenden Schulen ausgeteilt und etwa 2-3 Wochen später eingesammelt.

Die Blutentnahmen fanden ebenfalls in den jeweiligen Schulgebäuden statt. Hierfür wurde ein Schularztraum oder ähnliches zur Verfügung gestellt. Den teilnehmenden Kindern wurde (nach nochmaligem mündlichen Einverständnis) lokalbetäubende Pflaster (EMLA ®) an der Blutentnahmestelle aufgeklebt. Nach einer Einwirkzeit von mindestens 30 Minuten wurden die Kinder einzeln oder paarweise zur Blutentnahme gebeten. Um den Schulunterricht so wenig wie möglich zu stören, wurden die Pflaster vor oder am Ende einer Unterrichtseinheit aufgeklebt. Ebenso wurde mit den jeweiligen Klassenlehrern der Blutentnahmezeitpunkt abgesprochen.

Für die Staubsammlungen vereinbarten die Mitarbeiter mit den teilnehmenden Familien telefonisch mindestens 1 Woche vor Besuch der Familien einen Termin.

Bei der Studie handelt es sich um eine multizentrisch angelegte Untersuchung, bei der im gleichen Zeitraum dieses Verfahren auch in Österreich und in der Schweiz durchgeführt wurde. Im Hinblick auf die Fallzahlen stellt die in Deutschland/Ostallgäu rekrutierte Studienpopulation mit Abstand den größten Anteil dar.

#### **4.2) Studienpopulation**

In den 11 Grund- und Teilhauptschulen (Grundschule + zusätzliche Klassen 5 und 6) im Ostallgäu wurden an 2201 Kinder im Alter von 6-12 Jahren (Klassen 1 bis 6) Elternfragebögen ausgeteilt. Voraussetzung für die Teilnahme war ein vollständig oder annähernd komplett ausgefüllter Fragebogen. Im Anhang des Fragebogens konnten die Eltern

ihr Einverständnis für eine Blutentnahme und/oder Staubsammlung abgeben. Es wurde ausdrücklich darauf hingewiesen, dass ein Einverständnis nicht gleich eine Teilnahme garantiere und nur ein Teil der befragten Kinder an weiterführenden Untersuchungen teilnehmen könne. Nach Erhalt von insgesamt 1709 ausgefüllten Fragebögen wurden drei Studiengruppen gebildet: die Bauernkinder und die Nichtbauernkinder mit und ohne regelmäßigem Stalltierkontakt. Insgesamt konnten so 609 Kinder für die Studie rekrutiert werden, die mit weiterführenden Untersuchungen einverstanden waren. Bei der Auswahl der Studiengruppen gingen wir wie folgt vor:

- 1.) Es wurden drei Studiengruppen anhand von Antworten aus dem Elternfragebogen definiert: a) Bauernkinder, b) Nichtbauernkinder mit regelmäßigem Stalltierkontakt und c) Nichtbauernkinder ohne regelmäßigem Stalltierkontakt. Die Definitionskriterien der einzelnen Gruppen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2:

	Leben Sie auf einem Bauernhof? (Frage 36)	Hatte ihr Kind Kontakt zu einer der folgenden Tieren? (Frage 30)	Wie häufig hielt sich ihr Kind in den letzten Monaten in einem Tierstall auf? (Frage 33)
<b>a) Bauernkinder</b>	ja	ja (für Stalltiere*)	mindestens einmal/Woche
<b>b) Nichtbauernkinder mit regelmäÙ. Stalltierkontakt</b>	nein	ja (für Stalltiere*)	mindestens einmal/Woche
<b>c) Nichtbauernkinder ohne Stalltierkontakt (=Kontrollgruppe)</b>	nein	nein (für Stalltiere*)	Weniger als einmal/Woche oder seltener

\*Als Stalltiere wurden folgende Tiere definiert: Kühe/Rinder, Schweine, Schafe, Geflügel, Pferde, Ziegen

- 2.) Alle Bauernkinder mit ausgefülltem Fragebogen und mindestens Einverständnis zur Blutentnahme wurden für Blutentnahmen rekrutiert. Eine Zufallsstichprobe von Nichtbauernkindern ohne regelmäßigen Stalltierkontakt, die sowohl mit Blutentnahme als auch Staubsammlung einverstanden waren, dienten als Kontrollgruppe und wurden nach Alter und Geschlecht zugewiesen. Die dritte Gruppe bestand aus Kindern, die zwar nicht auf dem Bauernhof leben, aber trotzdem regelmäßig Stalltierkontakt haben. In dieser Gruppe wurden alle Nichtbauernkinder mit regelmäßigem Stalltierkontakt aufgenommen, die mit einer zusätzlichen Blutentnahme und mit der Staubsammlung einverstanden waren.

### **4.3) Fragebögen zur Gesundheit**

Der Fragebogen basiert auf einem international standardisierten Fragebogen der ISAAC-Studie (International Study of Asthma and Allergies in Childhood)(5), der in Voruntersuchungen bereits erfolgreich zum Einsatz kam. Einige Fragen zum bäuerlichen Lebensstil wurden zusätzlich eingefügt.

Mit einer Anleitung zur richtigen Beantwortung der Fragen wurden insgesamt 53 Fragen gestellt (siehe Anlage 1). Die Fragen betrafen folgende Punkte:

- 1.) allgemeine Angaben zum Kind (Geschlecht Staatsangehörigkeit, Geburtsort etc.)
- 2.) Gesundheit des Kindes und der Familienmitglieder (v.a. bezüglich Asthma, Heuschnupfen und Neurodermitis)
- 3.) die Lebenssituation (spezielle Fragen zum Leben auf dem Bauernhof und Tierhaltung etc.)
- 4.) Ernährungsfragen und Milchkonsum (Verzehr von Lebensmitteln aus eigener Erzeugung, Milch aus dem Laden oder vom Hof etc.)
- 5.) Weitere Angaben (z.B. zum Bildungsstand der Eltern)

Am Ende des Fragebogens konnten noch Bemerkungen zum Fragebogen notiert werden. Um den Datenschutz zu wahren, wurden die Fragebögen anonym ausgefüllt und mit ID-Nummern gekennzeichnet. Lediglich die Einwilligungserklärungen für die Blutentnahme und für die Staubsammlung waren mit Namen und Adresse des Kindes versehen. Die Fragebögen wurden klassischerweise an den Studienschulen verteilt und nach 2-3 Wochen in verschlossenen Kuverts wieder eingesammelt und abgeholt. Die Einwilligungen wurden von dem restlichen Fragebogen abgetrennt und gesondert aufbewahrt, so daß der Datenschutz gegenüber Dritten gewahrt werden konnte. Lediglich aufgrund der ID-Nummern, die sowohl auf der ersten Seite des Fragebogens als auch auf dem Einwilligungszettel aufgedruckt sind, konnte dann die Zuordnung gewährleistet werden.

Durch eine Dateneingabefirma wurden alle Daten der Elternfragebögen in eine umfassende Datei für die statistischen Analysen eingegeben.

#### **4.4) Interview beim Hausbesuch**

Neben der Staubsammlung füllten die Mitarbeiter bei den Hausbesuchen durch kurze Interviews die Zusatzfragebögen mit Fragen zum Impfstatus des Kindes, Stillen etc. (siehe Anlage 3a) mit den Eltern aus. Dieser Zusatzfragebogen wurde bei allen Kinder ausgefüllt. Bei den Bauernfamilien wurde zusätzlich ein Kurzinterview über die Stalltiere (welche Tiere, wo sie zu den verschiedenen Jahreszeiten gehalten werden) und die Aufenthaltshäufigkeit des Kindes im Stall durchgeführt und dokumentiert (siehe Anlage 3b).

#### **4.5) Blutuntersuchungen**

Nach telefonischer Terminvereinbarung mit den jeweiligen Schulen und entsprechender Vorbereitung der Kinder wurden drei Blutröhrchen pro teilnehmendem Kind abgenommen: Ein Serumröhrchen (ca.7ml) für Allergietestungen, Heparinblut (ca.4ml) für Zytokinstimulationen und EDTA-Blut (ca.2.7ml) für Differentialblutbild sowie DNA-Extraktionen. Zur Blutabnahme wurden Butterflys (21G) sowie Blutröhrchen der Firma Sarstedt (S-Monovetten) verwendet. Jedes Kind erhielt als Dankeschön wahlweise eine Frisbeescheibe oder ein kleines Geschicklichkeitsspiel. Die Erst- und Zweitklässler erhielten zusätzlich eine „Tapferkeitsurkunde“.

Die Heparin- und Serumröhrchen wurden gekühlt und das EDTA-Blut bei Raumtemperatur transportiert. Die Blutröhrchen wurden noch innerhalb weniger Stunden nach Abnahme (<5h) für die verschiedenen Untersuchungen im Labor bearbeitet.

Hierzu waren folgende Arbeitsschritte nötig:

A) Das Serum wurde abzentrifugiert und in drei Portionen (jeweils 1ml) bei mindestens -20 Grad eingefroren. Für eine zweifelsfreie Zuordnung wurden allen Portionen mit den jeweiligen ID-Nummern der Teilnehmer gekennzeichnet. Eine Serumportion von allen Studienkindern wurde für eine RAST-Testung in das Allergielabor von Prof. Wahn (Universitätskinderklinik Charité in Berlin) verschickt. Es wurden das Gesamt-IgE, RAST auf Kuhepithel und Vorratsmilben und die Screeningtests SX1 (für Inhalationsallergene) und FX5 (für Nahrungsmittelallergene) (Pharmacia and Upjohn diagnostics, Freiburg/Deutschland) durchgeführt. Bei einem positiven SX1-Test wurden zusätzlich das spezifische IgE für Gräser (Lol 5), Birke (Bet v1), Milbenallergene (Der p1 und Der f1) und Katzenhaare (Fel d1) bestimmt. Bei einem positiven FX5-Test wurde das spezifische IgE für Hühnereiweiß und Kuhmilch gemessen.

B) Für die Zytokinstimulation wurden pro Studienkind 4 sterile Röhren mit Stimulantien und Kontrollmedien vorbereitet. Die Röhren bezogen wir aus dem Labor von Herrn Dr. Hartung (Institut für Biochemische Pharmakologie der Universität Konstanz). Alle 4 Röhren enthielten ein Kontrollmedium (4ml RPMI 1640 + 100mg Streptomycin (Biowhittaker, Deutschland)), wobei in ein Röhren LPS vom Salmonella abortus equi (10 µg/ml) und in ein Röhren SEB (1µg/ml von Sigma, Deisenhofen/Deutschland) zugesetzt wurde. In die 4 Röhren wurden jeweils 1 ml Heparinblut pipettiert und im Anschluss in einem Brutschrank, der ein Gasgemisch mit 5% CO<sub>2</sub> enthielt, bei 37 Grad stimuliert. Das LPS-haltige Röhren +1 Kontrollmedium wurden für 24h und das SEB-haltige Röhren +1 Kontrollmedium wurden für 72h inkubiert. (siehe auch Gliederungspunkt 5. Zytokin/ Zellstimulation, Methodenvergleich). Diese verschiedenen Inkubationszeiten wurden von uns als die optimale Stimulationszeit in zuvor durchgeführten Testdurchläufen im Labor von Professor Renz (Universitätskinderklinik Charité/Berlin) geprüft. Nach der Inkubationszeit wurden die Röhren für 2 Minuten zentrifugiert und in 5 kleine Portionen von mindestens 600µl bei -80 Grad eingefroren. Aus den stimulierten Proben wurden von mir die Zytokine IFN-γ, IL-5, IL-10, IL-12 und TNF-α im Labor von Professor Renz gemessen. Die Messungen erfolgten mittels ELISA, wobei handelsübliche Kits von der Firma BD Pharmingen/Deutschland und Mäuseantikörper gegen menschliches IFN-γ verwendet wurden (siehe auch Gliederungspunkt 6. Zytokinmessungen durch ELISA).

C) Vom EDTA-Blut wurde zunächst ein Differentialblutbild bestimmt. Nach Zentrifugation der Röhren wurde das abzentrifugierte Plasma in verschließbare Gefäße abpipettiert und bei -80 Grad eingefroren. Der Zellüberstand in den Röhren wurde mehrfach gewaschen und die Zellen in Plastikgefäßen aufbewahrt. Nach einer Lagerzeit von etwa 4 Monaten wurde freie DNA aus den Zellen gewonnen und diese wiederum gekühlt aufbewahrt.

#### **4.6 Endotoxin/ Staubsammlung**

Nach telefonischer Terminabsprache wurden die Familien für die Staubmessung besucht. Die Familien wurden angehalten, mindestens 3 Tage vor der Staubsammlung nicht die Böden zu putzen und die Betten nicht frisch zu beziehen.

Um die Sammelbedingungen und die -methoden bei allen Mitarbeitern so gleich wie möglich zu halten, wurde ein Staubnahmeprotokoll (siehe Anlage 4) erstellt, das u.a. die genaue



Staubsammelzeit, Staubsaugerleistung und detailliertes Vorgehen dokumentierte. Bei einem Treffen aller Mitarbeiter wurde die praktische Durchführung des Protokolls besprochen, durchgetestet und gemeinsam trainiert. Jede Staubsammlung wurde genau protokolliert. Es wurden Staubproben von der Bettmatratze des Kindes und vom Wohnraum, in dem sich das Kind vorwiegend aufhält, gewonnen. Hierzu wurde eine genau definierte Fläche für eine genau bestimmte Zeit gesaugt. Alle Mitarbeiter benutzten die gleichen Geräte für die Staubsammlungen. Die Staubsauger von der Firma Miele (Typ S624) wurden einheitlich auf eine maximale Motorenleistung von 1600 Watt (=721/sec Saugluftmenge) eingestellt. An dem Staubsaugerrohr wurden Filterhalter mit einem auswechselbaren Filter angesteckt, so dass der gesamte Staub, der angesaugt wurde, im eingelegten Filter hängen blieb. Der Staub auf dem Filter wurde anschließend gewogen und in zwei sterile Eppendorfgefäße abgefüllt. Je eine Portion wurde bei Raumtemperatur für die Endotoxinmessung (mind. 100mg Feinstaub) und die andere Portion bei mindestens -20 Grad für die Allergenmessung (mind. 200mg) aufbewahrt. Die Endotoxinmessungen wurden im Institut für Umwelt- und Arbeitsmedizin der LMU München mittels des Limulus-Amoebocyten-Lysat-Tests (LAL-Assay) durchgeführt.

## **5.) Zytokin/ Zellstimulation Methodenvergleich**

Im Vorfeld der Studie haben wir 4 verschiedene etablierte Zellstimulationsmethoden gegeneinander verglichen, um die für unsere Zwecke am besten geeignete zu ermitteln. Wir verglichen 2 Methoden (Methode 1&2), bei denen für die Stimulation periphere mononukleäre Zellen (PBMC) isoliert wurden, mit 2 Methoden (Methode 3&4), bei denen Vollblut zur Zellstimulation verwendet wurde.

Methode 1: konventionelle Dichtegradientenseparationstechnik (Ficoll-Methode)

Methode 2: Separationstechnik in bereits vorgefertigtem Trennmedium (BD Methode)

Methode 3: in-vitro Stimulation mittels Vollblutmethode

Methode 4: Vollblutstimulation in vorbeschichteten LPS bzw. SEB-Röhrchen (Labor Dr. Hartung, Universität Konstanz)

Die Testansätze wurden über 24 bzw. 48 Stunden durchgeführt, wobei 6 Probanden untereinander verglichen wurden. Die Stimulationen fanden gleichzeitig in dem selben Brutschrank in Gegenwart von 5%  $CO_2$  bei einer Temperatur von 37°C statt. Stellvertretend für die Zytokinproduktion wurde das prototypische Zytokin IFN- $\gamma$  gemessen.

### **5.1) Material/ Lösungen**

#### **Material:**

Brutschrank

Eppendorf-Zentrifuge

Sterile Werkbank

24-Well Platten, pro Well 1,9 ml Volumen (Costar, Corning Inc.)

15 ml Falcon Röhrchen

Eppendorfröhrchen (1,5 ml, Eppendorf, Hamburg)

1x Pipetten 5,10 ml (Falcon)

## Lösungen:

### Medium:

Aim V (500 ml Flasche) von Fa. Gibco BRL Kat.No. 20030-029 (ohne L-Glutamin, mit Streptomycinsulfat 50µg/ml, mit Gentamycinsulfat 10µg/ml, mit humanem Serumalbumin 0,10%) versetzt mit:

- 5 ml L-Glutamine von Fa. Biochrom KG, Seromed Kat.No. K0282
- 1 Flasche Fungizone von Gibco BRL (Life-Technology), Kat.No.15295-017

### Negativkontrolle: Phosphat Buffered Saline (PBS)

80,0 g NaCl

11,6 g  $Na_2HPO_4$

2,0 g  $KH_2PO_4$

2,0 g KCL + 0,05% Tween 20, ad 1l aqua. dest., pH 7,0

### P/I Stimulans:

- 1.) DMSO (Dimethylsulfoxid) von Fa. Merk, Kat.No. I 743850731
- 2.) Phorbol-12,13-dibutyrat (PDB) von Fa. Sigma 1mg (Best.Nr.P1269)  
Stocklösung: 1mg PDB auf 1,98 ml DMSO (entspricht  $10^{-3}$  M/ml)
- 3.) Ionomycin Calcium Salt von Fa. Calbiochem 5 mg (Kat.Nr. 407952)  
Stocklösung: 5mg lösen in 1 ml DMSO + 9 ml Aim V (entspricht 500 µg/ml).
- 4.) P/I Stimulans mischen: 480 ml Aim V + 10 ml Ionomycin 50µg/ml, + 10 ml PDB  $10^{-5}$  M .

### LPS-Stimulans:

LPS (von E. coli) 1 mg-Portion, Fa. Sigma (Kat.Nr. L-4516)

Verwendete Konzentrationen (Endkonzentration im Well). 1µg/ml und 10 µg/ml

## **5.2) Dichtegradientenseparationstechnik (Ficoll-Methode)**

Zur Separation von PBMC wurde heparinisiertes Blut mit Hilfe des Ficoll-Dichte-Gradienten getrennt. Dazu wurde das Vollblut in 15 ml Falcon Röhrchen in einem Verhältnis 1:1 über Ficoll (Nycomed-Lymphoprep, Oslo Norwegen, Dichte 1,077) geschichtet (3 ml Blut auf 3 ml Ficoll), ohne dass eine Vermischung stattfand. Anschließend wurde das Röhrchen für 20min bei 2000rpm (834,9g) ohne Bremse zentrifugiert.

Das Prinzip der Ficoll-Dichte-Gradient-Zentrifugation beruht darauf, dass die Dichte von Ficoll höher ist als die Dichte von Lymphozyten, jedoch geringer als die Dichte von Erythrozyten und Granulozyten. Bei der Zentrifugation wandern die Erythrozyten durch die Ficollschicht und pelletieren, während die Lymphozyten sich in einer Schicht anreichern, die zwischen Plasma und Ficoll liegt. Der Lymphozytenring und das Plasma wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein Sekundärröhrchen pipettiert.

Dieses Röhrchen wurde dann dem ersten Waschschrift mit folgenden Vorgängen unterzogen, um Ficoll zu entfernen:

- a) Zunächst wurde das Röhrchen mit 1000g ohne Bremse für 10min zentrifugiert.
- b) Der Überstand wurde dann vorsichtig abgegossen, so daß das Pellet im Röhrchen verbleibt.
- c) Anschließend wurde 1ml Aim V zugegeben, und das Pellet aufgewirbelt (d.h. Flüssigkeit mehrmals mit der Pipettenspitze aufziehen und wieder rauspipetieren).
- d) Das Röhrchen wurde dann mit Aim V auf ein Endvolumen von 8-9ml aufgefüllt.

Danach folgte ein zweiter Waschschrift, bei dem die unter a)-d) angegebenen Schritte noch einmal wiederholt wurden. Das nach dem 2. Waschschrift unter d) erhaltene Röhrchen wurden nun nochmals bei 1000g mit Bremse für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann vorsichtig abgekippt und 850µl Aim V dazupipettiert und das Pellet aufgewirbelt. 50µl dieses Endvolumens wurden anschließend in ein Eppendorfhütchen pipettiert, in dem bereits 200µl Puffer vorgelegt waren. Anhand des Differentialblutbildes wurde die Lösung nun verdünnt (auf  $4 \times 10^6$  Zellen/ml) und davon je 0,5ml auf 0,5 ml des vorbereiteten Mediums (Aim V) pipettiert. Anschließend wurde entweder Negativkontrolle, P/I-Stimulans, LPS 1µg/ml oder LPS 10µg/ml in die Kavitäten der 24-Well Platten pipettiert und danach in den Brutschrank verbracht.

### **5.3) Ficoll-Methode von BD**

Bei der zweiten von uns verglichenen Methode wurden die PBMC ebenfalls mit Hilfe des Ficoll-Dichte-Gradienten getrennt. Wir benutzten dazu ein bereits vorgefertigtes Trennmedium (Ficoll Hypaque, Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg, FRG). Die PBMCs wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers isoliert. Dazu wurden 8 ml Heparinblut über das Trennmedium geschichtet, ohne daß eine Vermischung stattfand. Anschließend wurde das Röhrchen für 20 min bei 1500g zentrifugiert. Der Lymphozytenring und das Plasma wurden danach mit einer sterilen Pipette in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt und mit 1000g für 10 min mit Bremse zentrifugiert. Danach wurde das Ficoll durch Waschen entfernt. Dazu wurde der Überstand abgekippt und darauf geachtet, dass das Pellet am Röhrchenboden bleibt. Anschließend wurde das Pellet mit 1ml Aim V resuspendiert, und das Röhrchen danach mit Aim V aufgefüllt. Anschließend wurde es bei 1000g für 10 min mit Bremse zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde anschließend ein zweites Mal wiederholt. Nach der Zentrifugation des zweiten Waschschriftes wurde der Überstand wieder abgekippt und 850 µl Aim V dazupipettiert. Die Lösung wurde nun wie bei 5.2) anhand des Differentialblutbildes verdünnt und 0,5 ml davon auf den 24-Well-Platten ebenfalls mit den bereits oben beschriebenen Stimulantien versehen und im Brutschrank inkubiert.

### **5.4) In-vitro Stimulation mittels Vollblutmethode**

Für die in vitro Vollblutstimulation mussten zunächst unter der sterilen Werkbank die Tissue Culture Plates vorbereitet werden, indem in jede Kavität 1 ml Medium vorgelegt und jeweils entweder 1 ml Negativkontrolle, P/I-Stimulans, LPS-Stimulans (10 µg/ml) oder LPS-Stimulans (1 µg/ml) dazupipettiert wurde. Anschließend wurde pro Kavität 1 ml Heparinblut zupipettiert und die Platte anschließend im Brutschrank bebrütet.

Nach der Stimulation pipettierten wir die stimulierte Blutprobe in ein Reagenzglas und zentrifugierten dieses für 20 min bei 1100 rpm (=200g). Die Überstände wurden (wie auch bei den anderen Stimulationstechniken) in 250 µg-Portionen in NUNC-Röhrchen aufgeteilt und bis zur ELISA-Messung bei -80°C eingefroren.

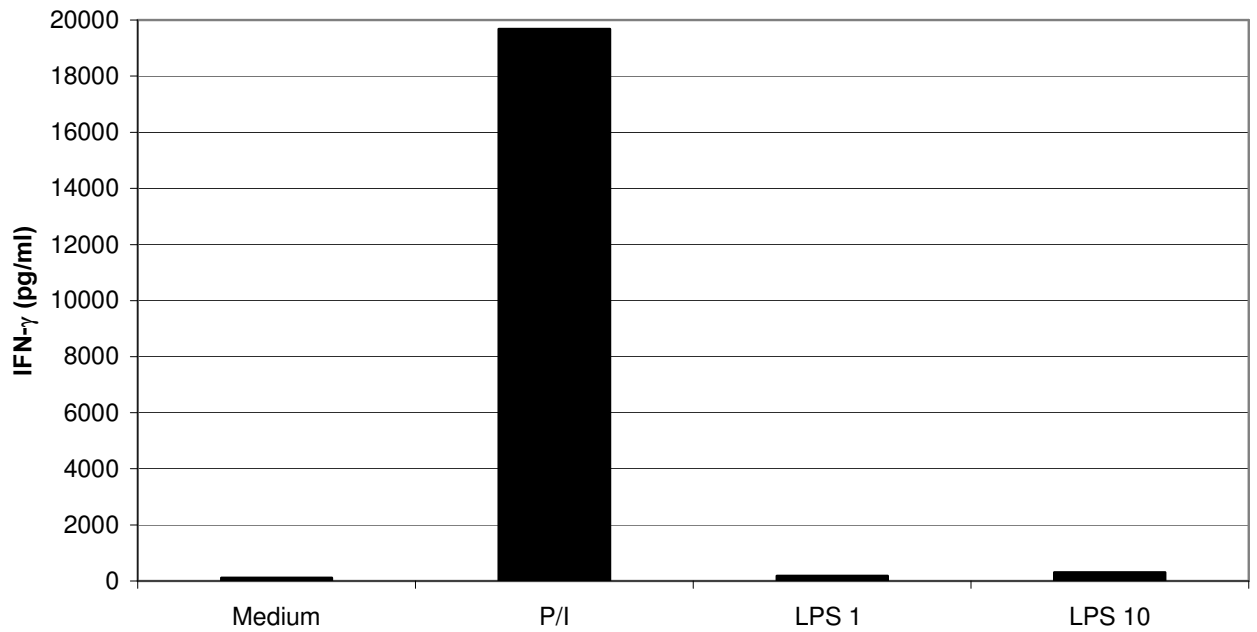
### **5.5) Vollblutstimulation in vorbeschichteten LPS bzw. SEB-Röhrchen**

Bei der zweiten getesteten Vollblutstimulationsmethode wurden pro Patient 4 sterile Glasröhrchen mit Stimulantien und Kontrollmedium vorbereitet. Die Röhrchen bezogen wir aus dem Labor von Herrn Dr. Hartung (Institut für Biochemische Pharmakologie der Universität Konstanz), die schon erfolgreich bei mehreren klinischen Studien zum Immunmonitoring eingesetzt wurden.(183) Alle 4 Röhrchen enthielten ein Kontrollmedium (4ml RPMI 1640 + 100 mg Streptomycin (Biowhittaker, Deutschland)), wobei in ein Röhrchen LPS vom Bakterium Salmonella abortus equi (10 µg/ml) und ein Röhrchen SEB (1 µg/ml von Sigma,Deisenhofen/ Deutschland) zugesetzt wurde. In die 4 Röhrchen wurde unter der sterilen Werkbank jeweils 1 ml Heparinblut pipettiert und im Anschluß im Brutschrank stimuliert. Anschließend wurden die Röhrchen geschüttelt und für 2 min bei 500g ohne Bremse zentrifugiert, der zellfreie Überstand danach in 200 µl Portionen aufgeteilt und bis zur Zytokinmessung bei -80°C eingefroren.

