

Aus der Klinik für Pädiatrie  
mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Einfluss der frühkindlichen Zytokinproduktion auf die  
Entwicklung einer atopischen Dermatitis unter Berücksichtigung  
einer Intervention mit Pro-Symbioflor®“

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Ulrike Förster  
aus Hoyerswerda

Datum der Promotion: 04. September 2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abstrakt - Abstract</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
2.1	Das humane Immunsystem	8
2.1.1	Angeborenes und erworbenes Immunsystem	8
2.1.2	Zytokine	9
2.1.3	Th1- und Th2-Zellen	10
2.1.4	Regulatorische T-Zellen	12
2.1.5	Besonderheiten des kindlichen Immunsystems	13
2.2	Die atopische Dermatitis	14
2.2.1	Definition und Prävalenz der atopischen Dermatitis	14
2.2.2	Pathophysiologie und Immunologie der atopischen Dermatitis	15
2.2.3	Die Hygienehypothese	18
2.2.4	Einflussfaktoren auf die atopische Dermatitis	18
2.2.5	Prävention der atopischen Dermatitis	20
2.2.6	Effekte und Mechanismus von Endotoxinen (LPS)	21
2.3	Die PAPS-Studie - Bisherige Ergebnisse	22
2.4	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	24
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>26</b>
3.1	Studiendesign	26
3.1.1	Einschluss- und Ausschlusskriterien	26
3.1.2	Intervention mit Bakterienlysat	27
3.1.3	Studienvisiten	27

3.1.4	Vorliegende Parameter	28
3.2	Zytokine: Erhebung der Messdaten	30
3.2.1	Vorbereitung und Stimulation der Blutproben	30
3.2.2	Messung der Zytokintiter	31
3.3	Auswertung der Daten	32
3.3.1	Einschätzung der Confounder mittels DAG	32
3.3.2	Datensatz und Basalcharakteristik	35
3.3.3	Deskriptive Statistik der absoluten Zytokintiter	36
3.3.4	Bestimmung von Titerdifferenzen	38
3.3.5	Kategorisierung der Titerdifferenzen	39
3.3.6	Logistische Regression	40
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
4.1	Charakteristika der Studienpopulation	42
4.1.1	Charakteristik der Interventionsgruppen zum Einschlusszeitpunkt	42
4.1.2	Sensitivitätsanalyse der Erkrankungsgruppen	47
4.2	Absolute Zytokintiter	50
4.3	Zytokintiter-Differenzen	53
4.3.1	Absolute Titerdifferenzen nach Erkrankungsgruppen	53
4.3.2	Kategorisierte Titerdifferenzen (Shifts)	57
4.4	Einfluss des Zytokinprofils auf die Entwicklung einer atopischen Dermatitis - Regressionsmodelle	59
4.4.1	Kausaler Graph	60
4.4.2	Regressionsmodell V5	61
4.4.3	Regressionsmodell V7	65

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>69</b>
5.1	Studiendesign	69
5.2	Methodik zur Bestimmung der Zytokine	72
5.3	Zytokine und atopische Dermatitis	74
5.4	Unterschiede in der Varianz – geringere Plastizität des Immunsystems durch genetische Polymorphismen?	77
5.5	Zytokine und die Intervention mit Bakterienlysat	78
5.6	Atopische Dermatitis und Rauchverhalten der Mutter	79
5.7	Atopische Dermatitis und Geburtsgewicht	80
5.8	Atopische Dermatitis und Darmflora	80
5.9	Atopische Dermatitis und Eosinophilie	82
5.10	Zusammenfassung	82
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>94</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis	94
7.2	Abbildungsverzeichnis	96
7.3	Tabellenverzeichnis	97
7.4	Eidesstattliche Versicherung	100
7.5	Lebenslauf	101
7.6	Danksagung	103

# 1 Abstrakt

**Einleitung** Die atopische Dermatitis (AD), eine chronisch-rezidivierende entzündliche Hauterkrankung, zeigt weltweit eine zunehmende Prävalenz. Intensive Forschung soll die der AD zugrundeliegenden Mechanismen aufklären und neue Therapieoptionen hervorbringen. Neben genetischer Prädisposition, Umweltfaktoren und Dysregulation der Hautbarriere ist unter den immunologischen Parametern die Zytokinexpression von besonderem Interesse.