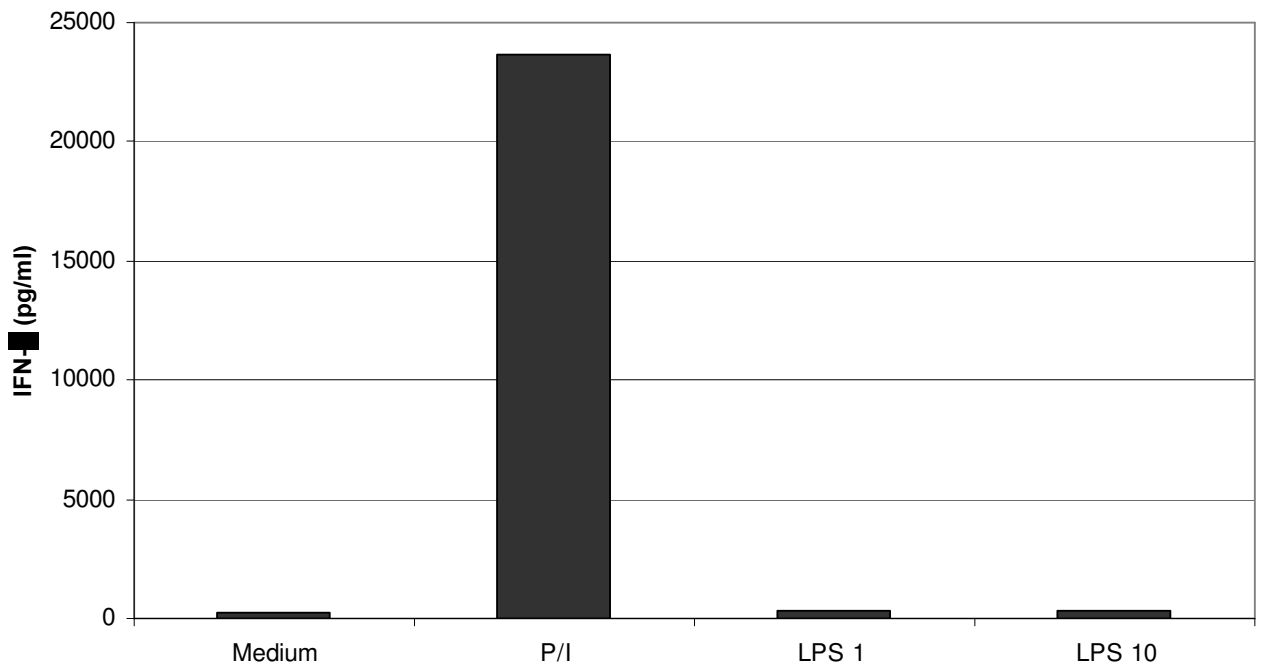
### **5.6) Methodenvergleich**

Die durch die verschiedenen Stimulationsmethoden gewonnenen Zellüberstände wurden alle mit dem selben IFN-γ ELISA gemessen. Im Vergleich der Zytokinproduktion ergab sich folgendes: Die Maximalstimulation mit Phorbol ester plus Ionomycin induzierte eine optimale IFN-γ Produktion. Diese Methode kann allerdings nur nach entsprechender Zellseparation durchgeführt werden (herkömmliche Dichtegradiententrennung = Ficoll-Methode siehe Abbildung 5a, Dichtegradiententrennung in kommerziell vorgefertigten Trennmedien = BD-Methode siehe Abbildung 5b, Vollblutmethode siehe Abbildung 5c). Im Vergleich dieser 3 Methoden untereinander schneidet die Vollblutmethode am schlechtesten ab.

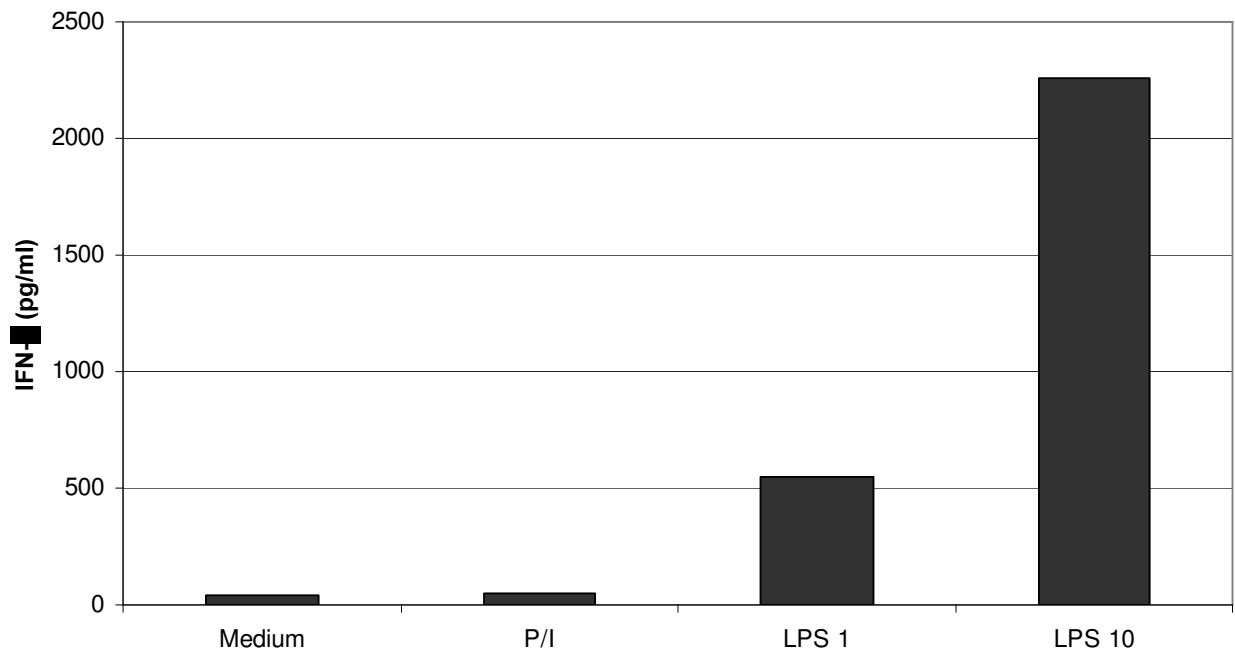
**Abbildung 5a)** Ficoll-Methode: IFN- $\gamma$  Produktion nach 24 h. Vergleich Medium, P/I-Stimulans, LPS 1  $\mu\text{g/ml}$  und LPS 10  $\mu\text{g/ml}$ .



**Abbildung 5b)** Ficoll-BD-Methode: IFN- $\gamma$  Produktion nach 24 h. Vergleich Medium, P/I-Stimulans, LPS 1  $\mu\text{g/ml}$  und LPS 10  $\mu\text{g/ml}$ .



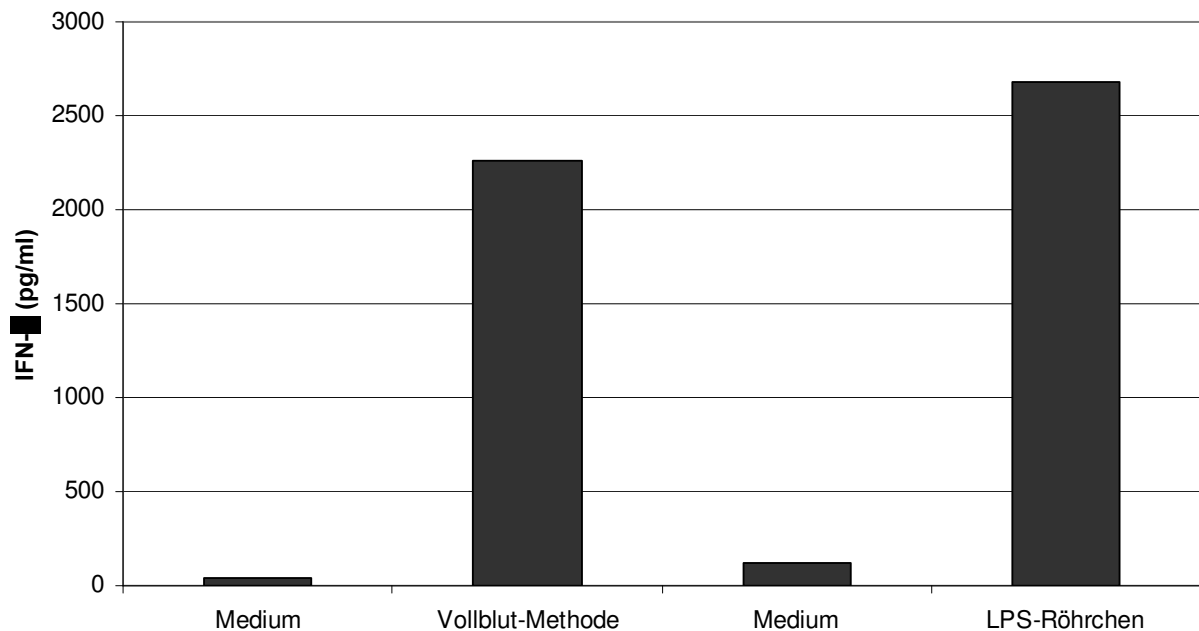
**Abbildung 5c)** Vollblutmethode: IFN- $\gamma$  Produktion nach 24 h. Vergleich Medium, P/I-Stimulans, LPS 1  $\mu\text{g/ml}$  und LPS 10  $\mu\text{g/ml}$ .



In Abbildung 5c ist zu sehen, daß bei der Vollblutmethode eine LPS Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  eine wesentlich höhere IFN- $\gamma$  Produktion als eine LPS Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  stimuliert.



**Abbildung 5d)** Vergleich der IFN- $\gamma$  Produktion: LPS-Röhrchen und Vollblutmethode nach 24h Stimulation mit LPS (10 $\mu$ g/ml).



Im Hinblick auf Stimulation mit LPS, zeigen die mit LPS vorbeschichteten Röhrchen die höchsten Zytokinkonzentrationen. Diese vorgefertigten Röhrchen sind anderen Methoden gegenüber deutlich überlegen und wurden deshalb zur Zellstimulation im Rahmen der Studie benutzt. Durch die Verwendung dieser Vollblutmethode konnten auch durch die Zellseparation bedingte Anreicherungen/ Verminderungen bzw. vorzeitige Aktivierung von Lymphozytensubpopulationen vermieden werden.

Mit der durchgeführten Zellstimulation wollten wir untersuchen, ob eine chronische Exposition mit Bakterienantigenen in der Lage ist, eine Immundeviation bei Kindern zu beeinflussen. Dazu verglichen wir die Zytokinproduktion nach Zellstimulation von PBMCs von Bauernkindern und Nicht-Bauernkindern. Es wurde eine Vollblutstimulation durchgeführt. Als ein Surrogatmarker für gram-negative Bakterien führten wir eine Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) durch. Stellvertretend für gram-positive Bakterien benutzten wir Staphylokokkenenterotoxin B (SEB) als Stimulans. Pro Kind und Stimulans wurde jeweils eine Kontrolle mitgeführt, die Medium ohne Stimulans enthielt. Die Stimulation wurde für LPS 24h und für SEB 72h durchgeführt. In den zellfreien Überständen wurden anschließend durch ELISA die Zytokinlevel bestimmt. Es wurden IL-5, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  gemessen. Sowohl bei den LPS als auch bei den SEB Stimulationen waren

für IL-5 eine so hohe Anzahl von Messwerten unterhalb der Nachweisgrenze, dass eine Interpretation der IL-5 Produktion nicht durchgeführt werden konnte.

## **6.) Zytokinmessungen mittels ELISA**

Zur Messung der Zytokine im Kulturüberstand wurde das Prinzip des Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) eingesetzt. Nachdem die zellfreien Überstände der stimulierten Zellen bei -80 °C zwischenlagerten, erfolgte nach ein paar Monaten die Messung der relevanten Zytokine. Dabei wurde jeweils der Überstand des Blutes mit Stimulans und der Überstand der Kontrolle (Blut ohne Stimulans), die gleich lange im selben Brutschrank inkubiert wurden, auf der selben ELISA-Platte gemessen, um die Vergleichbarkeit der Messwerte zu gewährleisten. Für die Messungen wurden handelsübliche ELISA-Kits der Firma Pharmingen (Hamburg, Deutschland) verwendet. Es wurden folgende ELISA Sets hergenommen:

Interleukin 5: OptEIA™, Human IL-5 Set, Katalog Nr. 2633 KI

Interleukin 10: OptEIA™, Human IL-10 Set, Katalog Nr. 2617 KI

Interleukin 12: OptEIA™, Human IL-12 (p70) Set, Katalog Nr. 2625 KI

Interferon  $\gamma$ : OptEIA™, Human IFN- $\gamma$  Set, Katalog Nr. 2613 KI

Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$ : OptEIA™, Human TNF- $\alpha$  Set, Katalog Nr. 2611 KI

Das Prinzip des ELISA besteht darin, dass zunächst der für das jeweils zu messende Zytokin spezifische Primärantikörper an eine Mikrotiterplatte adsorbiert und mit dem Überstand der stimulierten Zellen inkubiert wird. An den entstandenen Immunkomplex aus Antikörper und zu messendem Zytokin lagern sich im nächsten Schritt enzymmarkierte Anti-Antikörper an (sog. Sandwichmethode). Durch Zugabe eines chromogenen Substrats können dann die immunkomplexgebundenen Enzym-Substrat-Komplexe photometrisch gemessen werden. Die Farbstoffreaktion des Produktes aus der Indikatorreaktion ist dabei der Antigenkonzentration des Überstandes proportional.

Da die Arbeitsschritte und die Vorgehensweise bei den verschiedenen ELISA-Kits die gleichen sind, wird im folgenden exemplarisch das Procedere für IFN- $\gamma$  dargestellt.

## **6.1) Puffer/ Lösungen**

Es wurden die Puffer und Lösungen gemäß den Empfehlungen der Firma Pharmingen hergestellt und verwendet. Im einzelnen wurden folgende Lösungen und Puffer von uns hergestellt und benutzt:

### **Coating-Puffer:**

8,4 g  $NaHCO_3$

3,56 g  $Na_2CO_3$  ad 1L Aqua destillatum, pH 9,5

Bei 2-8°C 30 Tage im Kühlschrank haltbar.

### **Wasch-Puffer:**

Phospat Buffered Saline (PBS):

80,0 g NaCl

11,6 g  $Na_2HPO_4$

2,0 g  $KH_2PO_4$

2,0 g KCL + 0.05% Tween 20 (d.h. 5 ml), ad 1L Aqua dest., pH 7,0

Bei 2-8°C 30 Tage im Kühlschrank haltbar.

### **Assay Diluent:**

80,0 g NaCl

11,6 g  $Na_2HPO_4$

2,0 g  $KH_2PO_4$

2,0 g KCL

+10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum, ad 1L Aqua dest. pH 7,0

Bei 2-8°C im Kühlschrank 7 Tage haltbar.

### **Citrat-Puffer:**

42 g Monocitrat

Ad 1L Aqua destillatum, pH 3,95

### **Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat:**

240 mg Tetramethylbenzidin

5 ml DMSO

5 ml Ethanol

Bei 2-8°C im Kühlschrank in Alufolie bis zu 2 Wochen haltbar.

### **Substrat-Lösung:**

14 ml Citrat-Phosphat-Puffer

5 µl  $H_2O_2$  pro Platte

150 µl TMB pro Platte

### **Stop-Lösung:**

2N  $H_2SO_4$

### **6.2) ELISA-Arbeitsschritte:**

Tag 1:

1.) Coaten der Platten (Microwell Platten, 96-well Nunc Maxisorp):

Pro Vertiefung der ELISA-Mikrotiterplatte wurden 100µl verdünnter Capture-Antikörper (monoklonaler anti-human IFN- $\gamma$  Antikörper) pipettiert. Dabei wurden die Antikörper in einer 1:250 Verdünnung in Coating-Puffer gelöst. Für eine 96-well ELISA-Platte entspricht das 48µl Antikörper auf 11,95ml Coating-Puffer.

Anschließend wurden die Platten mit Parafilm abgedeckt und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Tag 2:

2.) Die Platte wurde 3x mit dem Wasch-Puffer gewaschen.

3.) Die Platte wurde mit 200µl Assay Diluent pro Kavität geblockt und bei Raumtemperatur für 1h inkubiert.

4.) Anschließend wurde die Platte 3x mit dem Wasch-Puffer gewaschen.

5.) Auftragen von je 100µl der Probe oder Standard pro Kavität und anschließend Inkubation für 2h bei Raumtemperatur.

- 6.) Um die nicht an die Antikörper gebundenen Reste des Probenmaterials zu entfernen wurde die Platte 6x mit Wasch-Puffer gewaschen.
- 7.) Zugabe von 100µl Working Detector pro Kavität der Platte. Anschließend Inkubation für 1h bei Raumtemperatur. Der Working Detector besteht aus einer Mischung von Detection-Antikörper und Avidin-Horseradish-Peroxidase (POD). Dieser Mix ist in einer 1:250 Verdünnung in Assay Diluent gelöst. Um den Working Detector für eine Platte herzustellen, benötigt man demnach: Zunächst 48µl Detection-Antikörper ad 11,90ml Assay Diluent. Dann innerhalb 15 Minuten vor Gebrauch: 48µl POD ad 11,95ml verdünntem Detektion-Antikörper.
- 8.) 8x waschen mit Wasch-Puffer. Zwischen den einzelnen Waschschröngen je ca. 30-60 Sekunden einweichen lassen.
- 9.) Substratzugabe: Je 100µl TMB-Substratlösung wurden in jede Kavität pipettiert. Die TMB-Substratlösung für eine Platte besteht aus 14ml Citrat-Phosphat-Puffer, 5µl  $H_2O_2$  und 150µl TMB. Zu beachten ist, dass die Lösung stets frisch angesetzt und lichtgeschützt aufbewahrt werden muss. Danach wurde der Farbumschlag abgewartet. Wichtig ist die Platte während des Entwicklungsvorganges vor Licht zu schützen. Die Inkubationszeit bis zum geeigneten Farbumschlag beträgt je nach Raumtemperatur zwischen 5-20 Minuten.
- 10.) Mit Zugabe von 50µl/well Stop-Lösung wurde die Farbentwicklung abgebrochen. Nach kurzem Schütteln erfolgte die Messung bei einer Filterkombination von 450nm/570nm.

Zur Herstellung der Standardverdünnungsreihen der einzelnen Zytokine wurde Assay Diluent verwendet. In Vorversuchen wurden auch andere Lösungen wie AIM V, RPMI+ 5% FKS und PBS+ Tween 20 getestet, wobei sich (wie auch von Pharmingen empfohlen) Assay Diluent als das geeignetste Lösungsmedium herausstellte.

Die Detektionslimits der ELISA-Messungen waren für IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  16 pg/ml und 8 pg/ml für IL-5, IL-10 und IL-12. Durch das gleichzeitig durchgeführte Differentialblutbild konnte die Zytokinproduktion in pg/  $10^6$  Leukozyten angegeben werden.

## 7.) Statistische Analysen

Die Dateneingabe- und Analyse wurde mit SPSS für Windows Version 10.0 durchgeführt. Es wurde die Häufigkeit der Symptome, Diagnosen und allergischer Sensibilisierungen der Bauernkinder im Vergleich zu den Nicht-Bauernkindern durch Anwendung eines  $\chi^2$ - und Fisher- Tests verglichen. Die Endotoxinwerte wurden log transformiert ( $\log_{10}$ ). Es wurden unter Benutzung von SAS (184) multivariate logistische Regressionsanalysen durchgeführt, welche die Endotoxinkonzentration als eine stetige Variable verwendeten. Darüber hinaus wurden die Werte adjustiert für Alter, Geschlecht, Studiengebiet, Familienanamnese von Asthma und Heuschnupfen, Bildungsstand der Eltern und Anzahl der älteren Geschwister (Ausgangsmodell). Zusätzlich wurden potentielle Confounder durch Bauernstatus, „erstes Lebensjahr Exposition zum Bauernhof“, Kontakt zu Hunden oder Katzen während des ersten Lebensjahres und die Allergenkonzentrationen (Der f1, Der p1 und Fel d1 log transformiert) mit ausgewertet. Wir schlossen in unsere Analysen einen Interaktionsfaktor ein, um feststellen zu können, ob der Effekt von Endotoxin auf Asthma und Giemen sich bei Kindern mit und ohne atopischer Sensibilisierung (Radioallergosorbent Test größer als 0,35 kU/L) unterscheidet.

Um mögliche Schwellenwerte oder andere nicht-Linearitäten in der Expositions-Antwort-Reaktion auswerten zu können, wurde unter Verwendung von S-Plus (185) lokal nicht-parametrische Glättungen vorgenommen (186). Das Logit der Symptomwahrscheinlichkeiten

( $\text{logit} = \log \frac{p}{1-p}$ , wobei  $p$  = Symptomwahrscheinlichkeit) wird durch eine kontinuierliche

Funktion der Endotoxinkonzentrationen angepasst, mittels einer nicht-parametrischen Glättung, adjustiert für die erwähnte Kovariate. Die Glättungskonstante für jedes Modell wurde mit Hilfe des Akaike Informations Kriteriums (185) bestimmt. Auf die gleiche Weise wurde auch die Beziehung zwischen dem Endotoxinniveau und der Zytokinantwort ermittelt. Die Zytokinmesswerte wurden log transformiert und deren Beziehung zu den Endotoxinwerten als Verhältnis von den Kovariate-adjustierte geometrische Mittelwerten dargestellt zu einer Zunahme der 25. bis zur 75. Perzentile (= IQR) der Endotoxin Exposition. Die Regressionsanalysen wurden ferner mit einer begrenzten Stichprobe von Nicht-Bauernkindern wiederholt, adjustiert für die bekannten allergievermeidenden Maßnahmen (Weggabe von Haustieren und Entfernung des Teppichs aufgrund von Allergien in der Familie), Kontakt zu Hunden oder Katzen während des ersten Lebensjahres, Aufenthalt in Ställen während des ersten Lebensjahres und der Konsum von Frischmilch während des ersten Lebensjahres.

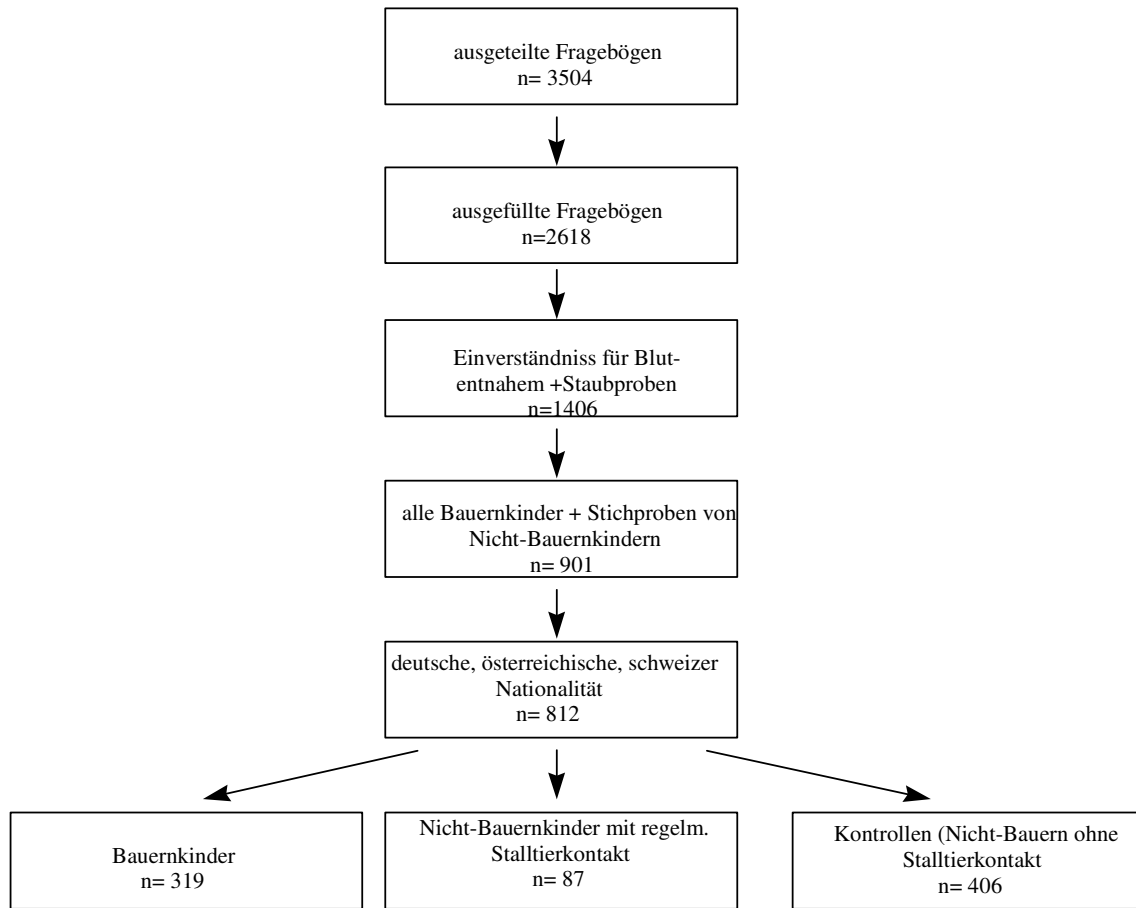
## **8.) Studienteilnahme**

Zu Beginn der Studie baten wir die Eltern von 3504 Schulkindern der Klassen 1-6, einen Fragebogen über respiratorische und allergische Erkrankungen ihrer Kinder zu beantworten, der sowohl ISAAC (international study of asthma and allergies in childhood) Kernfragen (5) als auch Fragen über Umwelteinflüsse beinhaltet. 2618 (75%) dieser Eltern beteiligten sich an der Befragung und wurden daraufhin gebeten, ihr Einverständnis zu weiteren Untersuchungen zu geben, welche die Messung von spezifischem IgE (RAST) im Serum und die Sammlung von Staubproben beinhaltet. 1406 (54%) von diesen 2618 Familien erteilten dazu ihre Erlaubnis. Daraufhin wurden alle Kinder aus Bauernfamilien und zufällige Stichproben von Nicht-Bauernkindern aus derselben ländlichen Gegend eingeladen, an der Studie teilzunehmen (n=901). Schließlich beschränkten wir unsere Analysen auf in Österreich, Deutschland oder der Schweiz geborene Kinder, deren Eltern Staatsbürger einer dieser Nationen waren, um ethnische Confounding-Faktoren zu vermeiden (n=812).

Vollständige Daten waren von 812 Kindern vorhanden. Diese Gruppe (von Kindern) setzte sich aus 319 Bauernkindern und 493 Kindern aus Nicht-Bauernfamilien zusammen. 87 der 493 Nicht-Bauernkinder hatten regelmäßigen Stalltierkontakt. Zu den Bauernkindern wurden gleich viele „Kontroll-Kinder“ ohne Stalltierkontakt ausgewählt, die gleiches Alter und Geschlecht hatten. Das Durchschnittsalter betrug  $9,46 \pm 1,16$  (SD) Jahre. Die adjustierten odds ratios für Asthma- und Heuschnupfensymptome in Bezug auf den Bauernstatus unterschieden sich nicht signifikant von der Untergruppe der 812 Kinder mit vollständigen Daten und Zustimmung für weitere Untersuchungen und denen, die nur den Fragebogen beantworteten (0,59 vs. 0,48; und 0,44 vs. 0,32). Die im Text beschriebenen Responseraten der Studienteilnahme sind zusätzlich in Abbildung 6 dargestellt.



Abbildung 6) Studienbeteiligung/Responseraten



## 9.) Resultate

### 9.1.1) Endotoxinwerte Bauern versus Nicht-Bauern

In Abbildung 7 sind die Endotoxinwerte in der Matratze und am Boden von Bauern- und Nicht-Bauern-Familien dargestellt. Man sieht deutlich die signifikant höhere Endotoxinbelastung bei den Bauernfamilien im Vergleich zu den Nicht-Bauern-Familien.

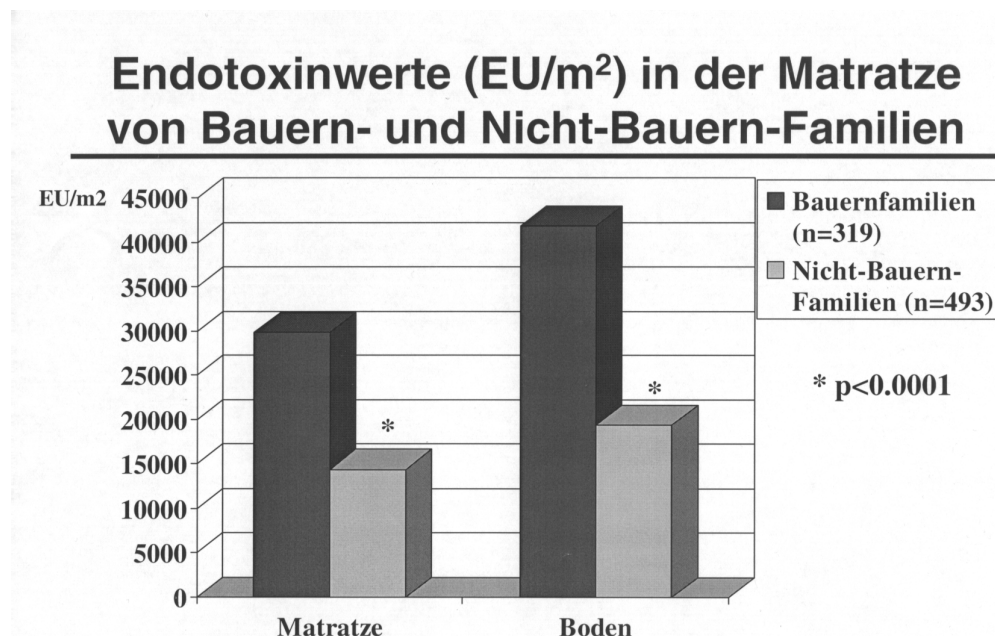


Abbildung 7

### 9.1.2) Auswirkung der Endotoxinexposition auf die Gesundheit

Die Ergebnisse der multivariaten Regressionsanalysen, welche die Auswirkung der Matratzenstaub-Endotoxinkonzentration (EU/mg Staub) auf das Auftreten von Krankheitssymptomen und Krankheitshäufigkeit beurteilen, sind in Tabelle 3 dargestellt. Die adjustierten Odds Ratios sind für eine Endotoxinzunahme von der 25. bis zur 75. Perzentile berechnet. Die Modelle wurden adjustiert für Alter, Geschlecht, Studienregion, Familienanamnese von Asthma und Heuschnupfen, Bildungsstand der Eltern und Zahl der älteren Geschwister. Die Höhe der sich im Umlauf befindenden Endotoxinexposition zeigte dabei eine starke, inverse Assoziation mit atopischem Asthma, Heuschnupfen, Heuschnupfensymptomen und atopischer Sensibilisierung.

*p<=0,05	Gesamtzahl Kinder (n= 821)		nicht-Bauernkinder (n=493)	
Atopische Zielparameter	Endotoxin Konzentration EU/mg	Endotoxinbelastung EU/m <sup>2</sup>	Endotoxin Konzentration EU/mg	Endotoxinbelastung EU/m <sup>2</sup>
	OR (95% KI)	OR (95% KI)	OR (95% KI)	OR (95% KI)
Heuschnupfen	0,58 (0,39-0,85)*	0,53 (0,35-0,81)*	0,79 (0,52-1,19)	0,56 (0,33-0,95)*
Juckende und tränende Augen im letzten Jahr	0,61 (0,43-0,86)*	0,50 (0,34-0,72)*	0,70 (0,47-1,05)	0,46 (0,28-0,76)
Atopische Sensibilisierung (SX1>3,5 kU/L)	0,78 (0,60-1,01)	0,76 (0,58-0,98)*	0,80 (0,59-1,08)	0,73 (0,51-1,04)
Atopisches Asthma	0,73 (0,44-1,19)	0,48 (0,28-0,81)*	0,68 (0,39-1,19)	0,52 (0,25-1,07)
Nicht-atopisches Asthma	1,25 (0,62-2,51)	1,13 (0,57-2,26)	1,29 (0,62-2,68)	1,00 (0,46-2,21)
Atopisches Giemen	0,89 (0,57-1,39)	0,62 (0,39-0,99)*	0,79 (0,46-1,33)	0,64 (0,33-1,25)
Nicht-atopisches Giemen	0,97 (0,58-1,61)	1,14 (0,68-1,90)	1,36 (0,86-2,14)	1,82 (1,04-3,18)*

Tabelle 3

In Abbildung 8 a-g sind die geglätteten Graphen der adjustierten Prävalenz von Heuschnupfen, Heuschnupfensymptomen, atopischer Sensibilisierung, atopischem Asthma, nicht-atopischem Asthma, atopischem Giemen und nicht-atopischem Giemen versus der Höhe der Endotoxinexposition dargestellt. Die Prävalenz von Heuschnupfen, Heuschnupfensymptomen, atopischer Sensibilisierung, atopischem Asthma und atopischem Giemen zeigte eine monotone Abnahme mit steigender Endotoxinbelastung. Hingegen nahm mit steigender Endotoxinbelastung die Prävalenz für nicht-atopisches Asthma und nicht-atopisches Giemen zu.

Abbildung 8a) Prävalenz Heuschnupfen versus Endotoxinkonzentration in der Matratze

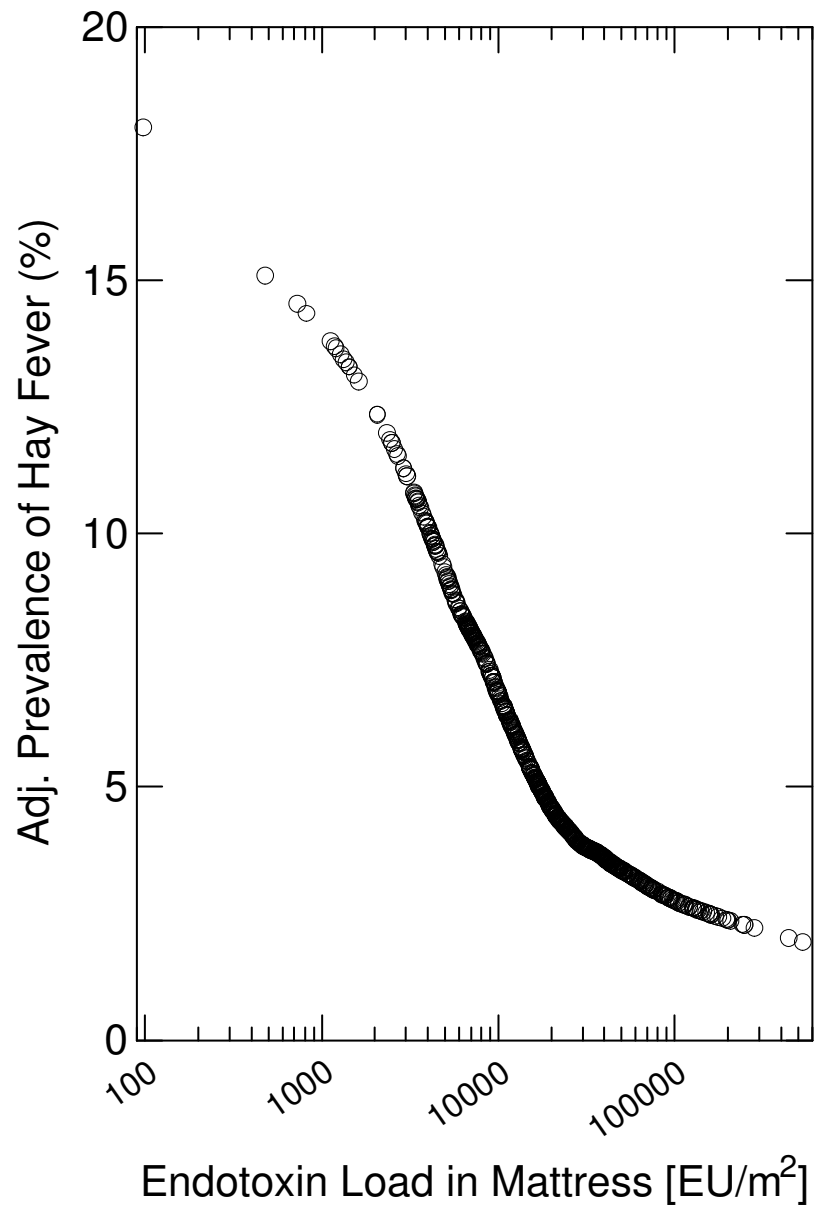


Abbildung 8b) Heuschnupfensymptome versus Endotoxinkonzentration in der Matratze

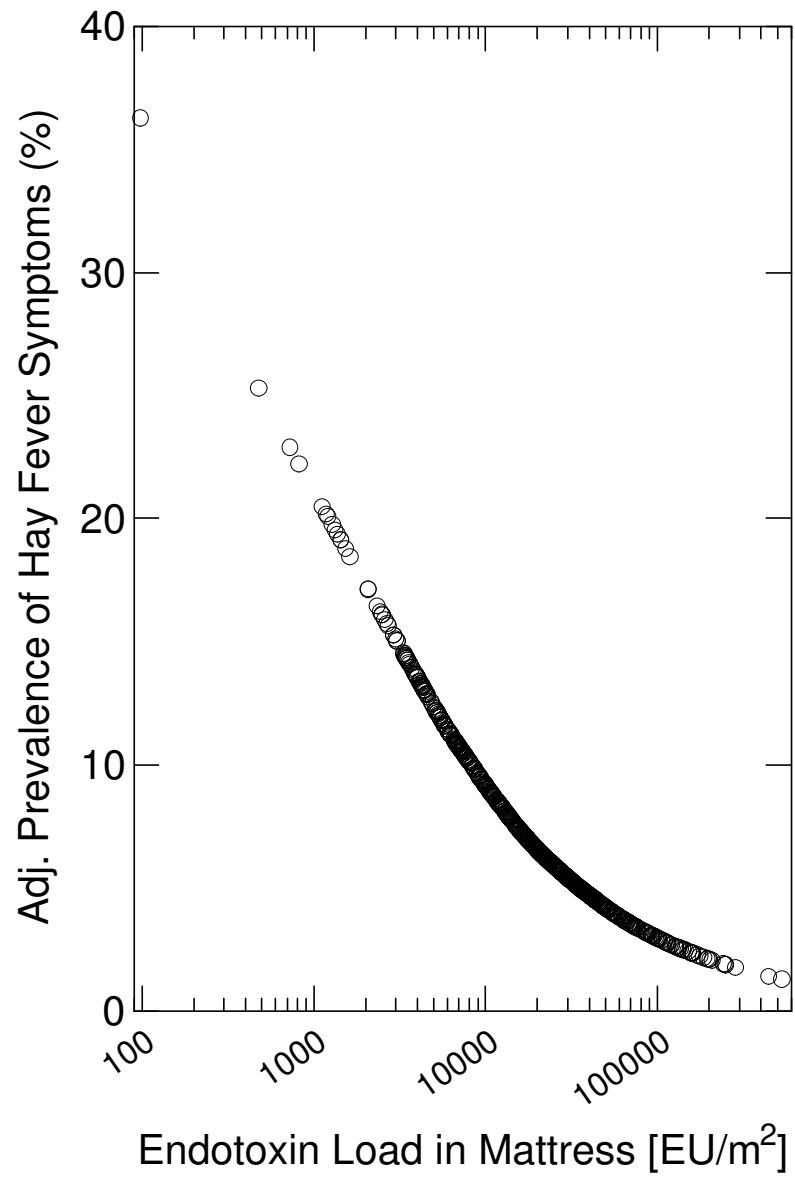


Abbildung 8c) Atopische Sensibilisierung versus Endotoxinkonzentration in der Matratze

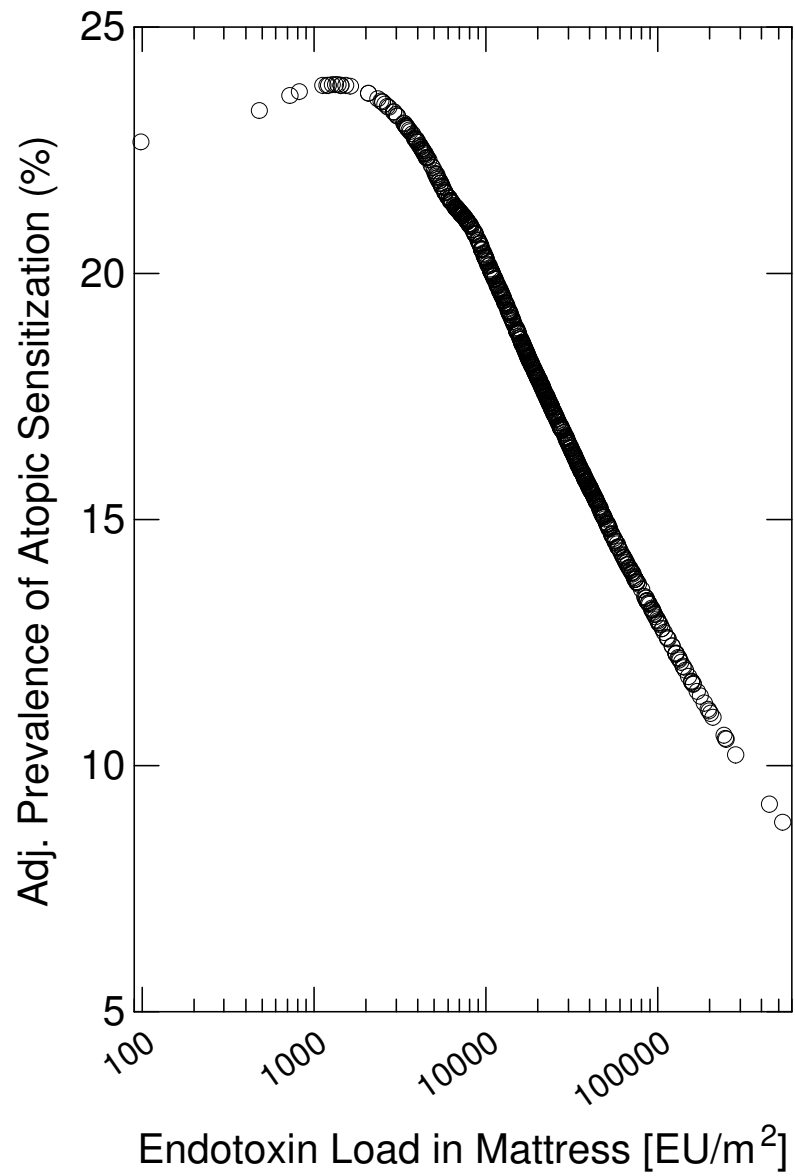


Abbildung 8d) Atopisches Asthma versus Endotoxinkonzentration in der Matratze

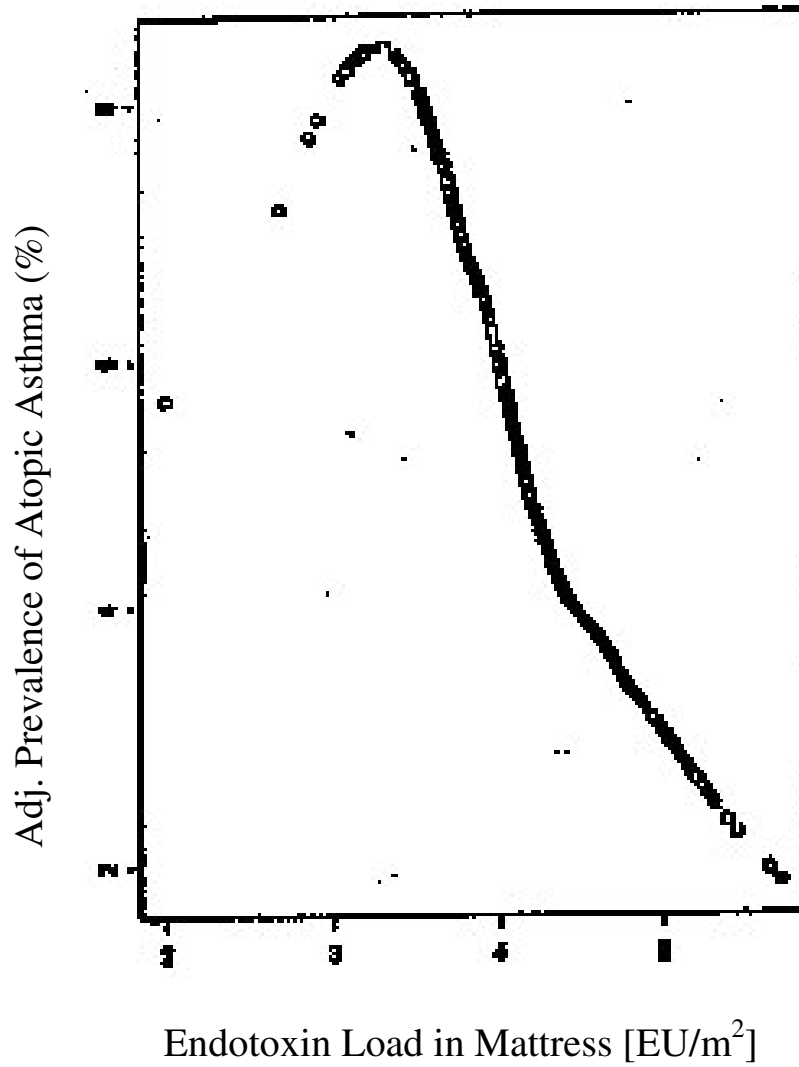
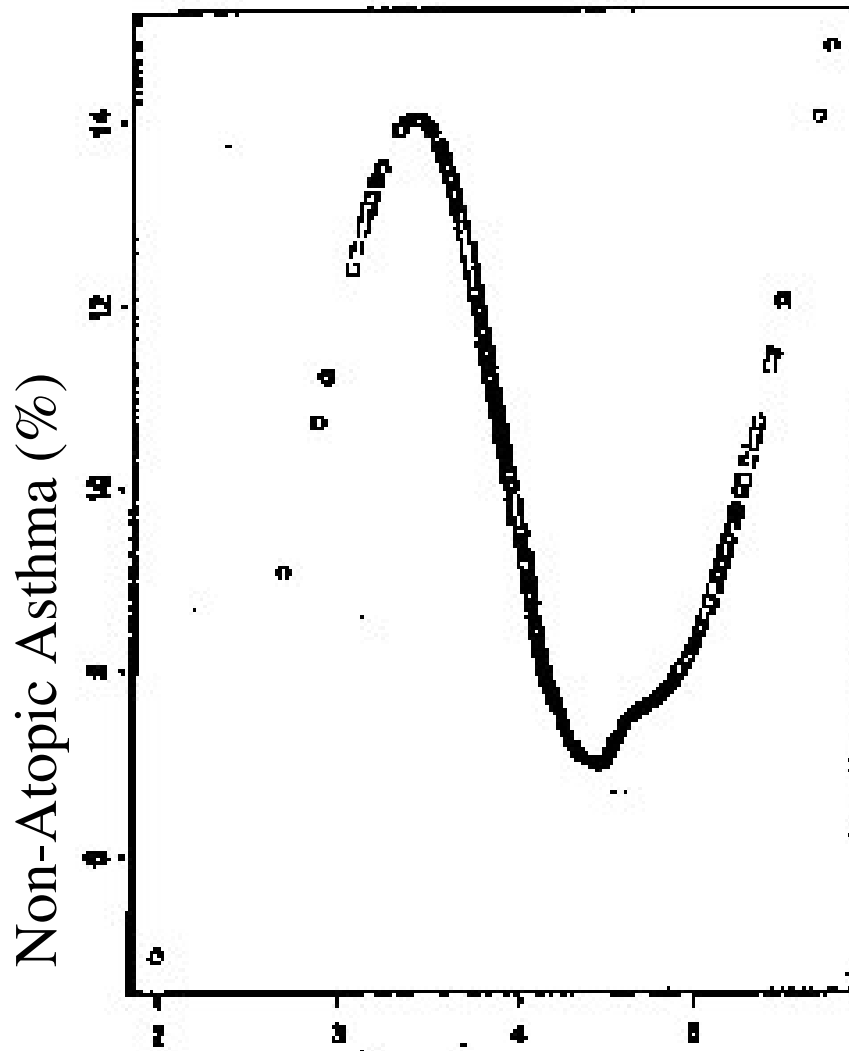


Abbildung 8e) Nicht-atopisches Asthma versus Endotoxinkonzentration in der Matratze.



Endotoxin Load in Mattress [EU/m<sup>2</sup>]



Abbildung 8f) Atopisches Giemen versus Endotoxinkonzentration in der Matratze

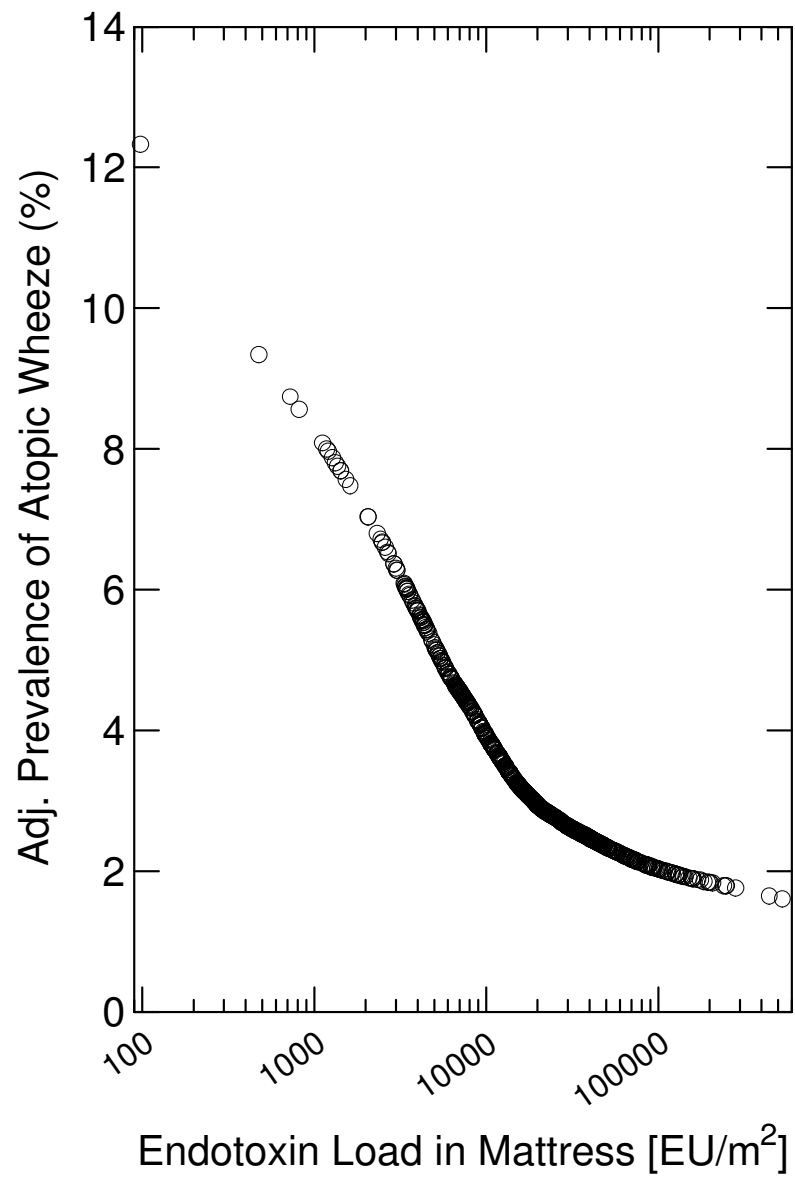
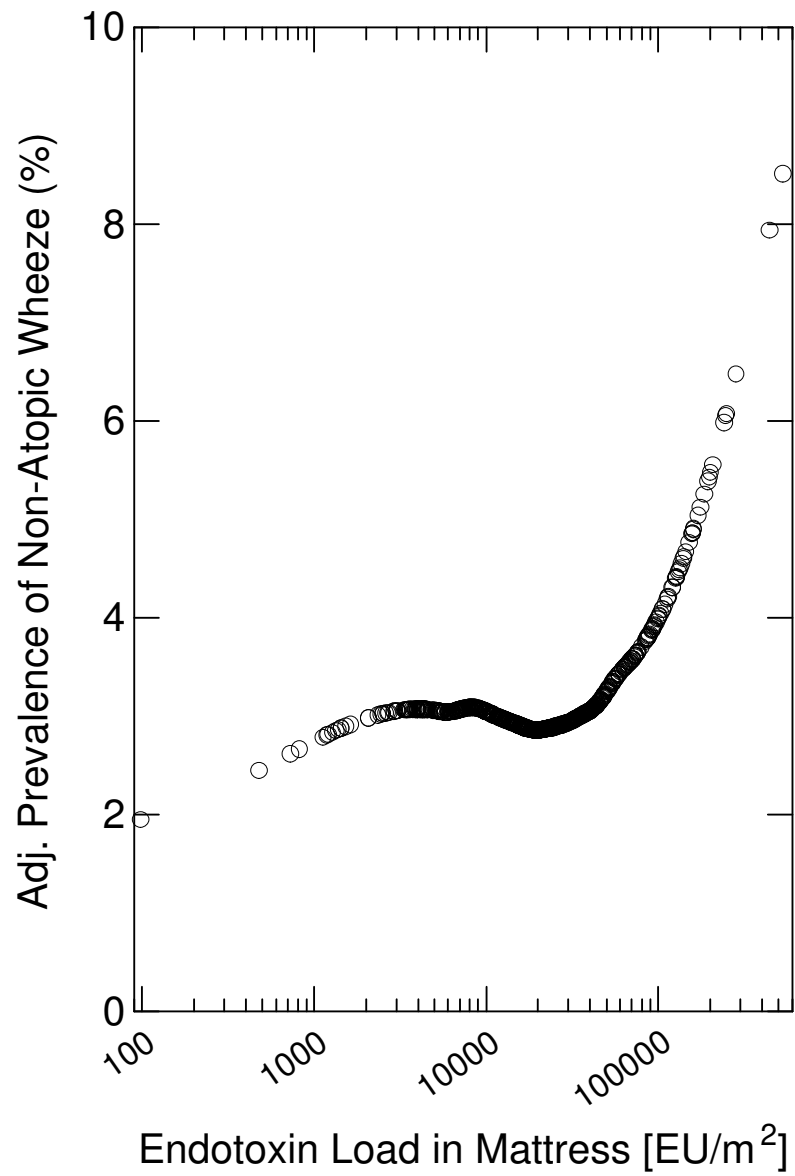


Abbildung 8g) Nicht-atopisches Giemen versus Endotoxinkonzentration in der Matratze



### **9.1.3) Ergebnisse atopischer Zielvariablen versus „Bauernsein“**

Die Prävalenz von Asthma und Heuschnupfensymptomen war bei den Bauernkindern signifikant niedriger als bei den Kindern einer Nicht-Bauernfamilie (adjustierte Odds Ratio 0,30 95% CI 0,15-0,61; und 0,43, 0,24-0,77). Die Häufigkeit des atopischen Ekzems zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Kinder, die auf einem Bauernhof lebten, zeigten eine signifikant geringere Wahrscheinlichkeit, Atopiker zu sein als Nicht-Bauernkinder (0,61; 0,41-0,92). Der Unterschied zwischen der Bauern und der Nicht-Bauerngruppe war für die Sensibilisierung gegenüber Graspollen am ausgeprägtesten (0,46; 0,28-0,74). Es zeigte sich, dass ein größerer Anteil der Kinder von Bauernfamilien eine Sensibilisierung gegenüber Allergenen des Bauernhofes aufwiesen als die Kinder von Nicht-Bauernfamilien, jedoch war der Sensibilisierungsgrad niedrig: Kuhepithel 2% (6/319) vs 0,4% (2/493); Vorratsmilben 3% (8) vs 0,2% (1). Die Häufigkeit der allergischen Sensibilisierung gegenüber Eiweiß und Milch war auch niedrig und zeigte keine Unterschiede zwischen der Bauern und nicht-Bauerngruppe (0,3% vs [1/319] 0% [0/492], für beide Nahrungsmittelallergene). In Tabelle 4 a sind die Prävalenzen atopischer Zielvariablen dargestellt, geschichtet nach Bauernstatus (Bauernkinder/ Nicht-Bauernkinder).

Tabelle 4 b zeigt die Prävalenzen der atopischen Zielp Parameter geschichtet nach Bauernstatus (Bauernkinder/ Nicht-Bauernkinder) und die Odds Ratios mit dazugehörigem Konfidenzintervall (95%).