**Methodik** In einer randomisierten, placebo-kontrollierten Interventionsstudie zur Prävention atopischer Dermatitis in einer Hoch-Risiko-Population mit oraler Supplementierung eines spezifischen Bakterienlysats vom 2. bis 7. Lebensmonat werden die Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-5, IL-4, IL-2 von fast 500 Probanden aus Vollblutproben nach *in-vitro* Stimulation mit LPS, Der p1 oder OVA mittels Durchflusszytometrie am Anfang und Ende der Intervention sowie im Alter von 1 und 2 Jahren gemessen. Die Daten werden bezüglich der Interventions- und Erkrankungsgruppen verglichen. Es wird eine Regressionsanalyse durchgeführt, um neben den Zytokinen weitere bzw. andere die AD in der frühen Kindheit beeinflussende Faktoren wie den Geburtsmodus, das mütterliche Verhalten (Stillen, Rauchen) oder die intestinale Flora zu eruieren.

**Ergebnisse** Für die Gruppe der Probanden mit atopischer Dermatitis findet sich eine signifikante Erhöhung der Konzentration von IL-4 nach LPS-Stimulation im Alter von 7 Lebensmonaten. Gleiches gilt für den Titeranstieg von IL-4 zwischen dem 2. Lebensmonat und dem 2. Lebensjahr. Ein Titeranstieg von IL-10 im gleichen Zeitraum ist dagegen mit niedrigerer AD-Prävalenz assoziiert. Die Titer von IL-4 atopischer Probanden zeigen eine geringere Varianz, IL-5 dagegen sowohl mit 7 Monaten als auch 2 Jahren eine höhere Varianz im Vergleich zu Gesunden. Für IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  zeigen sich nach LPS-Stimulation keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Konzentrationen von IL-2 sind nicht auswertbar.

Als präventive Einflussfaktoren auf die atopische Dermatitis im Alter von 7 Monaten werden ein negativer IL-4-Shift, ein positiver IL-10-Shift, Rauchen der Mutter nach der Schwangerschaft sowie ein Eosinophilenscore  $< 5\%$  im 2. Lebensmonat identifiziert. Eine geringe AD-Prävalenz im Alter von 2 Jahren ist assoziiert mit einem negativen IL-4-Shift, einem positiven TNF- $\alpha$ -Shift, einem Eosinophilenscore  $< 5\%$  im 2. Lebensmonat sowie einer Kolonisation mit *Bacteroides fragilis*.

**Fazit** Zytokine als immunologische Marker beeinflussen die Prävalenz der atopischen Dermatitis. IL-4 als Th2-Zytokin und IL-10 als antiinflammatorisches Zytokin sind neben weiteren Faktoren wie Eosinophilie und intestinaler Flora mit atopischer Dermatitis in einer Hoch-Risiko-Population assoziiert. Als zugrundeliegende Mechanismen können genetische Variationen wie SNPs (single nucleotide polymorphisms – Einzelnukleotid-Polymorphismen) und epigenetische Phänomene angenommen werden, die weiterer Untersuchungen bedürfen.

## Abstract

**Introduction** Prevalence of atopic dermatitis (AD), a chronic relapsing inflammatory skin disease, has been increasing around the world. Intensive research is ongoing to understand the mechanisms involved in the development of AD, and to discover new treatment options for patients suffering from AD. In addition to genetic predisposition, environmental factors and skin barrier dysfunction, immunological parameters such as cytokine expression are of particular interest.

**Method** The current study is part of a randomized placebo-controlled trial on the prevention of AD in infants at high risk by oral application of a specific bacterial lysate between week five and the end of month seven after birth. Cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-5, IL-4, IL-2) of almost 500 infants are measured by flow cytometry analysis in whole blood samples after in vitro stimulation (lipopolysaccharides (LPS), house dust mite allergen (Der p1), ovalbumin (OVA)) at the beginning and end of intervention and at follow-up at the age of two years. Data are analyzed between intervention and disease groups (AD vs. non-AD) and logistic regression is performed to discover cytokines and other confounding parameters such as breastfeeding, smoking or the intestinal flora influencing the prevalence of atopic dermatitis in early childhood.

**Results** White blood cells of AD patients produce significantly higher amounts of IL-4 after LPS stimulation at month seven. An increase of IL-4 levels between month two and year two are associated with higher AD prevalence. Decrease of IL-10 during the same period leads to lower AD prevalence. Levels of IL-4 in atopic individuals show lower variances whereas IL-5 titer

display higher variances at month seven and year two. There are no statistical significant differences of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  levels in patients with AD and healthy individuals. A negative shift of IL-4, a positive shift of IL-10, an eosinophil score of less than 5% at month two and maternal smoking after pregnancy are found to be associated with lower prevalence of AD at seven months of age. Lower prevalence of AD at the age of two is associated with a negative shift of IL-4, a positive shift of TNF- $\alpha$ , an eosinophil score of less than 5% at month two and intestinal colonization with bacteroides fragilis. Intervention with bacterial lysate has no effect on cytokine levels.