Atopische Zielparameter	Bauernkinder n = 319				Nicht – Bauernkinder n = 493				p – Wert
	n	Prozent	5. bis 95. Perzentile		n	Prozent	5. bis 95. Perzentile		
Heuschnupfen	13	4,1	1,9	6,2	52	10,6	7,8	13,5	< 0,001
Juckende und tränende Augen im letzten Jahr	19	6,0	3,3	8,7	62	12,8	9,7	16,0	0,0017
Atopische Sensibilisierung (SX 1 $\geq$ 3,5 kU / L)	55	17,2	13,1	21,4	116	23,5	19,8	27,3	0,032
Atopisches Asthma	10	3,1	1,2	5,0	29	5,9	3,8	8,0	0,074
Nicht – Atopisches Asthma	5	1,6	0,2	2,9	13	2,6	1,2	5,0	0,312
Atopisches Giemen	15	4,7	2,4	7,0	29	5,9	3,8	8,0	0,468
Nicht – Atopisches Giemen	5	1,6	0,2	2,9	30	6,1	4,0	8,2	0,002

**Tabelle 4 a**

**Tabelle 4 b**

Atopische Zielparameter	Bauernkinder		Nicht-Bauernkinder		Odds Ratio	95% KI
	%	n / N	%	n / N		
Heuschnupfen	4,1	13/319	10,6	52/489	0,357	0,191-0,667
Juckende und tränende Augen im letzten Jahr	6,0	19/317	12,8	62/483	0,432	0,254-0,739
Atopische Sensibilisierung	17,2	55/319	23,5	116/493	0,677	0,474-0,968
Atopisches Asthma	3,8	10/262	7,2	29/402	0,510	0,244-1,066
Nicht-Atopisches Asthma	1,9	5/262	3,2	13/402	0,582	0,205-1,653
Atopisches Giemen	4,7	15/317	6,0	29/482	0,776	0,409-1,472
Nicht-Atopisches Giemen	1,6	5/317	6,2	30/482	0,242	0,093-0,629

### 9.1.4) Einfluß von Rohmilchkonsum/ Stallkontakt im 1.Lebensjahr

In Tabelle 5 ist die Auswirkung von Stallkontakt und Rohmilchkonsum im 1.Lebensjahr auf die Häufigkeit und das Risiko von Asthma, Heuschnupfen und atopischer Sensibilisierung dargestellt. Ein stark protektiver Effekt gegenüber der Entwicklung von Asthma, Heuschnupfen und atopischer Sensibilisierung konnte nur bei Kindern gefunden werden, die im 1.Lebensjahr gegenüber Ställen, Rohmilch oder beidem ausgesetzt waren. Diese protektiven Faktoren scheinen sich in ihren schützenden Eigenschaften zu addieren, da die niedrigsten Krankheitshäufigkeiten bei den Kindern zu finden waren, die in ihrem 1.Lebensjahr beiden Faktoren ausgesetzt waren.

**Tabelle 5)** Häufigkeit und Risiko (adjustierte\* Odds Ratios, 95% KI) für Asthma, Heuschnupfen und atopische Sensibilisierung in Relation zur Exposition gegenüber Ställen und Rohmilchkonsum im 1.Lebensjahr.

	Stallkontakt und Milch im 1.Lebensjahr (n=218)	Stallkontakt aber keine Milch im 1.Lebensjahr (n=48)	Milch aber keinen Stallkontakt im 1.Lebensjahr (n=189)	Stallkontakt, Milch , oder beides nach dem 1.Lebensjahr (n=138)	Weder Stallkontakt noch Milchexposition
Diagnose Asthma	1% (3) 0,14 (0,04-0,48)	6% (3) 0,51 (0,14-1,86)	6% (11) 0,48 (0,21-1,1)	11% (15) 0,88 (0,42-1,86)	12% (20) Referenz
Mindestens 1 Anfall von Giemen in letzten 12 Monaten	3% (6) 0,17 (0,07-0,45)	6% (3) 0,43 (0,12-1,52)	6% (12) 0,43 (0,20-0,92)	9% (12) 0,60 (0,28-1,28)	15% (20) Referenz
Heuschnupfen	3% (7) 0,20 (0,08-0,50)	4% (2) 0,25 (0,05-1,13)	4% (8) 0,24 (0,10-0,56)	13% (18) 0,88 (0,44-1,74)	16% (27) Referenz
laufende Nase und juckende Augen in letzten 12 Monaten	5% (11) 0,27 (0,13-0,57)	8% (4) 0,44 (0,14-1,37)	7% (14) 0,42 (0,21-0,86)	12% (16) 0,65 (0,33-1,30)	20% (34) Referenz
Atopische Sensibilisierung	12% (27) 0,32 (0,17-0,62)	21% (10) 0,56 (0,25-1,27)	15% (29) 0,43 (0,24-0,77)	29% (40) 0,99 (0,58-1,69)	33% (56) Referenz

\*Adjustiert für Alter, Geschlecht, Bildungsstand der Eltern, Familienanamnese von Asthma und Heuschnupfen, Anzahl der älteren Geschwister und Bauernstatus. Als atopische Sensibilisierung wurde definiert: Jede Reaktion auf ein inhalatives Allergen (Hausstaub- und Vorratsmilben, Katzenhaare, Gras- und Birkenpollen, Kuhepithel) von  $\geq 3,5$  kU/L.

### **9.1.5) Einfluss der Stallexposition/ Rohmilchkonsum adjustiert für Endotoxinexposition**

Tabelle 6 zeigt die adjustierten Odds Ratios<sup>(1)</sup> der Beziehung zwischen der gegenwärtigen Endotoxinexposition und Symptom- und Erkrankungsprävalenz, zusätzlich adjustiert für den Faktor „Exposition zum Bauernhof im 1. Lebensjahr“. Interessanterweise zeigte die Bauernhofexposition im 1. Lebensjahr + Rohmilchkonsum, unabhängig von der gegenwärtigen Endotoxinexposition, einen starken inversen Zusammenhang zu allen atopischen Zielparametern und auch für das nicht-atopische Asthma.

Tabelle 6

Atopische Zielparameter	Exposition zu Bauernhof im 1. Lebensjahr <sup>(2)</sup> + Rohmilchkonsum OR (95% KI)	Endotoxinexposition in EU/m <sup>2</sup> <sup>(3)</sup> OR (95% KI)
Heuschnupfen	0,26* (0,13-0,52)	0,61* (0,40-0,95)
Niesen und juckende Augen im letzten Jahr	0,55* (0,31-0,97)	0,53* (0,36-0,77)
Atopische Sensibilisierung (SX1 $\geq$ 3,5 kU/L)	0,45* (0,30-0,68)	0,83 (0,63-1,09)
Atopisches Asthma	0,42* (0,18-0,96)	0,52* (0,30-0,90)
Nicht-atopisches Asthma	0,48 (0,16-1,419)	1,22 (0,60-2,46)
Nicht-atopisches Giemen	0,43 (0,19-0,97)	1,23 (0,73-2,06)

(1) Modelle wurden adjustiert für Alter, Geschlecht, Studienregion, Familienanamnese für Asthma und Heuschnupfen, Bildungsstand der Eltern und Anzahl der älteren Geschwister. Odds Ratios sind angegeben für eine Zunahme von der 25. zur 75. Perzentile der Endotoxinlevel.

(2) Adjustiert für gegenwärtige Endotoxinexposition.

Adjustiert für Bauernhofexposition im 1.Lebensjahr. \* $p \leq 0,05$

## **9.2) Zytokine**

### **9.2.1) Zytokinkonzentration nach Zellstimulation: Bauern Versus Nicht-Bauern**

In Tabelle 7 sind die Mediane und Interquartilen Ranges der einzelnen Zytokine der Bauernkinder denen der Nicht-Bauernkinder nach 24 stündiger LPS Stimulation gegenübergestellt. Es zeigt sich, daß die Leukozyten der Bauernkinder im Vergleich zu denen der Nicht-Bauernkindern signifikant weniger IFN- $\gamma$  und hochsignifikant weniger TNF- $\alpha$  produzieren. Da die IL-5 Meßwerte sehr oft unterhalb der Nachweisgrenze lagen, konnte eine vernünftige Auswertung der IL-5 Konzentrationen nicht vorgenommen werden.

**Tabelle 7)** Zytokinproduktion Bauernkinder versus Nicht-Bauernkinder nach 24h LPS-Stimulation (\*: $p \leq 0,05$ , \*\*: $p \leq 0,01$ ).

	<b>Bauern</b>			<b>Nicht-Bauern</b>		
	n	Median	IQR	n	Median	IQR
IFN- $\gamma$	273	268,9*	438,7	446	315,7*	550,0
IL-10	276	73,4	98,1	447	73,5	85,4
IL-12	179	17,8	19,4	326	17,2	28,5
TNF- $\alpha$	277	600,0**	525,5	444	679,2**	627,1

In Abbildung 9 a-d ist die bereits in Tabelle 7 beschriebene Zytokinproduktion nach LPS-Stimulation und diesmal auch die Ergebnisse der SEB-Stimulation der Bauernkinder versus



der Nicht-Bauernkinder von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 und IL-10 in pg/ml dargestellt, standardisiert auf  $10^9$  Lymphozyten/Liter; abgebildet ist der interquartile Range. Um eine Signifikanz der Unterschiede der Zytokinproduktion der Bauern und der Nicht-Bauern nachweisen zu können, wurde ein Wilcoxon Test angewandt. Nach 24-stündiger LPS (SEB 72h)-Stimulation waren die dargestellten Zytokinkonzentrationen messbar. Im Gegensatz dazu konnte weder nach 24h noch nach 72h in der Kontrolle mit Medium ohne Stimulans eine nachweisbare Zytokinproduktion gemessen werden.

Entgegen unserer Thesen zeigten die Stimulationen unerwartet andere Ergebnisse. Nach LPS-Stimulation produzierten die Zellen der Bauernkinder signifikant ( $p < 0,05$ ) weniger IFN- $\gamma$  als die Nicht-Bauern. Die IFN- $\gamma$  Produktion wies hingegen nach SEB Stimulation keinen signifikanten Unterschied zwischen Bauern und Nicht-Bauern auf. Ferner produzierten die Bauernkinder nach LPS Stimulation hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) weniger TNF- $\alpha$  als die Nicht-Bauernkinder. Die TNF- $\alpha$  Meßwerte nach SEB Stimulation wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Bauern und Nicht-Bauern auf. Im Gegensatz zu der signifikant verminderten IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  Produktion der Bauern auf LPS Stimulation konnte bei IL-10 und IL-12 nach LPS und SEB Stimulation kein signifikanter Unterschied zwischen den Bauern und Nicht-Bauern gefunden werden.

Abbildung 9a) IFN- $\gamma$  Produktion der PBMCs Bauernkinder versus Nicht-Bauernkinder nach LPS-Stimulation (24h) und SEB-Stimulation (72h).

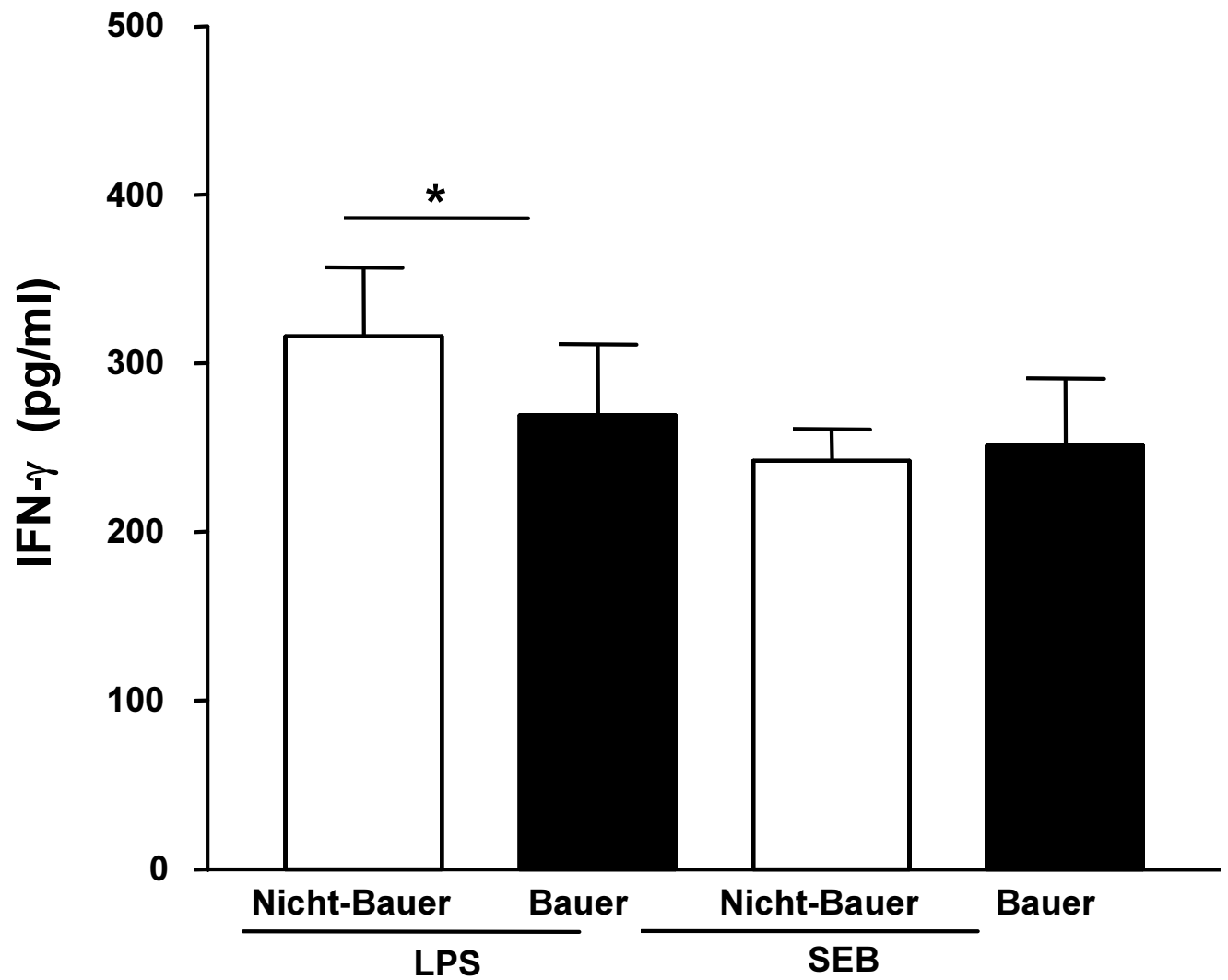
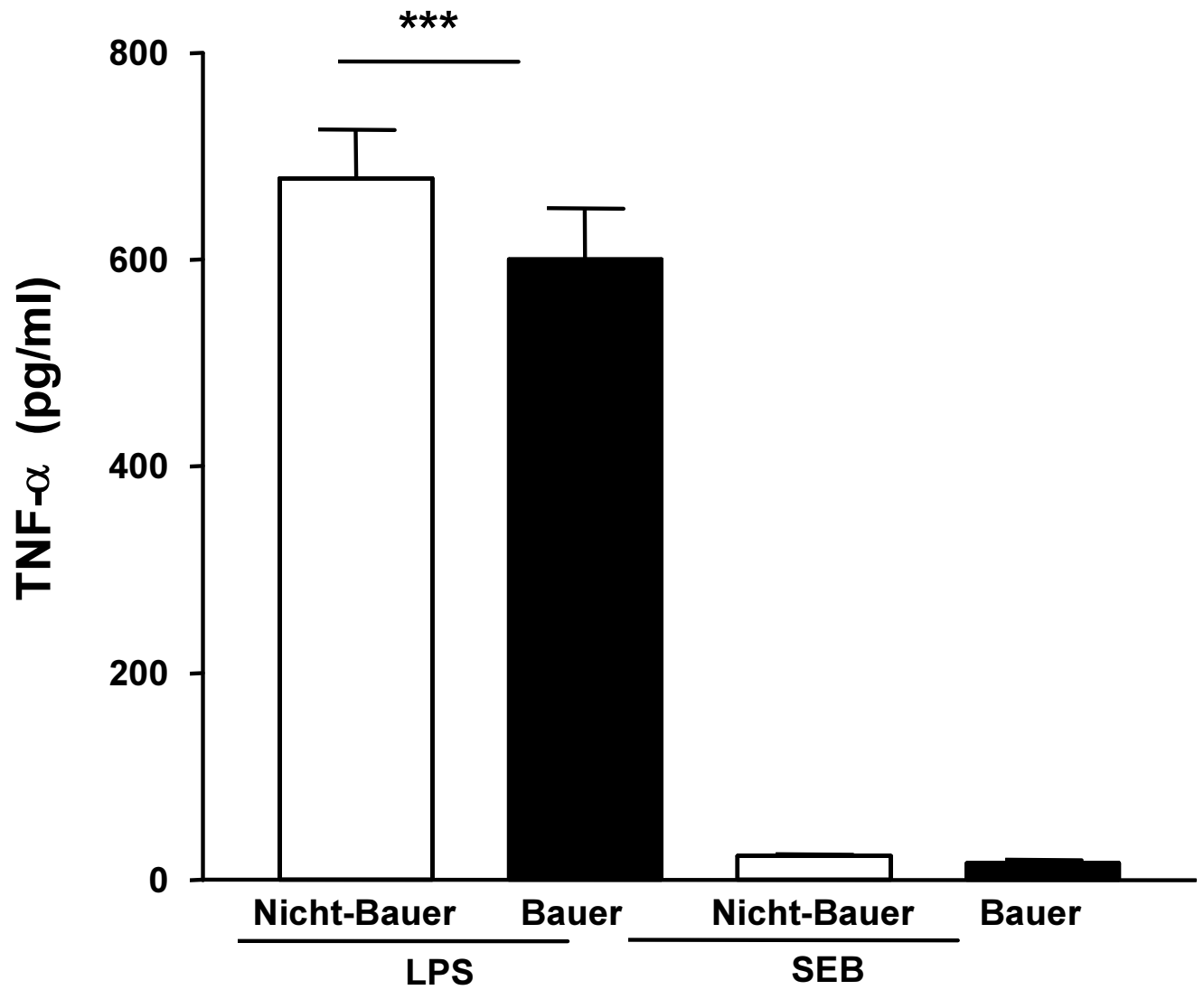
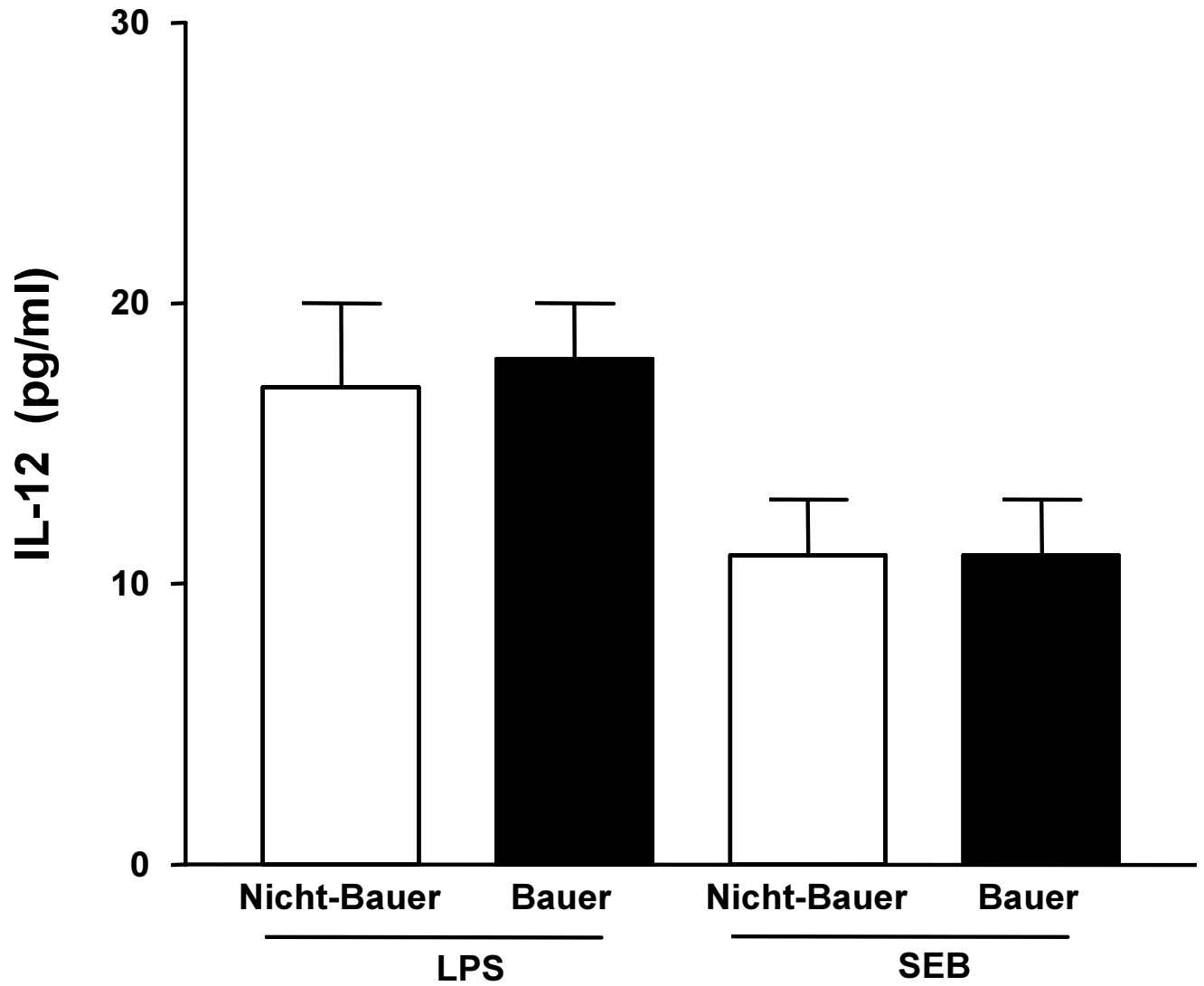


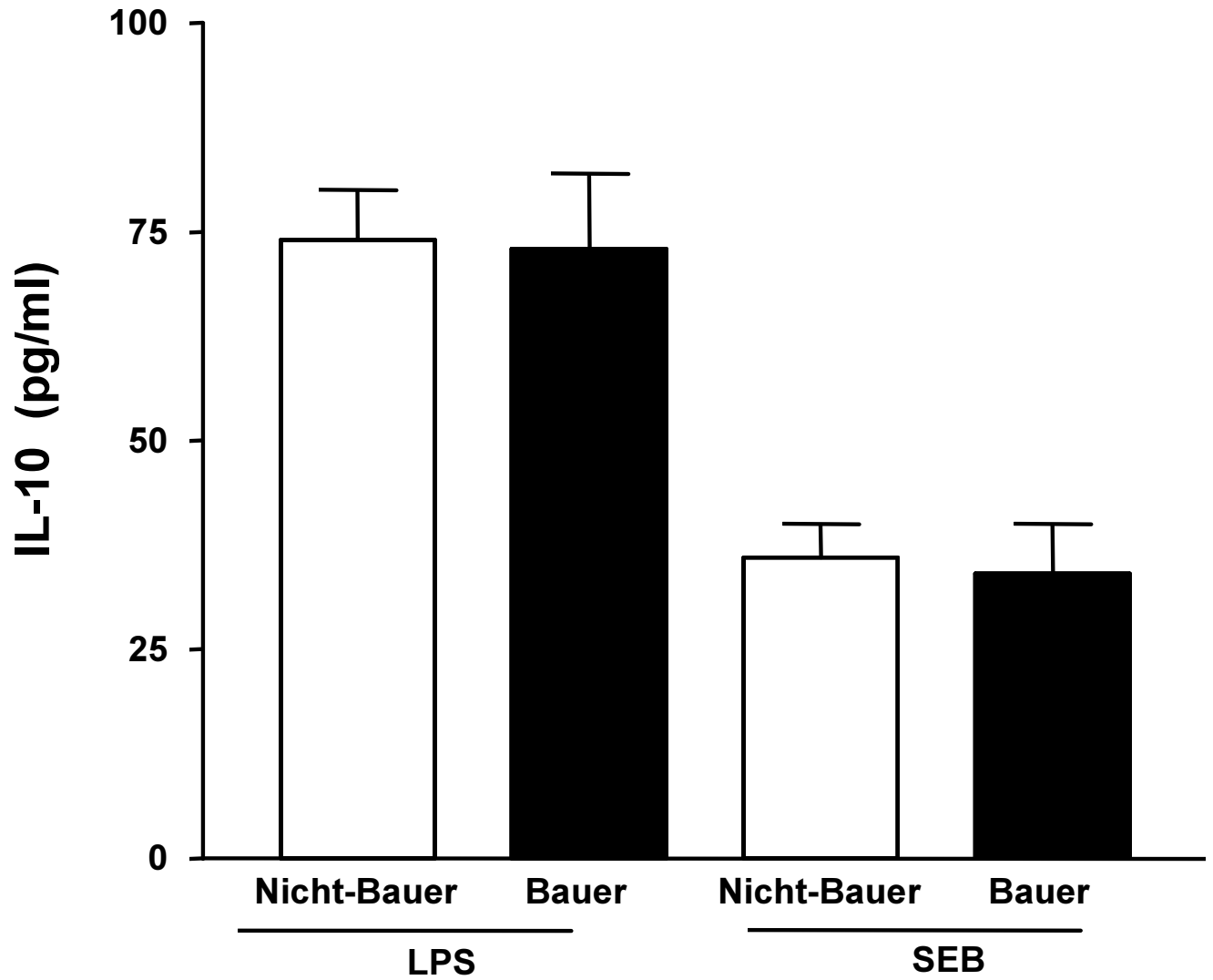
Abbildung 9b) TNF- $\alpha$  Produktion der PBMCs Bauernkinder versus Nicht-Bauernkinder nach LPS-Stimulation (24h) und SEB-Stimulation (72h).



**Abbildung 9e)** IL-12 Produktion der PBMCs Bauernkinder versus Nicht-Bauernkinder nach LPS-Stimulation (24h) und SEB-Stimulation (72h).



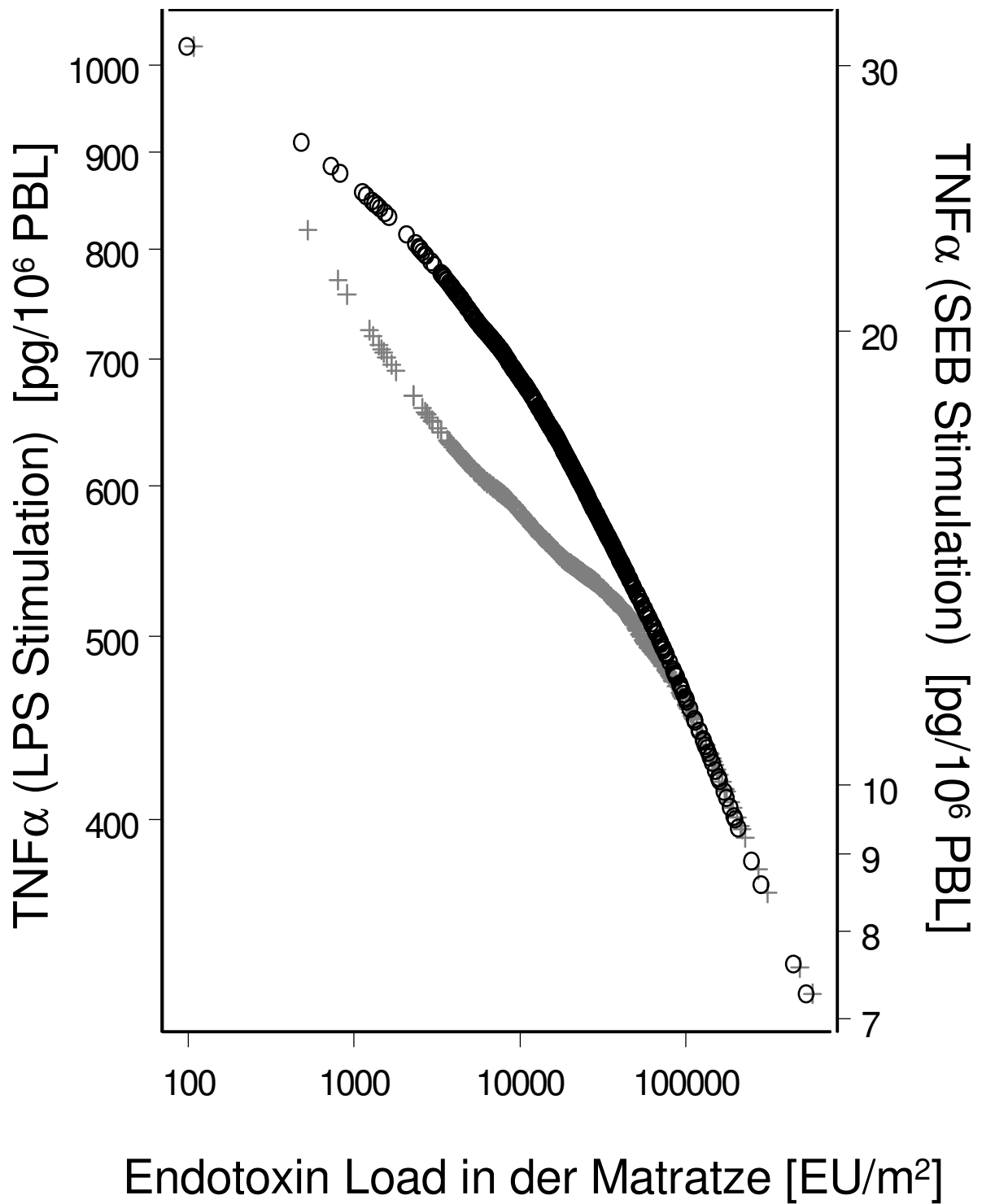
**Abbildung 9d)** IL-10 Produktion der PBMCs Bauernkinder versus Nicht-Bauernkinder nach LPS-Stimulation (24h) und SEB-Stimulation (72h).



### **9.2.2) Endotoxinkonzentration versus Zytokinproduktion**

Es zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen der Höhe der Endotoxinexposition und der Kapazität der peripheren Blutleukozyten inflammatorische und regulatorische Zytokine nach Lipopolisaccharidstimulation (LPS) zu produzieren (Abbildung 10 a-d). Die Beziehung zwischen der Endotoxinexposition ( $\text{EU}/\text{m}^2$ ) und  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$ , IL-10 und IL-12, ausgedrückt als means ratio, betrug 0,81 (95% CI; 0,74-0,89), 0,80 (95% CI; 0,70-0,92), 0,93 (95% CI; 0,81-1,07) und 0,87 (95% CI; 0,77-0,98). Die korrespondierenden Ergebnisse für Stimulation mit Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) waren 1,05 (0,95-1,17), 0,97 (0,84-1,11), 0,96 (0,86-1,06) und 0,83 (0,74-0,93). Abbildung 9 zeigt die Kapazität  $\text{TNF-}\alpha$  (9 a),  $\text{IFN-}\gamma$  (9 b), IL-12 (9 c), und IL-10 (9 d) zu produzieren ( $\text{pg}/10^6$  PBL= peripheral blood leukocytes) nach LPS bzw. SEB Stimulation, geglättet gegen log Endotoxin Load der Matratze ( $\text{EU}/\text{m}^2$ ), kontrolliert für Alter, Geschlecht, Studienregion, Familiengeschichte des Asthma und Heuschnupfen, Bildungsstand der Eltern und Anzahl der Geschwister. Es wurde ein Glättungsparameter von 0,9 für alle 4 Grafiken benutzt.

Abbildung 10 a) Kapazität TNF- $\alpha$  nach LPS-Stimulation zu produzieren (pg/  $10^6$  periphere Blutleukozyten) geglättet gegen die log Endotoxin Load der Matratze ( $\text{EU}/\text{m}^2$ ). Schwarz LPS, Grau SEB.



**Abbildung 10 b)** Kapazität IFN- $\gamma$  nach LPS-Stimulation zu produzieren (pg/  $10^6$  periphere Blutleukozyten) geglättet gegen die log Endotoxin Load der Matratze ( $\text{EU}/\text{m}^2$ ). Schwarz LPS, Grau SEB.

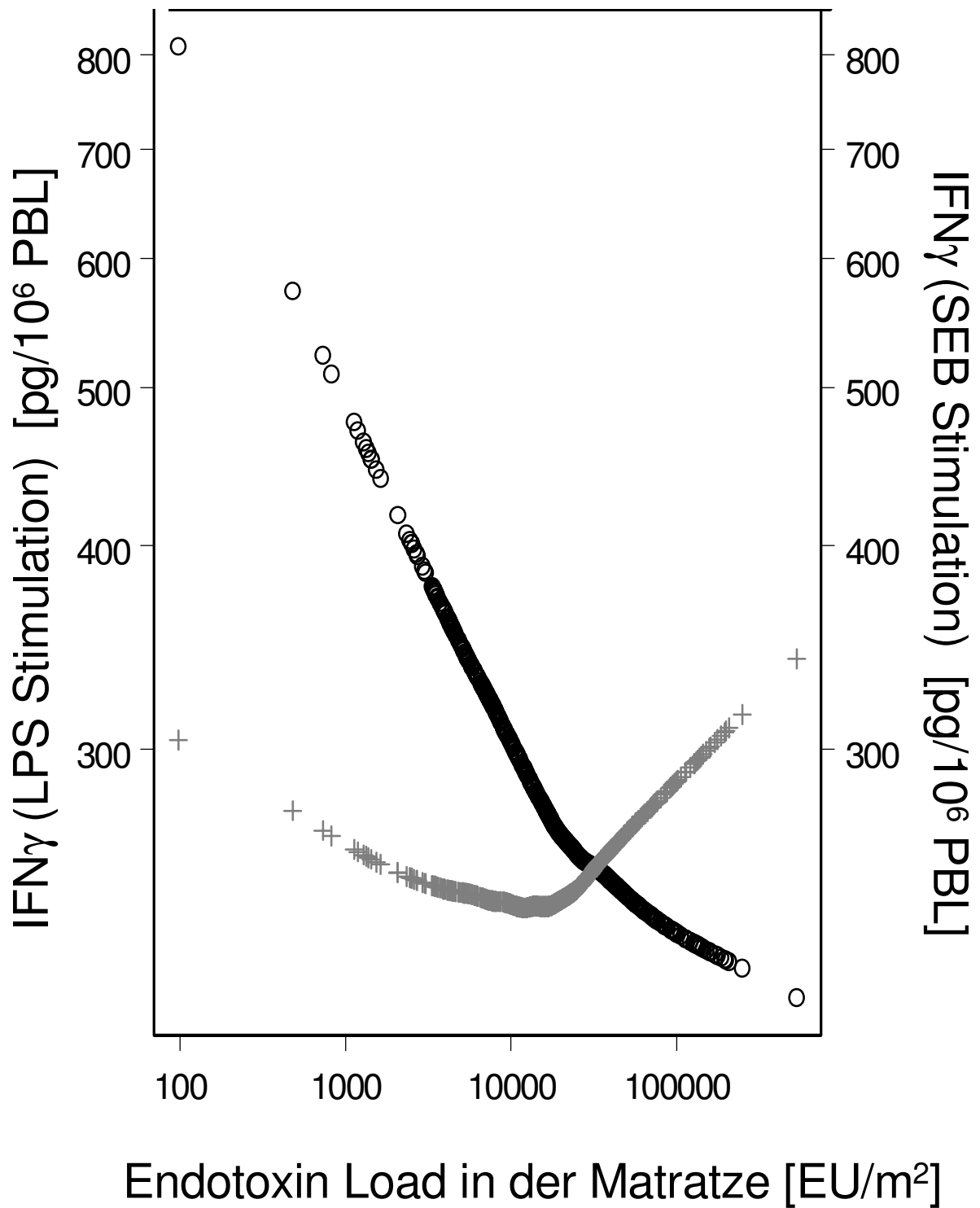




Abbildung 10 c) Kapazität IL-12 nach LPS-Stimulation zu produzieren (pg/ 10<sup>6</sup> periphere Blutleukozyten) geglättet gegen die log Endotoxin Load der Matratze (EU/m<sup>2</sup>). Schwarz LPS, Grau SEB.

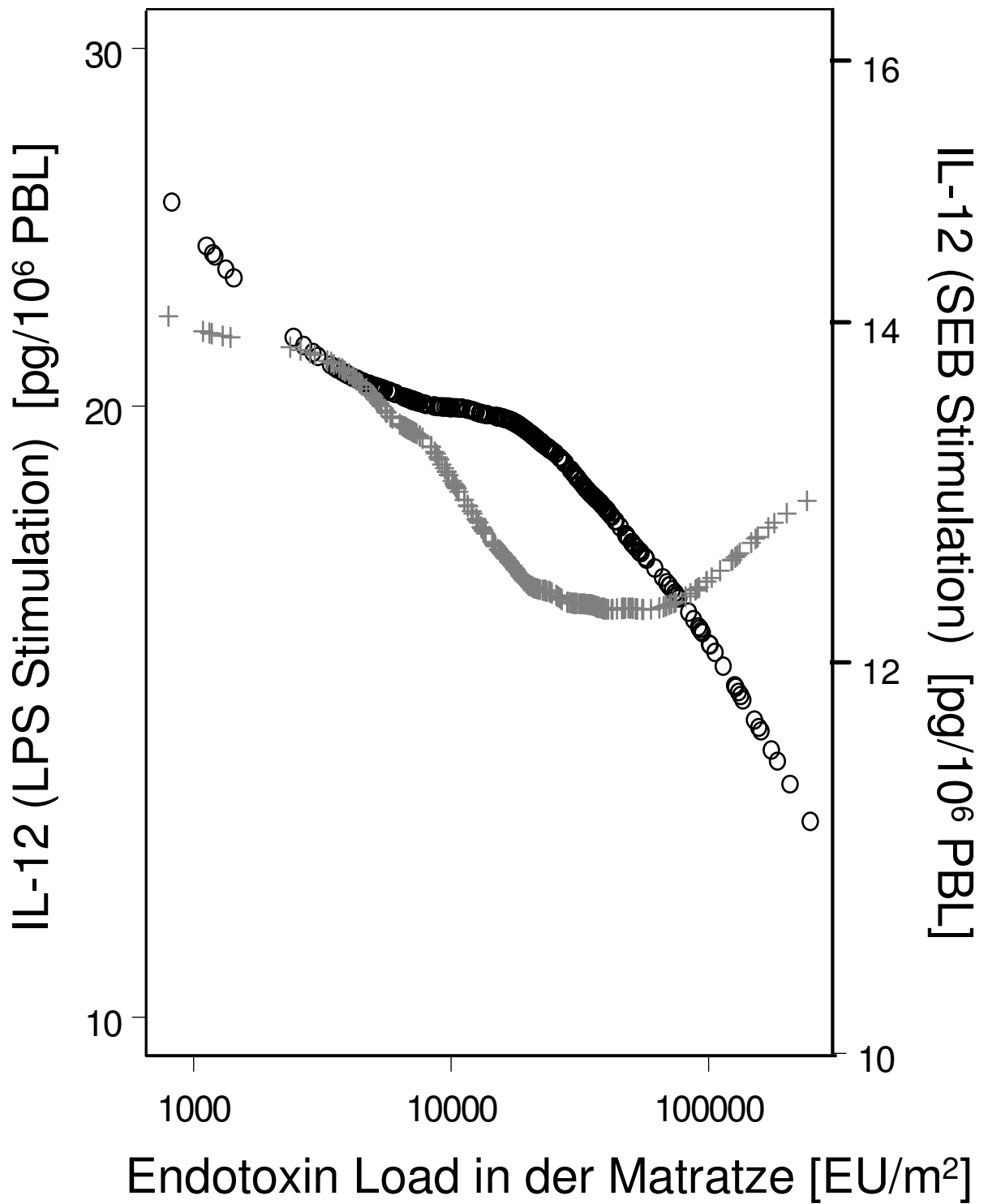
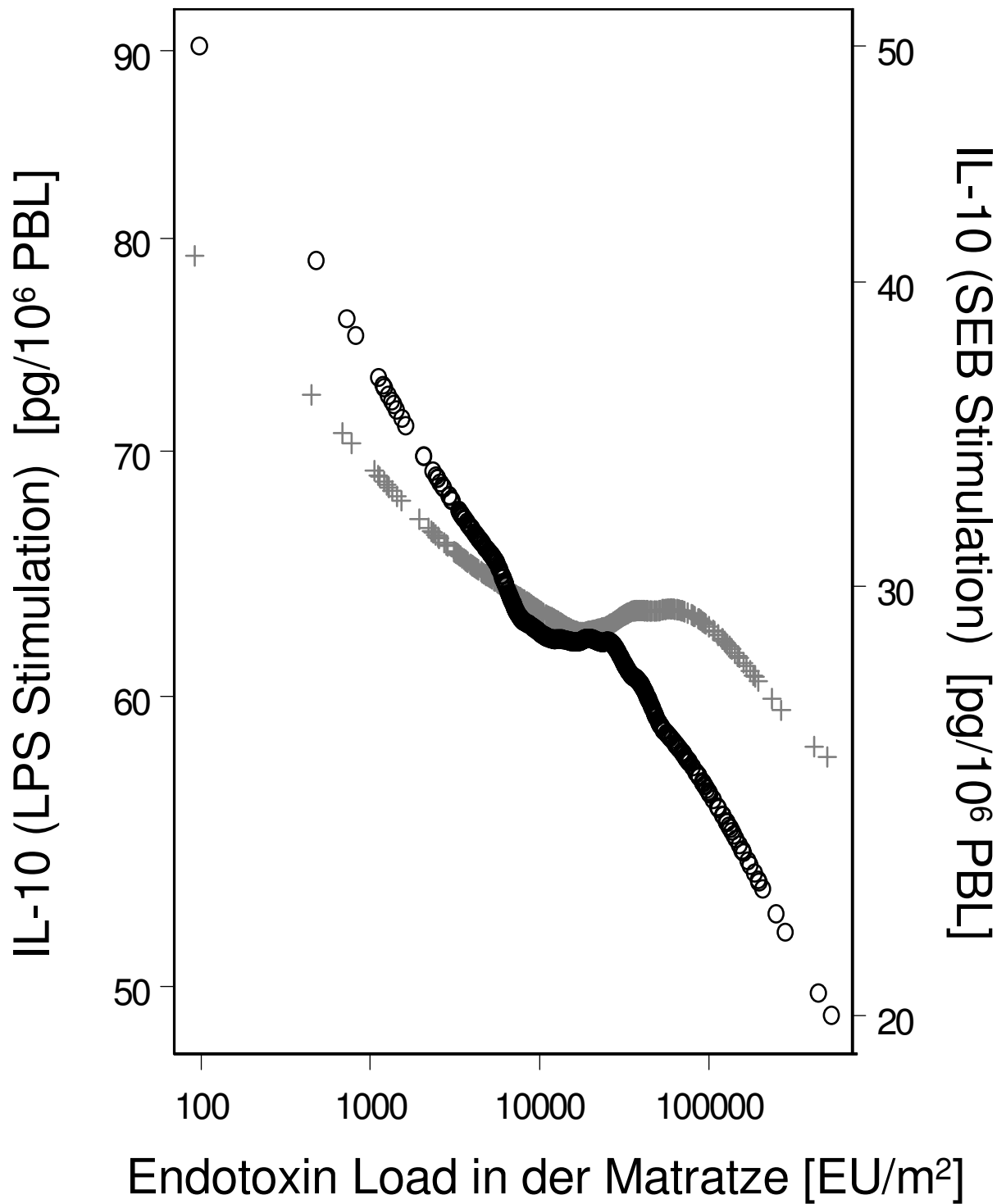


Abbildung 10 d) Kapazität IL-10 nach LPS-Stimulation zu produzieren (pg/ 10<sup>6</sup> periphere Blutleukozyten) geglättet gegen die log Endotoxin Load der Matratze (EU/m<sup>2</sup>). Schwarz LPS, Grau SEB.



### 9.2.3) Ergebnisse atopischer Zielvariablen versus Zytokinkonzentrationen

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der atopischen Zielvariablen versus dem Median der Zytokinproduktion von IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  nach 24 stündiger LPS Stimulation dargestellt.

Tabelle 8

Atopische Zielvariable		Interferon- $\gamma$			Interleukin-10			Interleukin-12			TNF- $\alpha$		
		n	Median	IQR	n	Median	IQR	n	Median	IQR	n	Median	IQR
Diagnose des Arztes: Asthma	nein	663	309,0	502,8	667	73,5	91,1	461	17,3	23,1	665	659,5	576,5
	ja	56	262,9	427,7	56	73,5	81,9	44	20,9	36,4	56	648,1	683,0
Giemen im letzten Jahr	nein	638	309,6	493,1	642	74,5	89,7	446	17,8	23,4	640	655,9	575,8
	ja	69	295,9	568,0	69	68,8	90,9	52	16,2	33,5	69	700,8	641,8
Asthma Attacken	nein	650	309,6	489,0	654	74,5	90,2	453	17,8	23,4	652	655,9	580,3
	ja	55	327,4	599,5	55	68,8	90,9	44	16,5	32,5	55	746,9	678,6
Diagnose der Arztes: Heuschnupfen	nein	652	306,9	504,1	656	74,5	90,3	458	17,5	23,3	654	658,0	589,9
	ja	63	270,9	462,2	63	64,8	81,8	44	16,9	26,8	63	652,3	624,4
Juck. trän. Augen b. Nasenbeschw. 12 Monate	nein	632	304,3	491,1	636	75,0	88,7	442	17,5	23,1	634	663,5	599,4
	ja	76	336,3	496,6	76	68,1	87,1	53	16,9	24,8	76	636,9	583,3
„Atopie“	nein	570	309,6	540,9	574	72,4	92,5	397	17,2	22,6	573	647,9	578,3
	ja	149	289,3	426,2	149	78,3	80,6	108	18,2	34,8	148	684,0	606,1

$p \leq 0,05$

#### **9.2.4) Zytokinkonzentrationen bei atopischen Bauernkindern**

In Tabelle 9 sind die Zytokinkonzentrationen von IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  nach 24h LPS-Stimulation dargestellt (Median und Interquartile Range). Es wird dabei die Zytokinproduktion der atopischen Bauernkinder gegen die der nicht-atopischen Bauernkinder verglichen. Interessanterweise weisen die Lymphozyten der atopischen Bauernkinder eine verminderte Fähigkeit auf, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  zu produzieren.

**Tabelle 9)**

	Atopische Bauern			n	Nicht atopische Bauern	
	n	Median	IQR		Median	IQR
IFN- $\gamma$	29	161,5	331,8	243	257,9	360,4
IL-10	29	67,4	99,1	247	74,3	95,9
IL-12	25	9,7	26,5	222	11,5	24,2
TNF- $\alpha$	29	510,0	543,0	248	618,6	513,4

## **10.) Diskussion**

Im Hinblick auf die Prävalenzen von Asthma und atopischen Krankheiten finden sich nicht nur weltweit (5) und zwischen Ost- und West- Europa (16) starke Unterschiede, sondern sogar in ethnisch gleichen Bevölkerungen wie zwischen Ost- und West-Deutschland sind stark unterschiedliche Prävalenzen zu finden (13,14,15). Mehrere Studien konnten belegen, dass nicht nur die oben beschriebenen Prävalenzunterschiede bestehen, sondern auch signifikante Unterschiede in nicht-europäischen Ländern zwischen Kindern der Stadt- und Landbevölkerungen existieren. Untersuchungen zu diesem Thema innerhalb Europas zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede (129, 215, 216, 217). Interessanterweise konnte bei Kindern aus der gleichen ländlichen Region gezeigt werden, dass signifikante Prävalenzunterschiede zwischen Bauernkindern und Nicht-Bauernkindern bestehen (115/ 116/ 117/ 118/ 119). Dieser „Bauerneffekt“ konnte auch in Finnland und Kanada an jungen Erwachsenen, die ihre Kindheit auf einem Bauernhof verbracht haben, bzw. an Adoleszenten bestätigt werden (120/ 121).

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen ebenfalls, dass die Bauernkinder weniger Asthma und Allergien haben als die Nicht-Bauernkinder der gleichen ländlichen Region. Wir haben gezeigt, dass mehrere Einflussfaktoren des bäuerlichen Lebens (was wahrscheinlich eine Exposition mit mikrobiellen Stoffen widerspiegelt) während des ersten Lebensjahres einen stark protektiven Effekt auf das Auftreten von Asthma und Atopie im Schulalter hat. So sind laut unserer Untersuchungsergebnisse mögliche Erklärungsfaktoren, der Rohmilchkonsum und der Kontakt zu Tierställen im 1. Lebensjahr des Kindes. Wir konnten zeigen, dass diese Faktoren unabhängig voneinander einen starken protektiven Effekt aufweisen. Treten diese Faktoren gemeinsam auf, so scheinen sich ihre protektiven Eigenschaften zu addieren. Unabhängig von diesen gerade genannten Faktoren und zusätzlich zu diesem Effekt haben wir gezeigt, dass die Höhe der Endotoxinexposition, dem das Kind im Grundschulalter exponiert ist, mit einem merklich verminderten Risiko der atopischen Zielparameter assoziiert ist. Dieser protektive Effekt konnte auch bei Kindern gefunden werden, die keinen Kontakt zu einem Bauernhof hatten und die Endotoxinkonzentrationen vergleichbar war mit städtischen Wohnbedingungen in den Niederlanden (210) und Städten in den USA (211, 212). Dies deutet darauf hin, dass eine ubiquitäre Exposition mit mikrobiellen Produkten in einem starken Ausmaß die Entwicklung von Atopie und Asthma im Kindesalter beeinflusst.

Die bereits genannten Einflussfaktoren, Rohmilchkonsum und Stallkontakt im 1. Lebensjahr, interpretieren wir als eine mikrobielle Exposition, der die Bauernkinder ausgesetzt sind. Es ist bekannt, dass in Ställen und Rohmilch eine Vielzahl von Keimen (z.B. E. coli, Lactobacillus,

Stap. aureus...) vorkommen. Stellvertretend für die gram-negativen Bakterien haben wir die Endotoxinkonzentration in den Matratzen der Kinder gemessen. Wir gehen davon aus, dass das Endotoxin aus den Ställen in den Wohnraum der Kinder gelangte. Wir haben im Resultateteil gezeigt, dass sowohl auf dem Boden als auch in der Matratze der Bauernkinder signifikant höhere Endotoxinmesswerte zu finden waren, als bei den Nicht-Bauernkindern. Die Höhe der sich im Umlauf befindenden Endotoxinexposition zeigte dabei eine starke, inverse Assoziation mit atopischem Asthma, Heuschnupfen, Heuschnupfensymptomen und atopischer Sensibilisierung.

Die Mechanismen, die bewirken, dass die Exposition mit Endotoxin und anderen, vermutlich bakteriellen Antigenen im Stall, gegen die Entwicklung atopischer Immunreaktionen und Erkrankungen schützen kann, bleiben bis jetzt im Einzelnen unverstanden. Die Ergebnisse der LPS-Zytokinstimulation lieferten andere Ergebnisse, als wir erwartet hatten. Die ursprüngliche These, daß LPS-Kontakt bei den Bauernkindern ein Th-1 Zytokinprofil mit assoziiert erhöhtem Interferon- $\gamma$  und Interleukin 12 induziert, konnte anhand unserer Ergebnisse nicht bestätigt werden. Unsere Untersuchungsergebnisse legen nahe, dass eine hohe Endotoxinexposition im Grundschulalter, als Reaktion auf die Aktivierung des angeborenen Immunsystems, zu einer merklichen Suppression der Zytokinproduktion führt. Das Phänomen, daß nach einer Prästimulation mit LPS eine reduzierte Anregbarkeit der Zytokinproduktion auf eine nachfolgende Stimulation mit LPS besteht, wird in der Literatur als „LPS Toleranz“ bezeichnet (190). Endotoxintoleranz ist nicht für LPS spezifisch, sondern es sind Kreuzreaktionen mit anderen exogenen Stimulantien beschrieben. Außer für LPS (191-195) konnte für eine Vielzahl von Stimulantien gezeigt werden, dass sie einen LPS-toleranten Zustand induzieren können. Zu den Stimuli, von denen bekannt ist, daß sie die Reaktion auf eine folgende LPS Stimulation modifizieren können, gehören Peptidoglycan (196), Lipoarabinomannan (197,198), Lipoteichonsäure (199), Mykobakterien (197,198), Muramil Dipeptid (196) und 25-hydroxy-Cholesterol (200). Die beständigste und wohl am besten charakterisierte Veränderung der LPS Toleranz ist die verminderte TNF- $\alpha$  Produktion (201, 202, 203). Diese Verminderung der LPS- stimulierten TNF- $\alpha$  Produktion ist solch ein charakteristisches Merkmal der Endotoxintoleranz, daß sogar einige Forscher die TNF Hemmung mit einem LPS-toleranten Zustand gleichsetzen. Außerdem zeigen LPS-tolerante menschliche Zellen (Monozyten und dendritische Zellen) nach LPS Stimulation eine verminderte Produktion von IL-10 (204, 205) und IL-12 (206). Eben diese inverse Korrelation der Zytokinproduktion von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12 und IL-10 mit steigenden Endotoxinmesswerten im Staub der Matratzen konnten wir in unseren Ergebnissen beobachten. Die Ergebnisse unserer Untersuchung deuten darauf hin, dass solch eine Herabregulierung in vivo als Folge einer Langzeitexposition mit in der Umwelt des

Individuums vorkommendem Endotoxin eintreten konnte. Es bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen, ob diese Herunterregulierung nur ein Nebenphänomen und Bioindikator der Endotoxinexposition ist, oder ob die verminderte Atopierate kausal damit in Verbindung steht.

In letzter Zeit tauchte die Vorstellung auf, dass die angeborene Immunantwort in prägender Weise auf die erworbene Immunität einwirkt (207). Jüngst wurde eine unterschiedliche Expression des LPS-Rezeptors bei Bauernkindern im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern beschrieben (208). Dies legt nahe, dass das angeborene Immunsystem auf die mikrobielle Belastung der Bauernumgebung reagiert. Obgleich wir nur die gegenwärtige Endotoxinexposition durch die einmaligen Messungen erfasst haben, ist es jedoch wahrscheinlich, dass sie auch die chronische Exposition dieser Kinder widerspiegeln. Infolgedessen mag es sein, dass eine Langzeitexposition mit hohen Endotoxinpegeln in der Umwelt den Zustand der „Toleranz“ (209) begünstigt, der die Entstehung von allergiebegünstigenden Immunreaktionen verhindert.

Trotz der dargestellten protektiven Faktoren, die auf die Bauernkinder einwirken, gibt es auch unter den Bauernkindern asthmatische und atopische Erkrankungen. Wie von uns gezeigt, waren die atopischen Bauernkinder im Vergleich zu den nicht-atopischen Bauernkindern vermindert in der Lage, das regulatorische Zytokin IFN- $\gamma$  zu produzieren. Die bei diesen Kindern vorliegenden atopischen Erkrankungen scheinen mit dieser reduzierten Fähigkeit der IFN- $\gamma$  Produktion in Zusammenhang zu stehen. Da die atopischen und nicht-atopischen Bauernkinder jedoch den gleichen protektiven Faktoren ausgesetzt waren, könnte die Ursache ihrer Atopie in einem genetischen Defekt der IFN- $\gamma$  Produktion begründet liegen.