**Conclusion** Cytokines as immunological markers are suggested to modulate the prevalence of atopic dermatitis. The pro-inflammatory Th2 cytokines IL-4 and IL-10, eosinophils, and the intestinal microbiota are associated with AD in a high risk population. Underlying mechanisms are likely genetic variations such as single nucleotide polymorphisms (SNPs) and epigenetic phenomena which need to be further investigated.

## 2 Einleitung

### 2.1 Das humane Immunsystem

#### 2.1.1 Angeborenes und erworbenes Immunsystem

Das Immunsystem erkennt Pathogene, Zellen, Fremdkörper und Substanzen durch unterschiedliche, miteinander kooperierende zelluläre und humorale Signalwege und ist durch große Dynamik und Komplexität gekennzeichnet. Die Basis bilden die sich funktionell ergänzenden Systeme der natürlichen, unspezifischen und der erworbenen, spezifischen Immunität. Die zentrale Funktion des angeborenen Immunsystems liegt in der Beseitigung von Erregern und ggf. Rekrutierung des erworbenen Immunsystems. Dazu wird keine vorausgegangene Exposition gegenüber denselben Antigenen benötigt, allerdings zeigt das angeborene Immunsystem auch keine Adaptation an spezifische Pathogene. Die antigenspezifische Antwort des erworbenen Immunsystems beruht auf der Erkennung dieser Stoffe durch komplexe Rezeptorsysteme, welche Lymphozyten aktivieren, die daraufhin proliferieren und sich zu Effektorzellen differenzieren. Bei erneuter Exposition reagiert das erworbene System schneller, stärker und spezifischer [1]. Weitere Vergleichsaspekte zeigt Tabelle 1.

**Tabelle 1: Merkmale des angeborenen und erworbenen Immunsystems [1]**

	unspezifische Immunität	spezifische Immunität
zelluläre Faktoren	Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, natürliche Killer-Zellen, dendritische Zellen	Lymphozyten
lösliche Faktoren	Komplementsystem, Akutphase-Proteine, von Monozyten/Makrophagen/dendritischen Zellen gebildete Zytokine	Antikörper, von Lymphozyten gebildete Zytokine
Reaktionszeit	sofortige Abwehr durch präformierte Effektorsysteme	verzögerte Abwehr
Rezeptoren	Spezifität über Genom vererbt	in mehreren Genabschnitten kodiert, müssen rekombiniert werden
Erkennung molekularer Strukturen	beschränkte Anzahl von konservierten, pathogen-assoziierten Mustern	theoretisch unbeschränkte Anzahl verschiedener Peptide
Folgen der Antigenerkennung	Bereitstellung von kostimulierenden Molekülen, Zytokinen und Chemokinen	klonale Expansion oder Anergie; Bereitstellung von Zytokinen und spezifischen Antikörpern

### 2.1.2 Zytokine

Zytokine sind von Zellen gebildete Proteine, die in ihrer Funktion als lösliche Botenstoffe ihre Wirkung über hochaffine und spezifische Rezeptoren auf den Oberflächen der Zielzellen entfalten. Die verschiedenen Zytokine nehmen in den Signalkaskaden des Immunsystems jeweils sehr unterschiedliche Aufgaben wahr, weisen eine Bandbreite von verschiedensten Funktionen auf (Pleiotropie des Zytokin-Systems) und können sich gegenseitig verstärken oder hemmen. Die Bindung von Zytokinen an den Rezeptor der Zielzelle kann verschiedene Veränderungen auslösen, wie zum Beispiel Wachstumsförderung oder -hemmung, Differenzierung oder den Tod der Zelle. Zu den Zytokinen zählen neben von Lymphozyten gebildeten Interleukinen (IL) auch Interferone (IFN), koloniestimulierende Faktoren (CSF) und Tumornekrosefaktoren (TNF) [2].