Interessanterweise konnte der protektive Effekt der Endotoxinexposition im Schulalter nur beim atopischen Giemen und Asthma beobachtet werden, nicht jedoch beim nicht atopischen Giemen. Asthma im Kindesalter ist ein komplexes Syndrom mit vielen Phänotypen, die sich wie in vielen prospektiven Langzeitstudien gezeigt wurde, vom Säugling über Kleinkind, Schulkind, Jugendlichen bis zum Erwachsenen entwickeln (213, 214, 215). Obwohl in vielen Fällen Asthma mit einer atopischen Sensibilisierung gegen eine Vielzahl von Allergenen assoziiert ist, kommen obstruktive Erkrankungen auch ohne eine gesteigerte IgE Antwort vor. Sowohl der genetische Hintergrund, als auch Umweltfaktoren und deren gemeinsames Zusammenspiel führen wahrscheinlich zu den verschiedenen klinischen Manifestationsformen der obstruktiven Erkrankungen.

Es konnte sowohl bei der Exposition gegenüber Menschen (216) als auch in Tierversuchen (217) gezeigt werden, dass Endotoxin in der Lage ist, eine Übererregbarkeit der Atemwege bei gesunden, nicht atopischen Menschen/ Tieren zu induzieren. Bei bereits sensibilisierten

Tieren führt es zu einer Abnahme der Atemwegsempfindlichkeit. Tulic et al (217) exponierten dazu Ratten vernebeltem Lipopolysaccharid 1 Tag vor, und 1, 4, 6, 8 und 10 Tage nach intraperitonealer Sensibilisierung mit Ovalbumin. Es konnte dabei gezeigt werden, dass eine Exposition mit Lipopolysaccharid die bis zum 4. Tag nach der Sensibilisierung stattfand, protektiv gegen die Bildung spezifischer IgE Antikörper, bronchialer Hyperreagibilität und Entzündungsvorgänge in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit wirkte. Eine Inhalation von Lipopolysaccharid ab dem 4. Tag nach der Sensibilisierung hingegen hatte nachteilige Effekte und führte zu einer Zunahme der allergischen Reaktionen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine frühe Exposition gegenüber bakteriellen Komponenten den immunologischen Gesamtstatus eines Individuums mitbestimmen kann, und es dadurch weniger anfällig für Asthma oder Heuschnupfen wird. Diese Erkenntnisse unterstützten die Vorstellung, dass dadurch der atopische Effekt modifiziert werden kann, wie dies auch in unseren Daten der Fall ist. Ebenfalls konnte ein protektiver Effekt der Bauernhofexposition für das nicht atopische Giemen festgestellt werden, wohingegen eine Endotoxinexposition im Schulalter das Risiko erhöhte. Folglich ist es wahrscheinlich, dass nicht nur Art und Ausmaß der Exposition mit mikrobiellen Antigenen einen Einfluß auf die Bildung atopischer oder nicht-atopischer Anlagen hat, sondern auch der Zeitpunkt dieser Exposition mit darüber entscheidet, ob sie protektive oder schädliche Effekte hat.

Unsere Ergebnisse stehen auch im Einklang mit den Ergebnissen zweier epidemiologischer Erhebungen (218, 219), die gezeigt haben, dass Kinder, die in den ersten 6-12 Monaten ihres Lebens eine Kinderkrippe besuchten oder zusammen im selben Haushalt mit älteren Geschwister lebten, im späteren Leben ein niedriges Risiko aufweisen eine allergische Sensibilisierung und Asthamasymptome zu entwickeln. Eine Exposition gegenüber den eben genannten Situationen bewirkten bei Kindern, die zu diesem Zeitpunkt älter als 12 Monate waren, jedoch keinen Schutz.

Die Vollblutmethode der Zellstimulation in den LPS vorbeschichteten Stimulationsröhrchen war für unsere Zwecke besonders geeignet, da das Procedere im Labor am Tag der Blutentnahme pro Blutprobe im Vergleich zu den Stimulationstechniken mit Zellseparation weniger Zeit benötigte. Dadurch konnten die großen Probandenzahlen, die für unsere Zwecke benötigt wurden, erst erreicht werden, weil die Zeitspanne zwischen Blutabnahme und Inkubation der Blutproben so kurz wie möglich gehalten werden konnte. Durch die Verwendung dieser Vollblutmethode konnten auch durch die Zellseparation bedingte Anreicherungen/ Verminderungen bzw. vorzeitige Aktivierung von Lymphozytensubpopulationen vermieden werden. Dass die Methode hinsichtlich der Zytokinproduktion nach LPS Stimulation, verglichen mit anderen Stimulationsmethoden nach Zellseparation, die höchsten Zytokinmesswerte liefert, haben wir zuvor experimentell



nachgewiesen (siehe Methosenvergleich S.50). Der Nachteil dieser Vollblutzellstimulation ist jedoch, dass eine Zuordnung zwischen den stimulierten Zellpopulationen und den von ihnen produzierten Zytokinen ohne Zellseparation nicht vorgenommen werden kann. Für die von uns benötigten Zwecke und Fragestellungen war diese Zuordnung jedoch nicht unbedingt nötig.

Wir haben uns entschlossen, Endotoxin in den Matratzen zu messen, da die Kinder während des Schlafes eng mit der mikrobiellen Umgebung ihrer Betten in Kontakt kommen und zumindest für die Dauer des Schlafes dieser Konzentration mit Sicherheit ausgesetzt sind. Außerdem ist die Reproduzierbarkeit der Endotoxinmessungen für Messungen aus Betten höher als für Endotoxinmessungen des Bodenstaubes (220). In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Endotoxinstaubmessungen im Staub von Betten über längere Zeiträume nur gering variierten und innerhalb eines Zeitraumes von 6 Monaten keine signifikanten Veränderungen aufwiesen (212). Es ist deshalb wahrscheinlich, dass die Umgebungskonzentrationen an Endotoxin eine Langzeitexposition gegenüber mikrobiellen Bestandteilen der Umwelt widerspiegeln. Das Querschnittsdesign dieser Studie limitiert jedoch die Möglichkeit, die Expositionsdauer, wie sie durch laufende Endotoxinmessungen gewonnen werden könnten, zu bestimmen. Diesbezüglich sind in Zukunft sicherlich weitere prospektive Untersuchungen nötig.

Aus der Vielzahl der mikrobiellen Antigene wurde in dieser Studie Lipopolisaccharid als Surrogatmarker für gram-negative Bakterien und Staphylokokkenenterotoxin B für die gram-positiven Bakterien benutzt. Andere bakterielle Bestandteile wie z.B. für prokariotische DNA (CpG Motive), spezifische nicht-methylierte Zytidin-Guanosin Dinukleotide, oder Zellwandbestandteile von atypischen Mykobakterien oder gram-positiven Bakterien wie Lipoteichonsäure, die bekannt dafür sind, Immunreaktionen in ähnlicher Weise wie Endotoxin zu beeinflussen, wurden nicht berücksichtigt (221, 222). Solche Faktoren sind in der Lage, antigenpräsentierenden Zellen zu aktivieren und eine Th-1 geprägte Immunantwort durch die Produktion von Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$ , Interferon  $\gamma$ , Interleukin 12 und Interleukin 18 zu induzieren (223 - 226). Bei Individuen, die eine effiziente Th-1 Immunantwort entwickelt haben, besteht eine geringe Anfälligkeit für die Entstehung allergischer Reaktionen. Die beobachteten protektiven Effekte, die mit den Endotoxinkonzentrationen im Matratzenstaub assoziiert waren, spiegeln deshalb wahrscheinlich ein viel breiteres Spektrum an mikrobiellen Bestandteilen wider als nur die Exposition gegenüber gram-negativen Bakterien.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten abschließend darauf hin, dass durch die Exposition gegenüber mikrobiellen Produkten, wie in diesem Fall der Endotoxinexposition im Staub von Matratzen oder die Stall- und Rohmilchexposition, mit der Entwicklung einer Toleranz gegen ubiquitär vorkommende Allergene der natürlichen Umgebung assoziiert ist. Es ist wahrscheinlich, dass den Mechanismen, welche mit der Erkennung dieser mikrobiellen Produkte durch die angeborene Immunität und die Regulation der resultierenden Entzündungsreaktionen durch die adaptive Immunität in Verbindung stehen, eine Schlüsselrolle in der Entwicklung atopischer Erkrankungen wie Heuschnupfen, Asthma im Kindesalter und Giemen zukommt. Es mag sein, dass diese Erkenntnisse zukünftig die Entwicklung neuer Strategien der Prävention dieser Erkrankungen ermöglichen.

## **11.) Zusammenfassung**

Asthma ist die häufigste chronische Krankheit des Kindesalters und für einen wesentlichen Teil der Morbidität und Gesundheitskosten verantwortlich. Obwohl von einer Vielzahl von Umweltfaktoren angenommen wurde, dass sie eine Schlüsselrolle in der Entwicklung von allergischen Erkrankungen und Asthma spielen, bleiben die Ursachen dieser Erkrankungen ungeklärt. Eine höchst interessante Hypothese ist, dass Veränderungen in der Art und dem Ausmaß von Stimulation mit mikrobiellen Produkten der Umwelt, welche mit den Verbesserungen im öffentlichen Gesundheitswesen und Hygienestandards assoziiert sind, die Prädisposition erhöht, an chronischen allergischen Erkrankungen im Kindesalter zu erkranken.

Eltern, sowohl aus bäuerlichen, als auch nicht bäuerlichen Haushalten von 6-13 jährigen Kindern aus ländlichen Regionen Deutschland, Österreichs und der Schweiz, beantworteten einen standardisierten Fragebogen über Asthma und Heuschnupfen. Die von den Kindern genommenen Blutproben wurden auf atopische Sensibilisierung getestet (RAST) und periphere Blutleukozyten aus den Proben für weitere Tests gewonnen. Es wurde die Höhe der Endotoxinkonzentration in den Matratzen dieser Kinder untersucht (LAL-Assay) in Relation zu den klinischen Befunden und den Profilen der Zytokinproduktion der peripheren Blutleukozyten, die zuvor mit Lipopolisaccharid und Staphylokokkenenterotoxin B stimuliert worden waren. Von 812 Kindern waren vollständige Daten vorhanden. Um die für diese Studie geeignetste Zellstimulationsmethode zu bestimmen, wurden verschiedenen Zellstimulationsmethoden vorher getestet und miteinander verglichen. Die Messung der produzierten Zytokine erfolgte mittels Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA).

Die Höhe der Endotoxinlevel in den Staubproben der Matratzen der Kinder korrelierten invers mit dem Auftreten von Heuschnupfen, atopischem Asthma und atopischer Sensibilisierung. Das nicht-atopische Giemen war nicht signifikant mit den Endotoxinleveln assoziiert. Die Zytokinproduktion der Leukozyten (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12) korrelierte invers mit der Höhe der Endotoxinkonzentration, was auf eine merkliche Herabregulierung der Immunreaktion der exponierten Kinder hinweist.

Heranwachsen auf einem Bauernhof schützt vor allergischer Sensibilisierung und der Entstehung allergischer Erkrankungen im Kindesalter. Regelmäßiger Kontakt zu Stalltieren auf einem Bauernhof bzw. Rohmilchkonsum stellen in dieser Umgebung wichtige Faktoren dar, die einen bedeutenden protektiven Effekt ausüben. Die Ergebnissen dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Exposition einer Person im Kindesalter gegenüber mikrobiellen Produkten, wie Endotoxin eine entscheidende Rolle bei der Toleranzentwicklung gegen ubiquitär in der Natur vorkommenden Allergenen haben könnte. Es mag sein, dass diese

Erkenntnisse zukünftig die Entwicklung neuer Strategien der Prävention dieser Erkrankungen ermöglichen.

## **12. Anhang**

### **12. 1. Fragebogen**

# Fragebogen

zu

## Allergischen Erkrankungen im Kindesalter

Liebe Eltern,

Allergische Erkrankungen gehören zu den häufigsten Krankheiten im Kindesalter und die Tendenz ist weiter steigend. Zu den allergischen Erkrankungen zählen z.B. Heuschnupfen, Neurodermitis und Asthma. An den Folgen leiden nicht nur die Betroffenen, sondern auch deren Familienangehörige - oft ein Leben lang.

Um Kinder vor der Erkrankung an Allergien und Asthma schützen zu können, ist es notwendig, die Ursachen und Auslöser der Krankheiten genau zu kennen. Bisher weiß man, daß die allergischen Erkrankungen durch das Zusammenspiel von Vererbung und Umwelteinflüssen entstehen, ohne die einzelnen Komponenten genau definieren zu können. Interessanterweise haben kürzlich Untersuchungen aus Deutschland, Österreich und der Schweiz gezeigt, daß das Risiko an Allergien zu erkranken, bei Kindern auf dem Land halb so groß ist wie bei Großstadtkindern!

Wir wollen diese Faktoren finden, die vor Allergien schützen können. Erst die genaue Kenntnis der Schutzfaktoren eröffnet uns neue Wege zur Vorbeugung und Behandlung dieser chronischen Krankheiten. **Für das Gelingen sind wir auf Ihre ganz persönliche Mithilfe angewiesen !**

Zu den Informationen vom Fragebogen sind zusätzlich eine kleine Blutuntersuchung und Staubmessungen im Wohnbereich des Kindes notwendig. Nur so erhalten wir genauere Auskunft über Krankheitsentstehung und -verlauf. Von der Ärztin Frau Maisch der Universitätskinderklinik in München wird bei den Kindern in den schulärztlichen Räumen eine kleine Blutentnahme durchgeführt. Dadurch können einerseits allgemein von der Norm abweichende Blutwerte aufgedeckt werden und andererseits wird untersucht, ob Ihr Kind eine Allergie hat bzw. ob ein Allergierisiko vorhanden ist. Eine weitere Untersuchung der Erbsubstanzen im Blut ermöglicht es, das Zusammenwirken von Umwelteinflüssen und Vererbung bei Allergien besser zu verstehen.

**Die Ergebnisse werden Ihnen selbstverständlich schriftlich mitgeteilt**, die Sie gerne an Ihren behandelnden Kinderarzt weiterreichen können !

Die Staubmessungen werden durch Fachpersonal im Wohnbereich und an der Bettmatratze des Kindes durchgeführt und dauern ca. 2 Stunden. Die Partikelproben werden anschließend in einem speziellen Labor untersucht. Wenn Sie mit diesen Untersuchungen einverstanden sind, füllen Sie bitte auf der letzten Seite die **Einwilligungserklärung** aus.

- ➔ **Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig!** Wenn Sie nur den Fragebogen ausfüllen oder gar nicht teilnehmen, entstehen Ihnen keine Nachteile. Für den Erfolg der Studie ist allerdings Ihre Teilnahme sehr wichtig. **Ihr Kind profitiert von den Ergebnissen!**
- ➔ **Alle Ihre Angaben unterliegen der Geheimhaltungspflicht!** Ihre Antworten im Fragebogen und auch alle weiteren Angaben werden nur für diese Studie verwendet und nicht an Dritte weitergereicht. Die Ergebnisse werden ohne jeden Personenbezug veröffentlicht. Der Datenschutz ist gewährleistet.
- ➔ **Es ist sehr wichtig, daß der Fragebogen vollständig ausgefüllt wird, auch wenn Ihr Kind nicht erkrankt ist!** Nur so wird ein wissenschaftlich aussagekräftiges Ergebnis erzielt. Die ausführlichen Fragen zu verschiedenen Lebensbereichen sind von rein wissenschaftlichem Interesse!

Das Bayerische Staatsministerium für Arbeit und Sozialordnung, Familie, Frauen und Gesundheit und die Regierung von Schwaben befürworten und unterstützen unsere Studie. Das Gesundheitsamt und die Kinderärzte im Ostallgäu sind ebenfalls über unser Vorhaben informiert und unterstützen es. Die Studie wird von anerkannten Experten und Ärzten geleitet, die große Erfahrungen im Bereich Allergie und Asthma haben. Sollten Sie Fragen zu der Studie oder zu dem Fragebogen haben, stehe ich oder Frau Maisch Ihnen unter der Telefonnummer 089/5160-5146 gerne zur Verfügung. Bitte scheuen Sie sich nicht, bei Unklarheiten anzurufen!

**Vielen herzlichen Dank für Ihre Mithilfe!**

Mit freundlichen Grüßen

PD Dr. med. Erika von Mutius  
Oberärztin der Dr. von Haunerschen Kinderklinik  
Ludwig-Maximilians-Universität in München

## Einige Anmerkungen zur Beantwortung der Fragen:

Bitte lassen Sie sich vom Umfang des Fragebogens nicht abschrecken! Die meisten Fragen können durch ein Kreuz in den entsprechenden Kästchen beantwortet werden (bitte so: ). Bitte folgen Sie den Hinweisen bei den entsprechenden Fragen. Wenn Sie ein Kästchen mit Pfeil (→) ankreuzen, beachten Sie bitte auch die nachfolgenden Zusatzfragen.

Sie benötigen etwa 15 Minuten für die Beantwortung der Fragen.

Den ganzen Fragebogen hindurch geht es um **das Kind, das den Fragebogen mit nach Hause gebracht hat**. (Wenn mehrere Ihrer Kinder an der Studie teilnehmen, füllen Sie bitte für jedes Kind einen Fragebogen aus).

Bitte lassen Sie sich von unbekanntem medizinischen Ausdrücken nicht verunsichern. Falls Ihr Kind diese Krankheiten nicht hatte/hat, brauchen Sie diese Bezeichnungen nicht kennen.

Es geht uns **nicht** um eine Wertung der Kinder oder deren Familien! Daher bitten wir Sie, die Fragen ehrlich und vollständig zu beantworten. Auch wenn es schwierig sein kann, sich an frühere Gegebenheiten genau zu erinnern, bitten wir Sie, die Fragen, so gut Sie können, zu beantworten.

**Vielen Dank für Ihre Mühe beim Ausfüllen des Fragebogens!**

### Angaben zum Kind

1 Geburtsdatum Ihres Kindes

\_\_ | \_\_ | \_\_  
Tag / Monat / Jahr

2 Ist Ihr Kind ein Junge oder ein Mädchen ?

Junge.....

Mädchen.....

3 Welche Staatsangehörigkeit hat Ihr Kind?

deutsch.....

andere ..... → Welche? (bitte angeben).....

4 Ist Ihr Kind in Deutschland geboren?

ja.....

nein.....

5 Wieviele ältere leibliche Geschwister hat Ihr Kind (auch Halbgeschwister) ?

(Wenn es keine älteren Geschwister hat, bitte 0 eintragen)

Anzahl der älteren Geschwister: \_\_\_\_\_



## Angaben zur Gesundheit des Kindes

Bitte beachten Sie, daß sich viele der folgenden Fragen entweder auf die letzten 12 Monate oder auf das gesamte bisherige Leben Ihres Kindes (=irgendwann einmal) beziehen.

- 6 Hatte Ihr Kind irgendwann einmal beim Atmen pfeifende oder keuchende Geräusche im Brustkorb ?**

nein.....  → bitte gleich weiter mit Frage 11 !  
ja.....

- 7 Mit welchem Alter traten die Beschwerden zum ersten Mal/letzten Mal auf ?**

Die Beschwerden traten zum ersten Mal auf mit \_\_\_\_\_ Jahren.  
Die Beschwerden traten zum letzten Mal auf mit \_\_\_\_\_ Jahren.  
Die Beschwerden treten immer noch auf .....

- 8 Hatte Ihr Kind in den letzten 12 Monaten beim Atmen pfeifende oder keuchende Geräusche im Brustkorb ?**

nein.....  → bitte gleich weiter mit Frage 11 !  
ja.....

- 9 Wieviele Anfälle von pfeifender oder keuchender Atmung hatte Ihr Kind in den letzten 12 Monaten ?**

keinen Anfall.....   
1 - 3 Anfälle.....   
4 - 12 Anfälle.....   
mehr als 12 Anfälle.....

- 10 Was sind Ihrer Meinung nach die Auslöser der Atembeschwerden Ihres Kindes ?  
(mehrere Antworten möglich)**

Infekte (z.B. Schnupfen, Erkältung)

- Anstrengung (z.B. Laufen)
- Kalte Luft, Nebel
- Seelische Belastung
- Kontakt mit Tieren  → welche? \_\_\_\_\_
- Kontakt mit Blumen, Gräsern, Bäumen
- Staubaufwirbelung
- Einatmen von scharfen Gerüchen, Sprays
- Bestimmte Nahrungsmittel
- Keine der genannten Möglichkeiten

**→11**

**Ist von einem Arzt bei Ihrem Kind schon einmal eine der folgenden Erkrankungen festgestellt worden ?**  
(mehrere Antworten möglich)

	mehrmals	einmal	nein
Asthma.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
spastische oder asthmatische Bronchitis.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bronchitis.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pseudokrupp.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**12 Hatte Ihr Kind irgendwann einmal Niesanfälle oder eine laufende, verstopfte oder juckende Nase, obwohl es nicht erkältet war ?**

nein.....  → bitte gleich weiter mit Frage 15!  
ja.....

**13 Hatte Ihr Kind in den letzten 12 Monaten Niesanfälle oder eine laufende, verstopfte oder juckende Nase, obwohl es nicht erkältet war ?**

nein.....  → bitte gleich weiter mit Frage 15!  
ja.....

**14 Hatte Ihr Kind in den letzten 12 Monaten gleichzeitig mit diesen Beschwerden in der Nase juckende oder tränende Augen ?**

ja.....                                   nein.....

→15

Ist von einem Arzt bei Ihrem Kind schon einmal Heuschnupfen festgestellt worden?

ja.....

nein.....

16 Hatte Ihr Kind irgendwann einmal einen juckenden Hautausschlag, der stärker oder schwächer über mindestens 6 Monate auftrat ?

nein.....  → bitte gleich weiter mit Frage 19 !

ja.....

17 Trat dieser juckende Hautausschlag bei Ihrem Kind auch in den letzten 12 Monaten auf ?

nein.....

ja.....

18 Trat dieser juckende Hautausschlag bei Ihrem Kind irgendwann einmal an mindestens einer der folgenden Körperstellen auf:

In den Ellenbeugen oder Kniekehlen, an den Hand- /oder Fußgelenken, im Gesicht, am Hals ?

ja.....

nein.....

→19

Ist von einem Arzt bei Ihrem Kind schon einmal Neurodermitis ( auch atopisches Ekzem, endogenes Ekzem, atopische Dermatitis genannt) festgestellt worden?

ja.....

nein.....

20 Mußte Ihr Kind jemals ärztlich behandelt werden, weil ein Darmbefall mit Würmern vorlag ?

nein.....

ja.....  → einmal  2-3 mal  mehr als 3 mal

## Angaben zur Gesundheit der Familie

Familiäre Veranlagungen spielen bei vielen Erkrankungen eine wichtige Rolle, daher fragen wir auch nach der Gesundheit der Familienmitglieder des Kindes. Bitte beachten Sie, daß sich die Fragen nur auf die **leiblichen Eltern, Großeltern oder Geschwister** beziehen.

- 21 Welche(r) Verwandte(r) des Kindes leidet oder litt irgendwann einmal an Asthma, asthmatischer oder spastischer Bronchitis ? (mehrere Antworten möglich)**

Keine/r   
Mutter des Kindes   
Vater des Kindes   
Großeltern des Kindes   
Geschwister des Kindes  → Anzahl der betroffenen Geschwister: \_\_\_\_\_

- 22 Welche(r) Verwandte(r) des Kindes leidet oder litt irgendwann einmal an Heuschnupfen ? (mehrere Antworten möglich)**

Keine/r   
Mutter des Kindes   
Vater des Kindes   
Großeltern des Kindes   
Geschwister des Kindes  → Anzahl der betroffenen Geschwister: \_\_\_\_\_

- 23 Welche(r) Verwandte(r) des Kindes leidet oder litt irgendwann einmal an Neurodermitis oder Ekzem ? (mehrere Antworten möglich)**

Keine/r   
Mutter des Kindes   
Vater des Kindes   
Großeltern des Kindes   
Geschwister des Kindes  → Anzahl der betroffenen Geschwister: \_\_\_\_\_

- 24 Hat ein Verwandter des Kindes früher die Bewirtschaftung eines Bauernhofes wegen allergischer Erkrankungen (Heuschnupfen, Asthma, Ekzem) aufgeben müssen?**

nein.....   
ja..... → (mehrere Antworten möglich) Eltern d. Kindes.....   
Großeltern d. Kindes.....   
frühere Generationen.....

## Angaben zur Lebenssituation

Die folgenden Fragen beziehen sich auf verschiedene Bereiche des täglichen Lebens, von denen wir glauben, daß sie einen Einfluß auf die Gesundheit Ihres Kindes haben könnten.

**25 Wo wohnen Sie ? (Bitte zutreffendes ankreuzen)**

- Einzelhof.....   
Dorf .....   
Kleinstadt.....

**26 Wird in der Wohnung, in der Ihr Kind lebt, geraucht ?**

- nein...   
ja.....  → Es rauchen: Mutter   
Vater   
andere  → Wer? \_\_\_\_\_

**27 Falls geraucht wird, wieviele Zigaretten werden insgesamt durchschnittlich pro**

**Tag in der Wohnung, in der Ihr Kind lebt, geraucht?** (z.B. Mutter raucht

2 Zigaretten + Vater raucht 5 + sonstige Person raucht 3 = 10 Zigaretten)

- 1 bis 9 Zigaretten.....   
10 bis 20 Zigaretten.....   
mehr als 20 Zigaretten .....

**28 Hat die Mutter des Kindes während der Schwangerschaft geraucht ?**

- nein...   
ja.....  → Bis zum wievielten Schwangerschaftsmonat? \_\_\_\_\_

**29 Welcher Brennstoff bzw. welche Energieart wird/wurde überwiegend zum Heizen der Wohnung, in der Ihr Kind lebt/lebte, verwendet ? (mehrere Antworten möglich)**

- |                       | zur Zeit                 | im ersten<br>Lebensjahr d.<br>Kindes |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| Gas.....              | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>             |
| Öl.....               | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>             |
| Strom.....            | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>             |
| Holz.....             | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>             |
| Kohle / Briketts..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>             |
| sonstiges.....        | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>             |

**30 Hat/hatte Ihr Kind regelmäßig Kontakt zu einer der folgenden Tierarten?**

- Kühe, Rinder, Kälber.....       Geflügel.....   
Schweine .....       Pferde.....   
Schafe .....       Ziegen.....   
Katzen .....       Hasen, Kaninchen.....   
Hunde.....   
andere.....  → welche?.....  
nein .....  → bitte gleich weiter mit Frage 33 !

**31 Ab welchem Alter hatte Ihr Kind regelmäßig Kontakt zu diesen Tieren ?**

Das Kind hat regelmäßigen Kontakt zu den Tieren seit es \_\_\_\_\_ Jahre alt ist.  
(Bitte Alter des Kindes eintragen !)

**32 Wie häufig kam Ihr Kind in den letzten Monaten im Durchschnitt mit diesen Tieren zusammen? (Bitte nur 1 Angabe machen!)**

- sehr oft (= mehrmals täglich) .....   
oft (= täglich).....   
ab und zu (= ein –mehrmals pro Woche) .....   
selten (= weniger als einmal pro Woche) .....   
gar nicht .....

Viele Kinder halten sich gerne in einem Tierstall oder einer Scheune, in der Heu oder Stroh gelagert wird, auf.



**33 Wie häufig hielt sich Ihr Kind in den letzten Monaten im Durchschnitt in einem Tierstall auf ? (Bitte nur 1 Angabe machen!)**

- sehr oft (= mehrmals täglich) .....   
oft (= täglich).....   
ab und zu (= ein –mehrmals pro Woche) .....   
selten (= weniger als einmal pro Woche) .....   
gar nicht .....

**34 Wie häufig hielt sich Ihr Kind in den letzten Monaten im Durchschnitt in einer Scheune auf ? (Bitte nur 1 Angabe machen!)**

- sehr oft (= mehrmals täglich) .....   
oft (= täglich).....   
ab und zu (= ein –mehrmals pro Woche) .....   
selten (= weniger als einmal pro Woche) .....   
gar nicht .....

**35 Wie häufig hilft ihr Kind beim Heuen ?**

- oft .....
- ab und zu .....
- selten .....
- gar nicht .....