Die Zytokinproduktion im menschlichen Körper beginnt bereits vor der Geburt, ungefähr in der 22. Schwangerschaftswoche [3], und spielt eine entscheidende Rolle bei der Reifung des Immunsystems [4]. Sie ist abgesehen von Erkrankungen und Infektionen auch durch äußere Faktoren beeinflussbar, dazu gehören unter anderem Umweltgifte, Rauchen und/oder intensiver Sport [5].

Eine Auflistung der in dieser Arbeit untersuchten Zytokine mit ihrer Herkunft und Funktion zeigt Tabelle 2.

**Tabelle 2: Herkunft und Funktion ausgewählter Zytokine [2]**

Zytokin	Herkunftszellen	Wirkung auf Zielzellen
IL-2	T-Zellen	Proliferation von T-Zellen (T-Zell-Wachstumsfaktor)
IL-4	T-Zellen, MC	B-Zell-Aktivierung, IgE-Isotypenwechsel, T-Zellen: Th2-Aktivierung, Hemmung von Th1-Zellen und Makrophagen, Adhäsion: Aktivierung von VCAM-1 Expression
IL-5	T-Zellen, MC, Eos	Differenzierung, Reifung, Überleben, Chemotaxis, Adhäsion von Eosinophilen
IL-10	T-Zellen, Monozyten/ Makrophagen	Inhibition von Th1-Zytokin-Produktion, wirksamer Inhibitor von Makrophagenfunktionen, Stimulation von Th2- und Mastzellen

Zytokin	Herkunftszellen	Wirkung auf Zielzellen
IFN- $\gamma$	T-Zellen, NK-Zellen	Aktivierung von Makrophagen, erhöhte Expression von MHC-Molekülen und Komponenten des Antigenprozessierungssystems, B-Zell-Differenzierung: IgG2a/IgG4-Isotypen-Wechsel, inhibiert IgE-Produktion, T-Zell-Differenzierung: Th1-Aktivierung, inhibiert Th2- und Th3-Differenzierung
TNF- $\alpha$	Makrophagen, NK-Zellen, T-Zellen	Lokale Entzündung, Endothelaktivierung

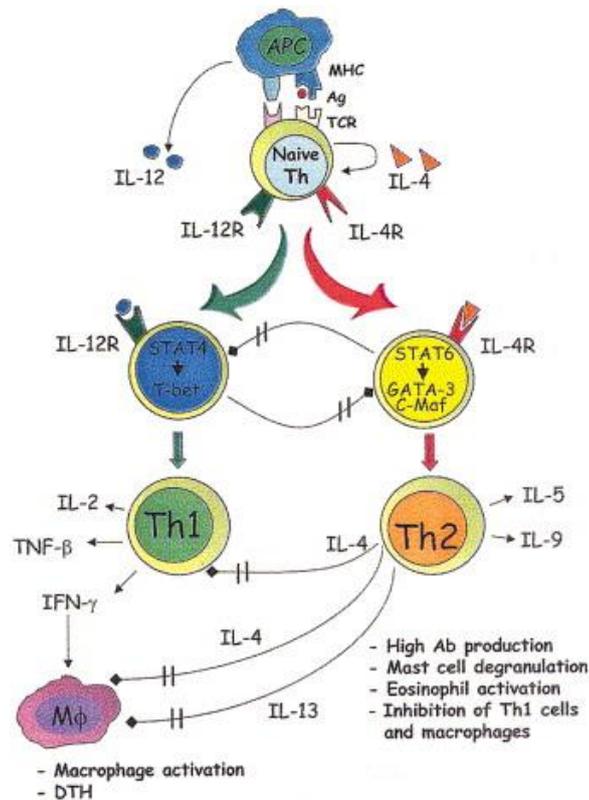
### 2.1.3 Th1- und Th2-Zellen

Antigene werden zunächst von antigenpräsentierenden Zellen (antigen presenting cell, APC), beispielsweise Langerhans-Zellen der Haut, phagozytiert, intrazellulär prozessiert und über Histokompatibilitätsantigene der Klasse II (major histocompatibility complex, MHC II) den T-Lymphozyten präsentiert. Die T-Zelle bindet über einen spezifischen T-Zell-Rezeptor an die APC und wird durch ein weiteres Signal über akzessorische Rezeptoren wie CD4, CD28 oder Integrine aktiviert [6], [2].