**36 Leben Sie auf einem Bauernhof ?**

- ja .....
- nein .....  → bitte gleich weiter mit Frage 44 !

Bitte folgende Fragen 37-43 nur beantworten, falls Sie auf einem Bauernhof leben



**37 Bewirtschaftet Ihre Familie den Hof ?**

- |  | zur Zeit                 | im ersten Lebens-<br>jahr des Kindes |
|--|--------------------------|--------------------------------------|
| als Vollerwerb (ganztags).....             | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>             |
| als Nebenerwerb (mindestens halbtags)..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>             |
| als Zuerwerb (weniger als halbtags).....   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>             |
| nur für den Eigenbedarf.....               | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>             |
| gar nicht.....                             | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>             |

**38 Wieviele Erwachsene arbeiten insgesamt auf dem Hof (einschließlich aller erwachsenen Familienmitglieder)? (bitte eintragen)**

Anzahl der Personen : \_\_\_\_\_

**39 Was wird auf dem Hof betrieben / angebaut? (mehrere Antworten möglich)**

- Ackerbau (Getreide).....
- Sonderkulturen (Wein, Gemüse, etc.).....
- Viehhaltung.....

**40 Welche Tiere werden gehalten? (mehrere Antworten möglich)**

- keine.....
- Kühe, Rinder, Kälber.....  → wieviele?.....
- Schweine .....  → wieviele?.....
- Geflügel.....  → wieviele?.....
- Pferde.....  → wieviele?.....
- Schafe.....  → wieviele?.....
- Ziegen.....  → wieviele?.....
- Hasen, Kaninchen.....  → wieviele?.....
- andere.....  → welche?..... wieviele?.....

**41 Womit werden Ihre Tiere gefüttert? (mehrere Antworten möglich)**

- gepresstes Heu.....
- loses Heu.....
- Silage.....
- Kraftfutter .....
- anderes Futter.....  → welches? (bitte eintragen).....

**42 Wie häufig half Ihr Kind in den letzten Monaten im Durchschnitt bei den Stallarbeiten (z.B. Füttern, Misten)? (Bitte nur 1 Angabe machen!)**

- sehr oft (= mehrmals täglich) .....
- oft (= täglich).....
- ab und zu (= ein –mehrmals pro Woche) ....
- selten (= weniger als einmal pro Woche) .....
- gar nicht .....

**43 Ist die Mutter dieses Kindes während der Schwangerschaft auf dem Hof tätig gewesen?**

nein...

ja.....  → **Wenn ja, wie häufig hat sich die Mutter des Kindes während der Schwangerschaft im Stall aufgehalten?**

- sehr oft (= mehrmals täglich) .....
- oft (= täglich).....
- ab und zu (= ein –mehrmals pro Woche) ....
- selten (= weniger als einmal pro Woche) .....



## Angaben zu Milchkonsum und Ernährung

→44

Verwenden Sie Milch oder Milchprodukte direkt vom Hof ?

nein.....

ja.....  → Wird diese Milch abgekocht ?

ja.....

nein.....

45 Wie oft im Durchschnitt trinkt Ihr Kind diese Milch vom Hof ?

mindestens 1mal am Tag.....

1mal bis 6mal in der Woche.....

seltener als 1mal in der Woche.....

nie .....

46 Verwenden Sie Milch vom Laden ?

nein.....

ja.....  → Welche Sorte verwenden Sie?

Vollmilch.....

Magermilch.....

Vorzugsmilch (nicht pasteurisiert).....

H-Milch (ultrahoherhitzt).....

47 Wie oft im Durchschnitt trinkt Ihr Kind Milch vom Laden ?

mindestens 1mal am Tag.....

1mal bis 6mal in der Woche.....

seltener als 1mal in der Woche.....

nie .....

**48 Hat die Mutter des Kindes während der Schwangerschaft Milch direkt vom Hof getrunken?**

nein.....

ja.....  → **War diese Milch abgekocht ?**

ja.....

nein.....

→ **Wie häufig trank die Mutter die Milch ?**

mindestens 1mal am Tag.....

1mal bis 6mal in der Woche.....

seltener als 1mal in der Woche.....

**49 Verwenden Sie Lebensmittel aus eigener Erzeugung ?**

nein.....

ja.....  → **wenn ja, welche ? (mehrere Angaben möglich)**

Fleisch oder Wurstwaren.....

Obst.....

Gemüse/Kartoffeln.....

Eier.....

**50 Wie oft im Durchschnitt ißt Ihr Kind diese Nahrungsmittel ?**

mindestens 1mal am Tag.....

1mal bis 6mal in der Woche.....

seltener als 1mal in der Woche.....

nie .....

### **Weitere Angaben**

Die folgenden Fragen sind sehr wichtig für die vollständige statistische Auswertung des Fragebogens. Bitte machen Sie deshalb auch hier Angaben.

**51 Seit wann lebt Ihr Kind an der jetzigen Wohnadresse?**

Seit Geburt.....

Nicht seit Geburt.....  → Das Kind lebt seit \_\_\_\_ Jahren an der jetzigen Adresse.

**52 Welches ist der höchste Schul- bzw. Hochschulabschluß der Eltern?**

	Mutter	Vater
Hauptschule/Volksschule.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mittlere Reife/Realschule.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Abitur/Fachabitur.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hochschule/Fachhochschule/Universität.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
kein Abschluß.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
sonstiger Abschluß.....		

**53 Wer hat diesen Fragebogen beantwortet ? (Mehrere Antworten sind möglich)**

Vater.....

Mutter.....

sonstige Person.....  → Wer? \_\_\_\_\_

**Datum, an dem der Fragebogen ausgefüllt wurde:**

\_\_ | \_\_ | \_\_  
Tag / Monat / Jahr

**An dieser Stelle sind Ihre Bemerkungen zum Fragebogen willkommen !**

**Vielen Dank für Ihre Ausdauer !**

Mit Ihren Antworten auf diese Fragen hoffen wir, die Ursachen der allergischen Erkrankungen besser verstehen zu können, so daß vielleicht in nicht allzu ferner Zukunft eine wirksame Vorbeugung möglich wird.

Für weitere Informationen würden wir unter Umständen gerne noch einmal auf Sie zukommen. Dazu benötigen wir Ihre Adresse und wenn möglich Ihre Telefonnummer, um Sie gegebenenfalls erreichen zu können.

Name: \_\_\_\_\_

Anschrift: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Telefon Nr.: \_\_\_\_\_

Weitere Untersuchungen sind unerlässlich für die Studie, da sie aber sehr aufwendig sind, können nicht alle Kinder daran teilnehmen. Sollte Ihr Kind zu den ausgewählten Kindern gehören, wäre es schön, wenn Sie mit weiteren Untersuchungen einverstanden sind. Bitte füllen Sie hierzu die Einwilligungserklärung aus:

## Einwilligungserklärung

Ich bin mit folgenden Untersuchungen einverstanden (bitte jeweils ankreuzen):

- Blutentnahme bei meinem Kind
- Staubmessungen im Wohnbereich meines Kindes

Name (Vor-/Zuname) des Kindes: \_\_\_\_\_

Name der Schule: \_\_\_\_\_

Klassenstufe, die das Kind besucht: \_\_\_\_\_

Datum: \_\_\_\_\_  
Unterschrift der/des  
Erziehungsberechtigten \_\_\_\_\_

**Bitte oben Anschrift und Tel.Nr. für Ergebnismitteilungen nicht vergessen!**

## 12.2 Staubnahmeprotokoll

### ALEX-Dreiländerstudie

Deutschland, Österreich und Schweiz

### Staubprobenahme-Protokoll

Datum der Probenahme: .....

Staubsauger-Nr.: ....

ID-Nr.: .....

#### Matratze

Filterhalter-Nr.: ....

Um wen geht es?	Für welches Kind haben Sie den Eltern- und den Ernährungsfragebogen ausgefüllt?	Kontrolle des Vornamens mit der Adressliste	
Wahl der Matratze	Auf welcher Matratze hat ihr Kind die letzten 4 Wochen am häufigsten geschlafen?	Zimmer mit dem entsprechenden Bett aufsuchen	
Probenahmezeit	Saugzeit: 2Min/m <sup>2</sup> : 1,9m x 0,9m => 3'25" 2m x 0,9m => 3'36" 2m x 1,2m => 4'24" Bei grösseren Matratzen Saugzeit immer 4'30"	Länge: ...	Breite: ... Saugzeit [Min]: ...
Alter	Wie alt ist die Matratze?	Alter [in Monaten umrechnen]: ...	
Überzüge	Entfernen. Ausnahmen: Milbendichte Matratzenüberzüge für Allergiker, kunststoffbeschichtete Moltonbezüge Mögliche Überzüge: Moltonbezug über die ganze Fläche oder klein, plastifizierter Moltonbezug, Fixleintuch (Spannbezug), Allergiker-Matratzenbezug, Naturhaarfell...	Anzahl Überzüge: ... Beschreibung: ...	
Beschaffenheit	Etikette an der Matratze suchen. Mögliche Kerne: Feder-/Taschenfederkern, Latex-/Naturlatexkern, Schaumstoff-/Polyether-/Polyethen-/Mono-/Kaltschaum-/HR-Schaumkern Mögliche Auflagen: Schafschur-/Lamm-/Kraus-/Baumwolle, Wildseide/Tussah, Schweif-/Kamelhaar, Filz Mögliche Bezüge: abnehmbar sind Baumwoll-Plüsch/-Velour/-frottee/-Jersey, Allergiker-Jersey, nicht abnehmbar sind Baumwoll-Damast, Allergiker-Damast	Etikette vorhanden? Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Kern: ... Auflage: ... Bezug: ...	
Letzte Reinigung	Wann wurde die Matratze das letzte Mal gereinigt, d.h. geklopft, gesaugt oder chemisch behandelt?	Zeit seit letzter Reinigung [Wochen]: ... <input type="checkbox"/> Klopfen <input type="checkbox"/> Saugen Anderes: ...	
Haustiere	Befindet sich mindestens einmal pro Woche eine Katze oder ein Hund in diesem Bett?	Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/>	Katze <input type="checkbox"/> Hund <input type="checkbox"/>
Saugen	1) Filterhalter aus der Plastiktüte, Schutzdeckel entfernen, auf Staubsaugeraufsatz montieren 2) Stoppuhr. Saugkopf fast vertikal mit regelmässigen Bewegungen und konstantem Anpressdruck führen. Matratze zuerst am Kopfende beginnend runter und wieder rauf saugen, dann einmal den Rand absaugen. Ab dann die Matratze längs absaugen, bis die Saugzeit erreicht ist 3) Probenahmekopf senkrecht nach oben halten, Staubsauger abschalten. Filterhalter mit Schutzdeckel verschliessen, verpacken 4) Probenahmekopf mit einem trockenen Staublappen inwändig gründlich reinigen.		

Anmerkungen: ...

## Wohnbereich

Filterhalter-Nr.: ....

Wahl der Probefläche	Wo im Wohnbereich hält sich das Kind am häufigsten auf? Auswahl einer freien Fläche, möglichst auf einem Teppich (Stühle wegstellen, Möbel nicht)  Möglichkeiten: <input type="checkbox"/> Spannteppich oder flächendeckender Teppich (2m <sup>2</sup> ) <input type="checkbox"/> kein Teppich vorhanden: glatter Boden (Parkett, PVC oder anderer Kunststoff, Linoleum, Kork) (4m <sup>2</sup> ) <input type="checkbox"/> teilweise Teppich (1m <sup>2</sup> ), teilweise glatte Oberfläche (2m <sup>2</sup> ) <input type="checkbox"/> anderes: ...
Letzte Reinigung der Probefläche	Wann wurde in diesem Raum das letzte Mal Staub entfernt?  Tage seit der letzten Reinigung: ...  Wie wurde er gereinigt?  <input type="checkbox"/> gesaugt <input type="checkbox"/> feucht gewischt <input type="checkbox"/> gewischt <input type="checkbox"/> anderes: ...
Haustiere	Befindet sich mindestens einmal pro Woche eine Katze oder ein Hund in diesem Raum?  Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/>  Katze <input type="checkbox"/> Hund <input type="checkbox"/>
Saugen	1) Filterhalter aus der Plastiktüte, Schutzdeckel entfernen, auf Staubsaugeraufsatz montieren Saugzeit 4 Minuten, bei Mischproben von zwei verschiedenen Räumen und/oder Oberflächen: Saugzeit jeweils 2 Minuten 2) Stoppuhr. Staubkopf fast vertikal mit regelmässigen Bewegungen führen 3) Probenahmekopf senkrecht nach oben halten, Staubsauger abschalten. Filterhalter mit Schutzdeckel verschliessen, verpacken 4) Probenahmekopf mit einem trockenen Staublappen inwändig gründlich reinigen

Anmerkungen: ...

## Stall

Wahl des Stalles	Wie viele Ställe besitzen Sie? In welchem Stall hält sich das Kind am häufigsten auf?  Falls sich das Kind in mehreren Ställen gleich häufig aufhält, wird eine Mischprobe aus beiden Ställen genommen. Schuhe wechseln für in den Stall!
Wahl der Oberflächen	Wo im Stall hält sich das Kind am häufigsten auf?  Ausgewählt werden können Simse, Kuhtrainer-Gestänge, Tablare, Schemel, Ablageflächen... Alle Flächen zwischen 0,5-1,5 Metern Höhe über Boden, auf denen sich Staub über längere Zeit angesammelt hat
Probenahme	1) Oberflächen mit einem Metallspatel abkratzen und durch das Sieb in den Aluminiumbecher sieben. 2) Der erste gesammelte Staub wird verworfen, damit Sieb und Becher keine Kontamination mit früheren Proben erfahren 3) Artefakte ausschliessen, dann den gesammelten Staub in die beschriftete Plastiktüte verfrachten, gut verschliessen

## Checkliste für den Hausbesuch

- 1) Ernährungsfragebogen: Wenn er noch nicht ausgefüllt ist, frankiertes Rückantwortcouvert abgegeben mit der Aufforderung, den Fragebogen noch heute auszufüllen und zurückzusenden
  - 2) Interview mit Zusatzfragebogen zur Luftmessung (Klebeetikette: ID-Nr. Zusatzfragen alle)
  - 3) Matratzenprobe, Protokoll ausgefüllt (Klebeetiketten: ID-Nr. Probenprotokoll, Filterhalter-Nr.)
  - 4) Probe im Wohnbereich, Protokoll ausgefüllt (Klebeetikette: Filterhalter-Nr.)
- Bei Bauernfamilien:**
- 5) Stallprobe (Klebeetikette: ID-Nr. Stall auf Plastiktüte)
  - 6) Interview mit Zusatzfragebogen zum Stall (Klebeetikette: ID-Nr. Zusatzfragen Bauern)?
  - 7) Milchprobe

### **13.) Quellenverzeichnis**

#### **13.1) Literatur**

1. Stachan D, Sibbald B, Weiland S, Ait-Khaled N, Anabwani G, Anderson HR, et al. Worldwide variations in prevalence of symptoms of allergic rhinoconjunctivitis in children: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Pediatr Allergy Immunol* 1997;8:161-76.
2. Emanuel MB. Hay fever, a post industrial revolution epidemic: a history of its growth during the 19<sup>th</sup> century. *Clin Allergy* 1988;18:295-304.
3. von Mutius E, Martinez FD. Epidemiology of childhood asthma. In: Murphy S, Kelly HW, editors. *Lung biology in health and disease: pediatric asthma*. New York: Marcel Dekker;1999. p 1-39.
4. Woolcock AJ, Peat JK. Evidence for the increase in asthma worldwide. In: Chadwick DJ, Cardew G. *The rising trends in asthma*. Chichester: John Wiley;1997. p 122-34. Ciba Foundation Symposium No.:206.
5. International Study of Asthma and Allergies in Childhood Steering Committee. Worldwide variations in the prevalence of atopic diseases: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Lancet* 1998;351:1225-32.
6. Barnes KC, Marsh DG. The genetics and complexity of allergy and asthma. *Immunol Today* 1998;19:325-32.
7. Rose G. *The strategy of preventive medicine*. Oxford: Oxford University Press; 1992.
8. Burrows B, Martinez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline MG. Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med* 1989;320:271-7.
9. Romagnani S. Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in

- protection and immunopathology. *Int Arch Allergy Immunol* 1992;98:279-85.
10. von Mutius E, Nicolai T. Familial aggregation of asthma in a South Bavarian population. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996;153:1266-72.
  11. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ, et al. Asthma and wheezing in the first six years of life. *N Engl J Med* 1995;332:133-8.
  12. von Mutius E. Air pollution and asthma. In: Bousquet J, Yssel H, editors. *Lung biology in health and disease: immunotherapy in asthma*. New York: Marcel Dekker; 1999.p497-534.
  13. von Mutius E, Fritzsche C, Weiland SK, Roell G, Magnussen H. Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison. *BMJ* 1992;305:1395-9.
  14. von Mutius E, Martinez FD, Fritzsche C, Nicolai T, Roell G, Thiemann HH. Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:358-64.
  15. Nowak D, Heinrich J, Jörres R, Wassmer G, Berger J, Beck E, et al. Prevalence of respiratory symptoms, bronchial hyperresponsiveness and atopy among adults: West and East Germany. *Eur Respir J* 1996;9:2541-52.
  16. Braback L, Breborowicz A, Dreborg S, Knutsson A, Pieklik H, Björkstén B. Atopic sensitization and respiratory symptoms among Polish and Swedish school children. *Clin Exp Allergy* 1994;24:826-35.
  17. Braback L, Breborowicz A, Julge K, Knutsson A, Riikajarv MA, Vasar M, et al. Risk factors for respiratory symptoms and atopic sensitization in the Baltic area. *Arch Dis Child* 1995;72:487-93.
  18. Salvi S, Frew AJ, Holgate ST. Is diesel a cause for increasing allergies? *Clin Exp Allergy* 1999;29:4-8.



19. Salvi S, Holgate ST. Mechanism of particulate matter toxicity. *Clin Exp Allergy* 1999;29:1187-94.
20. Knox RB, Suphioglu C, Taylor P, Desai R, Watson HC, Peng JL, et al. Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clin Exp Allergy* 1997;27:246-51.
21. Diaz-Sanchez D, Tsien A, Fleming J, Saxon A. Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a helper cell 2-type pattern. *J Immunol* 1997;158:2406-13.
22. Terada N, Maesako K, Hiruma K, Hamano N, Houki G, Konno A, et al. Diesel exhaust particulates enhance eosinophil adhesion to nasal epithelial cells and cause degranulation. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;114:167-74.
23. Diaz-Sanchez D, Dotson AR, Takenaka H, Saxon A. Diesel exhaust particles induce local IgE production in vivo and alter the pattern of IgE messenger RNA isoforms. *J Clin Invest* 1994;94:241-7.
24. Wjst M, Reitmeir P, Dold S, Wulff A, Nicolai T, von Loeffelholz-Colberg E, et al. Road traffic and adverse effects on respiratory health in children. *BMJ* 1993;307:596-600.
25. Nitta H, Sato T, Nakai S, Maeda K, Aoki S, Ono M. Respiratory health associated with exposure to automobile exhaust, I: results of cross-sectional studies in 1979, 1982, and 1983. *Arch Environ Health* 1993;48:53-8.
26. Oosterlee A, Drijver M, Lebret E, Brunekreef B. Chronic respiratory symptoms in children and adults living along streets with high traffic density. *Occup Environ Med* 1996;53:241-7.

27. Edwards J, Walters S, Griffiths RK. Hospital admissions for asthma in preschool children: relationship to major roads in Birmingham, United Kingdom. *Arch Environ health* 1994;49:223-7.
28. Pershagen G, Rylander E, Norberg S, Eriksson M, Nordvall SL. Air pollution involving nitrogen dioxide exposure and wheezing bronchitis in children. *Int J Epidemiol* 1995;24:1147-53.
29. Ishizaki T, Koizumi K, Ikemori R, Ishayama Y, Kushibiki E. Studies of prevalence of Japanese cedar pollinosis among the residents in a densely cultivated area. *Ann Allergy* 1987;58:265-70.
30. Hirsch TH, Weiland SK, von Mutius E, Safeca AF, Gräfe H, Csaplovics E, et al. Inner city air pollution and respiratory health and atopy in children. *Eur Respir J*. 1999;14:669-77.
31. Brunekreef B, Janssen NA, de Hartog J, Harsssema H, Knape M, von Vliet P. Air pollution from truck traffic and lung function in children living near motorways. *Epidemiology* 1997;8:298-303.
32. Linn WS, Avol EL, Shamoo DA, Spier CE, Valencia LM, Venet TG, et al. A dose-response study of healthy, heavily exercising men exposed to ozone at concentrations near the ambient air quality standard. *Toxicol Ind Health* 1986;2:99-112.
33. Weinmann GG, Bowes SM, Gerbase MW, Kimball AW, Frank R. Response to acute ozone exposure in healthy men: results of a screening procedure. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:33-40.
34. Horstman DH, Folinsbee LJ, Ives PJ, Abdul-Salaam S, McDonnell WF. Ozone concentration and pulmonary response relationships for 6.6-hour exposures with five hours of moderate exercise to 0.08, 0.10, and 0.12 ppm. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:1158-63.

35. Hazucha MJ. Relationship between ozone exposure and pulmonary function changes. *J Appl Physiol* 1987;62:1671-80.
36. Linn WS, Medway DA, Anzar UT, Valencia LM, Spier CE, Tsao FSd, et al. Rersistence of adaptation to ozone in volunteers exposed repeatedly for six weeks. *Am Rev Respir Dis* 1982;125:491-5.
37. Farrell BP, Kerr HK, Kulle TJ, Sauder LR, Young JL. Adaptation in Human subjects to the effects of inhaled ozone after repeated exposure. *Am Rev Respir Dis* 1979;119:725-30.
38. McDonnell WF, Horstman DH, Abdul-Salaam S, Raggio LJ, Green JA.. The respiratory responses of subjects with allergic rhinitis to ozone exposure and their relationship to nonspecific airway reactivity. *Toxicol Ind Health* 1987;3:507-17.
39. Dimeo MJ, Glenn MG, Holtzman MJ, Sheller JR, Nadel JA, Boushey HA. Treshold concentration of ozone causing an increase in bronchial reactivity in humans and adaptation with repeated exposures. *Am Rev Respir Dis* 1981;124:245-8.
40. Folinsbee LJ, Horstman DH, Kehrl HR, Harder S, Abdul-Salaam S, Ives PJ. Respiratory responses to repeated prolonged exposure to 0.12 ppm ozone. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:98-105.
41. Kulle TJ, Sauder LR, Kerr HD, Farrell BP, Bermel MS, Smith DM. Duration of pulmonary function adaptation to ozone in humans. *Am Ind Hyg Assoc J* 1982;43:832-7.
42. Basha MA, Gross KB, Gwizdala CJ, Haidar AH, Popovich J. Bronchoalveolar lavage neutrophilia in asthmatic and healthy volunteers after controlled exposure to ozone and filtered purified air. *Chest* 1994;106:1757-65.
43. Koren HS, Bevlin RB, Graham DE, Mann R, McGee MP, Horstman DH, et al. Ozone-

- induced inflammation in the lower airways of human subjects. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:407-15.
44. Devlin RB, McDonnell WF, Mann R, Becker S, House DE, Schreinemachers D, et al. Exposure of humans to ambient levels of ozone for 6.6 hours causes cellular and biochemical changes in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1981;4:72-81.
  45. Aris RM, Christian D, Hearne PQ, Kerr K, Finkbeiner WE, Balmes JR. Ozone-induced airway inflammation in human subjects as determined by airway lavage and biopsy. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:1363-72.
  46. Scannell C, Chen L, Aris RM, Tager I, Christian D, Ferrando R, et al. Greater ozone-induced inflammatory responses in subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:24-9.
  47. Dockery DW, Speizer FE, Stram DO, Ware JH, Spengler JD, Ferris BG. Effects of inhalable particles on respiratory health of children. *Am Rev Respir Dis* 1989;139:587-94.
  48. Braun Fahrlander C, Vuille JC, Sennhauser FH, neu U, Kunzle T, Grize L, et al. Respiratory health and long-term exposure to air pollutants in Swiss schoolchildren, SCARPOL Team: Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution, Climate and Pollen. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1042-9.
  49. Detles R, Sayre JW, Coulson AH, Rokaw SN, Massey FJ, Tashkin DP, et al. The UCLA population studies of chronic obstructive disease, IV: respiratory effect of long-term exposure to photochemical oxidants, nitrogen dioxide and sulfates on current and never smokers. *Am Rev Respir Dis* 1981;124:873-80.
  50. Linn WS, Hackney JD, Pederson EE, Breisacher P, Patterson JV, Mulry A, et al.

Respiratory function and symptoms in urban office workers in relation to oxidant air pollution exposure. *Am Rev Respir Dis* 1976;114:477-83.

51. National Research Council. Environmental tobacco smoke: measuring exposures and assessing health effects. Washington (DC): National Academy Press;1986.
52. Cook DG, Strachan DP. Summary of effects of parental smoking on the respiratory health of children and implications for research. *Thorax* 1999;54:357-66.
53. Martinez FD, Cline M, Burrows B. Increased incidence of asthma in children of smoking mothers. *Pediatrics* 1992;89:21-26.
54. Neuspiel DR, Rush D, Butler NR, Golding J, Bijur PE, Kurzon M. Parental smoking and post-infancy wheezing in children: a prospective Cohort study. *Am J Public Health* 1989;79:168-71.
55. Ehrlich RI, Du Toit D, Jordaan E, Zwarenstein M, Potter P, Volmink JA, et al. Risk factors for childhood asthma and wheezing: importance of maternal and household smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:681-8.
56. Forastiere F, Agabiti N, Corbo GM, Pistelli R, Dell'Orco V, Ciappi G, et al. Passive smoking as a determinant of bronchial responsiveness in children. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:365-70.
57. Keeley DJ, Neill P, Gallivan S. Comparison of the prevalence of reversible airways obstruction in rural and urban Zimbabwean children. *Thorax* 1991;46:549-53.
58. Williams HC, Strachan DP, Hay RJ- Childhood exzema: disease of the advantaged? *BMJ* 1994;308:1132-5.
59. Strachan DP, Harkins LS, Johnston ID, Anderson HR. Childhood antecedents of allergic sensitization in young British adults. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:6-12.
60. Matricardi PM, Franzielli F, Franco A, Caprio G, Murru F, Cioffi D, et al. Sibship size,

- birth order, and atopy in 11,371 Italian young men. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:439-44.
61. Wade S, Weil C, Holden G, Mitchell H, Evans R III, Kruszon-Moran D, et al. Psychosocial characteristics of inner-city children with asthma, a description of the NCICAS psychosocial protocol: National Cooperative Inner-City Asthma Study. *Pediatr Pulmonol* 1997;24:263-76.
  62. Chandra RK. Prospective studies of the effect of breast feeding on incidence of infection and allergy. *Acta Paediatr Scand* 1979;68:691-4.
  63. Fergusson DM, Horwood JL, Shannon FT, Taylor B. Breast feeding, Gastrointestinal and lower respiratory illness in the first two years. *Aust Paediatr J* 1981;17:191-5.
  64. Zeiger RS, Heller S, Mellon M, O'Connor R, Hamburger RN. Effectiveness of dietary manipulation in the prevention of food allergy in infants. *J Allergy Clin Immunol* 1986;78:224-38.
  65. Chandra RK, Singh G, Shridhara B. Effect of feeding whey hydrolysate, soy and conventional cow milk formulas on incidence of atopic disease in high risk infants. *Ann Allergy* 1989;63:102-6.
  66. Zeiger RS, Heller S, Mellon MH, Forsythe AB, O'Connor RD, Hamburger RN, et al. Effect of combined maternal and infant food-allergen avoidance on development of atopy in early infancy: a randomized study. *J Allergy Clin Immunol* 1989;84:72-89.
  67. Halken S, Jacobsen HP, Host A, Holmenlund D. The effect of hypo-allergenic formulas in infants at risk of allergic disease. *Eur J Clin Nutr* 1995;49:S77-83.
  68. Zeiger RS, Heller S. The development and prediction of atopy in high-risk children: follow-up at age seven years in a prospective randomized study of combined maternal and infant food allergen avoidance. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:1179-90.
  69. Weiland SK, von Mutius E, Hüsing A, Asher MI. Intake of trans fatty acids and

prevalence of childhood asthma and allergies in Europe. *Lancet* 1999;353:2040-1.

70. Peat JK, Hodge L, Salome CM, Woolcock AJ. Dietary fish intake and asthma in children (abstract). *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(Suppl):A469.
71. Schwarz J, Weiss ST. The relationship of dietary fish intake to level of pulmonary function in the first National Health and Nutrition Survey (NHANES I). *Eur Respir J* 1994;7:1821-4.
72. Weiss St. Diet as a risk factor for asthma. In: *The rising trends in asthma*. Chichester: John Wiley: 1997. p 244-53. Ciba Foundation Symposium No.:206.
73. Carey OJ, Locke C, Cookson JB. Effect of alterations of dietary sodium on the severity of asthma in men. *Thorax* 1993;48:714-8.
74. Lau S, Falkenhorst G, Weber A, Werthmann I, Lind P, Buettner-Goetz P, et al. High mite-allergen exposure increases the risk of sensitization in atopic children and young adults. *J Allergy Clin Immunol* 1989;84:718-25.
75. Kuehr J, Frischer T, Meinert R, Barth R, Forster J, Schraub S, et al. Mite allergen exposure is a risk for the incidence of specific sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:44-52.
76. Wahn U, Lau S, Bergmann R, Kulig M, Forster J, Bergmann K, et al. Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:763-9.
77. Sporik R, Holgate ST, Platts-Mills TAE, Cogswell JJ. Exposure to house dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood: a prospective study. *N Engl J Med* 1990;323:502-7.
78. Charpin D, Birnbaum J, Hadi E, Genard G, Lanteaume A, Toumi M, et al. Altitude and

- allergy to house-dust mites: a paradigm of the influence of environmental exposure on allergic sensitization. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:983-6.
79. Sporik R, Ingram JM, Price W, Sussman JH, Honsinger RW, Platts-Mills TAE. Association of asthma with serum IgE and skin test reactivity to allergens among children living at high altitude: tickling the dragon's breath. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1388-92.
  80. Halonen M, Stern DA, Wright AL, Taussig LM, Martinez FD. Alternaria as a major allergen for asthma in children raised in a desert environment. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1356-61.
  81. Peat JK, Woolcock AJ. Sensitivity to common allergens: relation to respiratory symptoms and bronchial hyperresponsiveness in children from three different climatic areas of Australia. *Clin Exp Allergy* 1991;21:573-81.
  82. Strachan DP, Harkins LS, Golding J, ASSPAC Study Team. Sibship size and self-reported inhalant allergy among adult women. *Clin Exp Allergy* 1997;27:151-5.
  83. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989;299:1259-60.
  84. Strachan DP, Taylor EM, Carpenter G. Family structure, neonatal infection, and hay fever in adolescence. *Arch Dis Child* 1996;74:422-6.
  85. Räsänen M, Laitinen T, Kaprio J, Koskenvuo M, Laitinen LA. Hay fever, asthma and number of older siblings-a twin study. *Clin Exp Allergy* 1997;27:515-8.
  86. Jarvis D, Chinn S, Luczynska C, Burney P. The association of family size with atopy and atopic disease. *Clin Exp Allergy* 1997;27:240-5.
  87. Olesen AB, Ellingsen Ar, Olesen H, Juul S, Thestrup-Pedersen K. Atopic dermatitis and birth factors: historical follow up by record linkage. *BMJ* 1997;314:1003-8.
  88. Golding J, Peters T. The epidemiology of childhood exzema, I: a population based



- study of associations. *Pediatr Perinat Epidemiol* 1987;1:67-79.
89. Taylor B, Wadsworth M, Golding J, Butler N. Breast feeding, eczema, asthma and hay fever. *J Epidemiol Commun Health* 1983;37:95-9.
  90. von Mutius E, Martinez FD, Fritsch C, Nicolai T, Reitmeir P, Ghiemann HH. Skin test reactivity and number of siblings. *BMJ* 1994;308:692-5.
  91. Strachan DP, Harkins LS, Johnston IDA, Anderson HR. Childhood antecedents of allergic sensitization in young British adults. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:6-12.
  92. Nowak D, Heinrich J, Jörres R, Wassmer G, Berger J, Beck E, et al. Prevalence of respiratory symptoms, bronchial hyperresponsiveness and atopy among adults; West and East Germany. *Eur Respir J* 1996;9:2541-52.
  93. Forastiere F, Agabiti N, Corbo GM, Dell'Orco V, Porta D, Pistelli R, et al. Socioeconomic status, number of siblings, and respiratory infections in early life as determinants of atopy in children. *Epidemiology* 1997;8:566-70.
  94. Matricardi PM, Rosmini F, Ferrigno L, Nisini R, Rapicetta M, Chionne P, et al. Cross sectional retrospective study of prevalence of atopy among Italian military students with antibodies against hepatitis A virus. *BMJ* 1997;314:999-1003.
  95. Matricardi PM, Franzinelli F, Franco A, Caprio G, Murru F, Cioffi D, et al. Sibship size, birth order, and atopy in 11,371 Italian young men. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:439-44.
  96. Sunyer J, Anto JM, Kogevinas M, Barcelo MA, Soriano JB, Tobias A, et al. Risk factors for asthma in young adults. *Eur Respir J* 1997;10:2490-4.
  97. Rona RJ, Duran-Tauleria E, Chinn S. Family size, atopic disorders in parents, asthma in children, and ethnicity. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:454-60.
  98. Crane J, Pearce N, Shaw R, Fitzharris P, Mayes C. Asthma and having siblings. *BMJ*

1994;309:272.

99. Lewis S, Richards D, Bynner J, Butler N, Britton J. Prospective study of risk factors for early and persistent wheezing in childhood. *Eur Respir J* 1995;8:349-56.
100. Price JF. Acute and long-term effects of viral bronchiolitis in infancy. *Lung* 1990;168(Suppl):414-21.
101. Long CE, McBride JT, Hall CB. Sequelae of respiratory syncytial virus infections: a role for intervention studies. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1678-81.
102. Sims D, Downham M, Gardner P, Webb J, Weightman D. Study of 8 year old children with a history of RSV bronchiolitis in infancy. *BMJ* 1978;1:11-4.
103. Pullen CR, Hey EN. Wheezing, asthma and pulmonary dysfunction 10 years after infection with respiratory syncytial virus in infancy. *BMJ* 1982;284:1665-9.
104. Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Halonen M, Taussig LM, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999;354:541-5.
105. von Mutius E, Illi S., Hirsch T, Leupold W, Keil U, Weiland S. Frequency of infections in the first years of life and risk of asthma, atopy and airway hyperresponsiveness among schoolage children. *Eur Resp J* 1999;14:4-11.
106. Anderson HR. The epidemiological and allergic features of asthma in the New Guinea Highlands. *Clin Allergy* 1974;4:171-83.
107. Flynn MGL. Respiratory symptoms, bronchial responsiveness, and atopy in Fijian and Indian children. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:415-20.
108. Flynn MGL. Respiratory symptoms of rural Fijian and Indian children in Fiji. *Thorax* 1994;49:1201-4.

109. Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ, Barker DJP, Heyes CB, Shiell AW, et al. Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet* 1996;347:1792-6.
110. Matricardi PM, Rosmini F, Ferrigno L, Nisini R, Rapicetta M, Chionne P, et al. Cross sectional retrospective study of prevalence of atopy among Italian military Students with antibodies against hepatitis A virus. *BMJ* 1997;314:999-1003.
111. Krämer U, Heinrich J, Wjst M, Wichmann H-E. Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. *Lancet* 1998;352:450-4.
112. Martinez FD, Stern DA, Wright AL, Taussig LM, Halonen M, GHM Associates. Association of non-wheezing lower respiratory tract illnesses in early life with persistently diminished serum IgE levels. *Thorax* 1995;50:1067-72.
113. Wold AE. The hygiene hypothesis revised: is the rising frequency of allergy due to changes in the intestinal flora? *Allergy* 1998;53(46 Suppl):20-5.
114. Holt PG. Mucosal immunity in relation to the development of oral tolerance/sensitization. *Allergy* 1998;53(46 Suppl):16-9.
115. Braun-Fahrländer CH, Gassner M, Grize L, Neu U, Sennhauser FH, Varonier HS, et al. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmers children and their peers living in the same rural community. *Clin Exp Allergy* 1999;29:28-34.
116. von Ehrenstein O, von Mutius E, Illi S, Baumann L, Böhm O, von Kries R. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy* 2000;30(2):187-93.
117. Riedler J, Eder W, Oberfeld G, Schreuer M. Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitisation. *Clin Exp Allergy* 1999 in press.
118. Klintberg B, Berglund N, Lilja G et al. Fewer allergic respiratory disorders among farmers' children in a close birth cohort from Sweden. *Eur Respir J* 2001;17(6):1151-7.

119. Horak F, Studnicka M, Gartner C, Veiter A, Tauber E, Urbanek R, Frischer T. Parental farming protects children against atopy: longitudinal evidence involving skin prick test. *Clin Exp Allergy* 2002; 32(8):1155-9.
120. Kilpelainen M, Terho E, Helenius H, Koskenvuo M. Farm environment in childhood prevents the development of allergies. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:201-208.
121. Ernst P, Poulin M, Blouin M, Cornier Y. Indicators of asthma and atopy are less common among children living on a farm. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:A774.
122. Martinez FD. Maturation of immune responses at the beginning of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:355-61.
123. Holt PG, Sly PD, Björkstén B. Atopic versus infectious diseases in childhood: a question of balance? *Pediatr Allergy Immunol* 1997;8:53-8.
124. Baldini M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD. A polymorphism in the 5'-flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum IgE. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:976-83.
125. Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997;275:77-9.
126. Strannegard IL, Larsson LO, Wennergren G, Strannegard O. Prevalence of allergy in children in relation to prior BCG vaccination and infection with atypical mycobacteria. *Allergy* 1998;53:249-54.
127. Alm JS, Lilja G, Scheynius A. Early BCG vaccination and development of atopy. *Lancet* 1997;350:400-3.
128. Henderson J, North K, Griffiths M, Harvey I, Golding J. Pertussis vaccination and wheezing illnesses in young children, prospective cohort study: the Longitudinal Study

- of Pregnancy and Childhood Team. *BMJ* 1999;318:1173-6.
129. Nilsson L, Kjellman NI, Bjorksten B. A randomized controlled trial of the effect of pertussis vaccines on atopic disease. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1998;152:734-8.
  130. Farooqi IS, Hopkin JM. Early childhood infection and atopic disorder. *Thorax* 1998;53:927-32.
  131. Kemp T, Pearce N, Fitzharris P, Crane J, Fergusson D, St George I, et al. Is infant immunization a risk factor for childhood asthma or allergy? *Epidemiology* 1997;8:678-80.
  132. Alm JS, Swartz J, Lilja G, Scheynius A, Pershagen G. Atopy in children of families with an anthroposopic lifestyle. *Lancet* 1999;353:1485-8.
  133. Yemaneberhan H, Bekele Z, Venn A, Lewis S, Parry E, Britton J. Prevalence of wheeze and asthma and relation to atopy in urban and rural Ethiopia. *Lancet* 1997;350:85-90.
  134. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 1997;18:263-66.
  135. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF- $\beta$ . *Ann Rev Immunol* 1998;16:137-61.
  136. Daser A, Meissner N, Herz U, Renz H. Role and modulation of T cell cytokines in allergy. *Curr Opin Immunol* 1995;7:762-70.
  137. Renz H. Soluble interleukin-4 receptor (sIL-4R) in allergic diseases. *Inflamm Res* 1999;48:425-31.
  138. Herz U, Bunikowski R, Renz H. Role of T cells in atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;115:179-90.
  139. Weller PF. Role of eosinophils in allergy. *Curr Opin Immunol* 1992;4:782-87.

140. Kelly RW, Crickley HO. A Th-2 bias in decidua: the prostaglandin contribution of the macrophage and trophoblast. *J Reprod Immunol* 1997;33:181-87.
141. Roth J, Corry DB, Locksley RM, Abrams JS, Litton MJ, Fisher SJ. Human placental Cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J Exp Med* 1996;184:539-48.
142. Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ. 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;160:4730-37.
143. Renz H, Mazer B, Gelfand EW. Differential inhibition of T and B cell functions in IL-4 dependent IgE production by cyclosporin A and methylprednisolone. *Immunol* 1990;145:3641-46.
144. Warner JA, Miles EA, Jones AC, Quint DJ, Colwell BM, Warner JO. Is deficiency of interferon gamma production by allergen triggered care blood cells a predictor of atopic eczema? *Clin Exp Allergy* 1994;24:423-430.
145. Herz U, Ahrens B, Scheffold A, Joachim R, Radbruch A, Renz H. Impact of in utero Th2 immunity on T-cell deviation and subsequent immediate type hypersensitivity in the neonate. *Eur J Immunol* 2000;30:714-18.
146. Barnes PJ, Chung KF. Cytokines in Asthma. *Thorax* 1999;54:825-57.
147. Renz H, Gelfand EW. The central role of T cells in IgE regulation and bronchial hyperreactivity-a target for specific immunomodulation. In: Eibl, Huber, Peter, Wahn: Symposium in Immunology IV. Springer, Berlin 1995;33-48.
148. Carrigan CJ, Haczku A, Gemon-Engesaeth V, et al. CD4 T-lymphocyte activation in asthma is accompanied by increased serum concentrations of interleukin-5: effect of glucocorticoid therapy. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:540-7.
149. Lopez AF, Sanderson CJ, Gamble JR, et al. Recombinant human interleukin 5 is a

- selective activator of human eosinophil function. *J Exp Med* 1988;167:219-24.
150. Clutterbuck EJ, Hirst EM, Sanderson CJ. Human IL-5 regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6 and GM-CSF. *Blood* 1989;73:1504-12.
  151. Yamaguchi Y, Hayashi Y, Sugama Y, et al. Highly purified murine IL-5 stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil factor. *J Exp Med* 1988;167:1737-40.
  152. Iwama T, Nagai H, Suda H, et al. Effect of murine recombinant IL-5 on the cell population in guinea-pig airways. *Br J Pharmacol* 1992;105:19-22.
  153. Dent LA, Strath M, Mellor AL, et al. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. *J Exp Med* 1990;172:1425-31.
  154. Rathenberg ME, Ounbey R, Mehlhop PD, et al. Eotaxin triggers eosinophil-selective chemotaxis and calcium flux via a distinct receptor and induces pulmonary eosinophilia in the presence of IL-5 in mice. *Mol Med* 1996;2:334-48.
  155. Collins PD, Griffiths-Johnson DA, Jose PJ, et al. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin, to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med* 1995;182:1169-74.
  156. Shi H, Qin S, Huang G, et al. Infiltration of eosinophils into the asthmatic airways caused by interleukin 5. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;16:220-4.
  157. Shi HZ, Xiao CQ, Zhong D, et al. Effect of inhaled interleukin 5 on airway hyperreactivity and eosinophilia in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:204-9.

158. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse helper T cells. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989;170:2081.
159. Enk AH, Katz ST. Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10. *J Immunol* 1992;149:92-5.
160. Spits H, de Waal Malefyt R. Functional characterisation of human IL-10. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1992;99:9-15.
161. Berkaman N, John M, Roesens G, et al. Inhibition of macrophage inflammatory protein 1a by IL-10: differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 1995;155:4412-8.
162. Malefyt RdM, Haanen J, Spits H, et al. IL-10 and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II MHC expression. *J Exp Med* 1991;174:915-24.
163. Schandene L, Alonso Vega C, Willems F, et al. B7/CD 28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *J Immunol* 1994;152:4368-74.
164. Jeannin P, Leconet S, Delneste Y, et al. IgE versus IgG4 Produktion can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol* 1998;160:3555-61.
165. Trichieri G, Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 1995;13:251-6.
166. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from native CD4+ T cells. *J Immunol* 1995;154:5071-9.



167. Manetti R, Parranchi P, Giudizi MG, et al. Natural killer cell stimulatory factor (IL-12) induces Th1-specific immune response and inhibits the development of IL-4 producing Th cells. *J Exp Med* 1993;177:1199-204.
168. Kiniwa M, Gately M, Gubler V, et al. Recombinant IL-12 suppresses the synthesis of IgE by IL-4 stimulated human lymphocytes. *J Clin Invest* 1992;90:262-6.
169. von der Pouw Kraan TC, Boeijs LC, de Groot ER, et al. Reduced production of IL-12 and IL-12 dependent IFN- $\gamma$  release in patients with allergic asthma. *J Immunol* 1997;158:5560-5.
170. De Maeyer E, De Maeyer-Guignard J. Interferon- $\gamma$ . *Current Opiniiion in Immunology* 1992;4:321-6.
171. Dayton MA, et al. Human B cell lines express the interferon gamma gene. *Cytokine* 1992;4:454-60.
172. Romagniani S. Regulation and deregulation of human IgE synthesis. *Immunol Today* 1990;11:316-21.
173. Chomarat P, Rissoan MC, Banchereau J, et al. Interferon gamma inhibits interleukin 10 produktion by monocytes. *J Exp Med* 1993;177:523-7.
174. Donnelly RP, Freeman SC, Hayes MP. Inhibition of IL-10 expression by IFN-gamma up-regulates transcription of TNF-alpha in human monocytes. *J Immunol* 1995;155:1420-7.
175. Koning H, Neijens HJ, Baert MR, et al. T cell subsets and cytokines in allergic and non-allergic children. I. Analysis of IL-4, IFN-gamma and IL-13 mRNA expression and protein production. *Cytokine* 1997;9:416-26.
176. Lack G, Bradley KL, Hamelmann E, et al. Nebulized IFN-gamma inhibits the

- development of secondary allergic responses in mice. *J Immunol* 1996;157:1432-9.
177. Costa JJ, Matosson K, Resnick MB, et al. Human eosinophils can express the cytokines TNF- $\alpha$  and macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ . *J Clin Invest* 1993;91:2673-84.
  178. Devalia JL, Campell AM, Sapsford RJ, et al. Effect of nitrogen dioxide on synthesis of inflammatory cytokines expressed by human bronchial epithelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;9:271-8.
  179. Shah A, Church MK, Holgate ST. Tumor necrosis factor  $\alpha$ : a potential mediator for asthma. *Clin Exp Allergy* 1995;25:1038-44.
  180. Ying S, Robinson DS, Varney V, et al. TNF- $\alpha$  mRNA expression in allergic inflammation. *Clin Exp Allergy* 1991;21:745-50.
  181. Lichtman AH, Abbas AK, Pober JS. *Immunologie*. 1996;14-20, Verlag Hans Huber.
  182. Roitt HM, Brostoff J, Male DK: *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. 3 Auflage (1995); 2-10. Thieme Verlag.
  183. Hermann C, von Aulock S, Graf K, Hartung T. A model of human whole blood lymphokine release for in vitro and ex vivo use. In press.
  184. SAS, Inc I. Release 8.02. Cary NC USA.
  185. S-Plus. Math Soft. Seattle, WA USA, 2000.
  186. Hastie TJ, Tibshirani RJ: *Generalized Additive Models*; 1990, London: Chapman&Hall.
  187. Brabäck L, Däbvesten L. Urban living as a risk factor for atopic sensitization in Swedish schoolchildren. *Pediatr Allergy Immunol* 1991;2:14-9.

188. Björkstén B. Risk factors in early childhood for the development of atopic diseases. *Allergy* 1994;49:400-7.
189. Popp W, Zwick H, Steyrer K, Rauscher H, Wanke T. Sensitization to aeroallergens depends on environmental factors. *Allergy* 1989;44:572-5.
190. West MA, Heagy W. Endotoxin Tolerance: A review. *Crit Care Med* 2002;30:64-73.
191. Cook JA. Molecular basis of endotoxin tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 1998;851:426-428.
192. Cavillon JM. The nonspecific nature of endotoxin tolerance. *Trends Microbiol* 1995;3:320-324.
193. Johnston CA, Greisman SE. Mechanisms of endotoxin tolerance. In: *Pathophysiology of Endotoxin*. Proctor RA, Hinshaw LB (Eds). Amsterdam, Elsevier Science, 1985,359-401.
194. Greisman SE, Hornick RB. The nature of endotoxin tolerance. *Trans Am clin Climatol Assoc* 1975;86:43-50.
195. Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages.: Dysregulation of cytokine, chemokine, and Toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol* 2000;164:5564-5574.
196. Ferreira ME, Coelho MM, Pela IR: Role of the hepatic function in the development of the pyrogenic tolerance to muramyl dipeptide. *Am J Physiol* 2001;R162-R169.
197. Medvedev AE, Henneke P, Schromm A, et al. Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptors 2 or 4. *J Immunol*

2001;167:2257-2267.

198. Riedel DD, Kaufmann SH. Differential tolerance induction by lipoarabinomannan and lipopolysaccharide in human macrophages. *Microbes Infect* 2000;2:463-471.
199. Lehner MD, Morath S, Michelsen KS, et al. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol* 2001;166:5161-5167.
200. Englund MC, Karlsson AK, Wiklund O, et al. 25-Hydroxycholesterol induces lipopolysaccharide-tolerance and decreases a lipopolysaccharide-induced TNF-alpha secretion in macrophages. *Atherosclerosis* 2001;158:61-71.
201. Mengozzi M, Ghezzi P. Cytokine downregulation in endotoxin tolerance. *Eur Cytokine Netw* 1993;4:89-98.
202. Pitton C, Fitting C, van Deuren M, et al: Different regulation of TNF alpha and IL-1ra synthesis in LPS-tolerant human monocytes. *Prog Clin Biol Res* 1995;392:523-528.
203. Heagy W, Hansen C, Nieman K, et al. Impaired mitogen-activated protein kinase activation and altered cytokine secretion in endotoxin-tolerant human monocytes. *J Trauma* 2000; 49:860-814.
204. Ogata M, Okamoto K, Kohriyama K, et al. Role of interleukin-10 on hyporesponsiveness of endotoxin during surgery. *Crit Care Med* 2000;28:3166-3170.
205. Sfeir T, Saha DC, Astiz M, et al. Role of interleukin-10 in monocyte hyporesponsiveness associated with septic shock. *Crit Care Med* 2001; 29:129-133.
206. Karp CL, Wysocka M, Ma X, et al. Potent suppression of IL-12 production from monocytes and dendritic cells during endotoxin tolerance. *Eur J Immunol* 1998;28:3128-3136.
207. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired

immune response. *Science* 1996;272:50.

208. Lauener R, Birchler T, Adamski J, et al. Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers and non-farmers children. *Lancet* 2002;in press.
209. Schade U, Schlegel J, Hofmann K, Brade H, Flach R. Endotoxin tolerant mice produce an inhibitor of tumor necrosis factor synthesis. *Journal of Endotoxin Research* 1996;3:455-62.
210. Douwes J, Zuidhof A, Doekes G, et al. (1-->3)-beta-D-glucan and endotoxin in house dust and peak flow variability in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1348-54.
211. Park JH, Gold DR, Spiegelman DL, Burge HA, Milton DK. House dust endotoxin and wheeze in the first year of life. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:322-8.
212. Gereda JE, Leung DY, Thatayatikom A, et al. Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. *Lancet* 2000;355:1680-3.
213. Strachan DP, Butland BK, Anderson HR. Incidence and prognosis of asthma and wheezing illness from early childhood to age 33 in a national British cohort. *Bmj* 1996;312:1195-9.
214. Silverman M, Wilson N. Wheezing phenotypes in childhood. *Thorax* 1997; 52:936-7.
215. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med* 1995; 332:133-8.
216. Rylander R, Bake B, Fischer JJ, Helander IM. Pulmonary function and symptoms after inhalation of endotoxin. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140:981-6.
217. Tulic MK, Wale JL, Holt PG, Sly PD. Modification of the inflammatory response to allergen challenge after exposure to bacterial lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol*

Biol 2000; 22:604-12.

218. Ball T, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD. Siblings, day care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med*; 343:538-43.
219. Krämer U, Heinrich J, Wjst M, Wichmann HE. Age of entry to a nursery and allergy in later childhood. *Lancet* 1999; 353:450-54.
220. Park JH, Spiegelman DL, Burge HA, Gold DR, Chew GL, Milton DK. Longitudinal study of dust and airborne endotoxin in the home. *Environ Health Perspect* 2000; 108:1023-8.
221. Abou-Zeid C, Gares MP, Inwald J, et al. Induction of a type 1 immune response to a recombinant antigen from *Mycobacterium tuberculosis* expressed in *Mycobacterium vaccae*. *Infect Immun* 1997; 65:1856-62.
222. Cleveland MG, Gorham JD, Murphy TL, Tuomanen E, Murphy KM. Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway. *Infect Immun* 1996; 64:1906-12.
223. Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:437-57.
224. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1995; 154:5071-79.
225. Baldini M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD. A Polymorphism in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 gene levels and with total serum immunoglobulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20:976-83.
226. Kliman DM, Barnhart KM, Conner J. CpG motifs as Immune adjuvants. *Vaccine* 1999;

17:119-25.

### **13.2) Abbildungen**

1. Renz H. Bayerische Akademie der Wissenschaften: Allergie, eine Zivilisationskrankheit? Verlag Dr. Friedrich Pfeil;2001:27.
2. Renz H. Bayerische Akademie der Wissenschaften: Allergie, eine Zivilisationskrankheit? Verlag Dr. Friedrich Pfeil;2001:29.
3. Manetti R, Parranchi P, Giudizi MG, et al. Natural killer cell stimulatory factor (IL-12) induces Th1-specific immune response and inhibits the development of IL-4 producing Th cells. J Exp Med 1993; 177:1203.
4. Autoatlas special. Mairs Geographischer Verlag; 2001:69..
- 5 a-d. Eigene Untersuchungen
6. Eigene Untersuchungen
7. Eigene Untersuchungen
- 8 a-g. Eigene Untersuchungen
- 9 a-d. Eigene Untersuchungen
- 10a-d. Eigene Untersuchungen



### **13.2) Tabellen**

1. Renz H. Bayerische Akademie der Wissenschaften: Allergie, eine Zivilisationskrankheit? Verlag Dr. Friedrich Pfeil; 2001:26.
2. Eigene Angaben
3. Eigene Untersuchungen
- 4a-b. Eigene Untersuchungen
5. Eigene Untersuchungen
6. Eigene Untersuchungen
7. Eigene Untersuchungen
8. Eigene Untersuchungen
9. Eigene Untersuchungen

An dieser Stelle möchte ich Frau PD Dr. E. von Mutius, vom Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Überlassung des Themas und für die wertvolle Unterstützung der Arbeit meinen besten Dank aussprechen.

Des weiteren gilt mein Dank folgenden Personen, die mich auf verschiedene Weise bei meiner Arbeit unterstützt haben:

Prof. Dr. H. Renz

Prof. Dr. D. Nowak

PD Dr. U. Herz

PD Dr. T. Hartung

Dr. R. Schierl

Dr. S. Maisch

D. Carr

H. & M. Gerlach

Hanns-Seidel-Stiftung München e.V.

## Lebenslauf

Am 23. Juni 1974 wurde ich, Florian Gerlach, als Sohn des Dipl. Ingenieurs Peter Gerlach und seiner Ehefrau Dipl. Sozialpädagogin Helga Gerlach, geb. Rädcl, in München geboren.

Von 1985 bis 1994 besuchte ich das Gymnasium in Ottobrunn bei München. Nach Ableistung meines Zivildienstes studierte ich dreizehn Semester Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Am 26. April 2002 legte ich hier das medizinische Staatsexamen ab. Ich war Stipendiat der Hanns-Seidel-Stiftung München.

Mein Praktisches Jahr verbrachte ich in Kliniken in München, Kanada und den USA.

Ab dem 1. Januar 2003 bin ich an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg als Arzt im Praktikum tätig.