T-Zellen werden in verschiedene T-Zell-Effektortypen unterteilt. 1986 können im Mausmodell erstmals zwei verschiedene Klassen von T-Helferzellen (Th) unterschieden werden [7]. Ob sich eine naive Th0-Zelle in Richtung einer Th1- oder Th2-Zelle polarisiert, hängt von der Art des Antigens und der APC sowie vom Eintrittsort des Antigens in den Körper und dem Alter, in welchem der Erstkontakt erfolgt, ab (Tabelle 8) [8]. In Anwesenheit von IL-4 differenzieren Th0- in Th2-Zellen, werden Th0-Zellen hingegen mit IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , TGF- $\beta$  oder IL-12 inkubiert, entsteht ein Th1-Phänotyp [9]. Die Ausbildung eines bestimmten Th-Phänotyps ist irreversibel. Th1-Zellen sind charakterisiert durch die Expression der Zytokine IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\beta$ , führen zu einer zellulären Immunantwort mit Aktivierung von Makrophagen und inhibieren gleichzeitig eine Th1-Antwort [8]. Th2-Zellen dagegen führen zu einer humoralen Immunantwort, indem sie mit Immunglobulin-bildenden B-Zellen interagieren, und tragen zur Ausreifung eosinophiler Granulozyten und zur Mastzelldegranulation bei. Sie sind durch eine Ausschüttung von IL-4, IL-5 und IL-13 charakterisiert [10].

**Tabelle 3: Einteilung von T-Zellen nach ihrem Zytokinprofil [11]**

Typ	Zytokin-Profil
Th0	IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6
Th1	IL-2, IL-3, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha/\beta$ , GM-CSF
Th2	IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, GM-CSF



**Abbildung 1: Modell der Th1-/Th2-Polarisierung [10]**

Naive T-Helferzellen differenzieren in Abhängigkeit vom vorliegenden Zytokinprofil in Th1- oder Th2-Zellen.

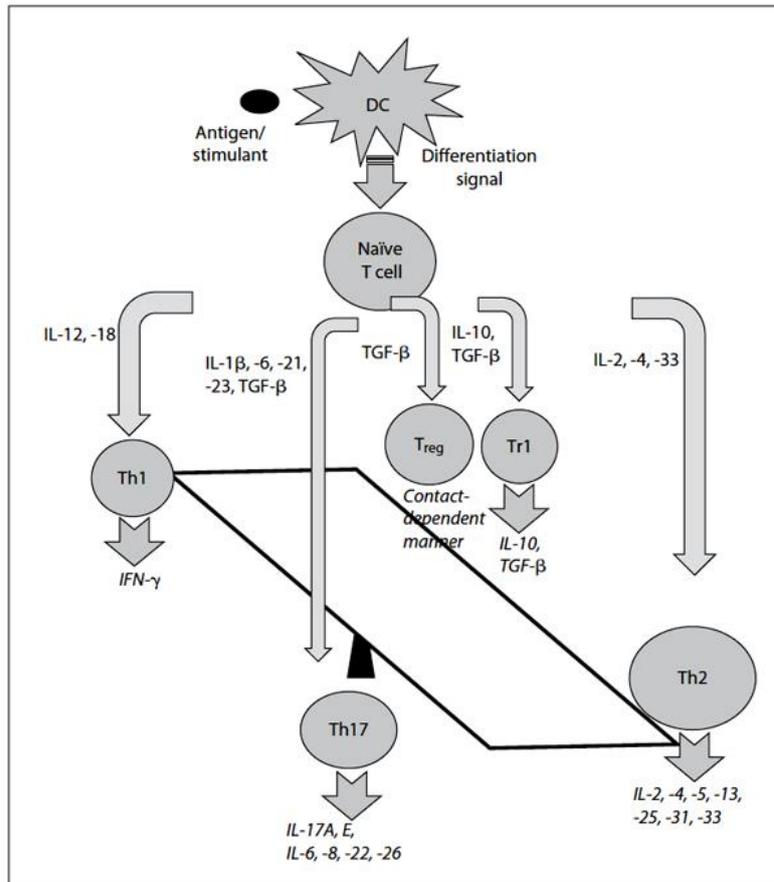
In einem gesunden Organismus befinden sich Th1- und Th2-Zellen in einem funktionellen Gleichgewicht. Dominiert einer der beiden Zelltypen, kann dies zu Autoimmunerkrankheiten (Th1-Dominanz) oder Krankheiten des atopischen Formenkreises (Th2-Dominanz) führen [10].

#### 2.1.4 Regulatorische T-Zellen

Eine Erweiterung erfährt das vereinfachte Th1/Th2-Modell durch den Nachweis sogenannter regulatorischer T-Zellen (Treg), die regulierend in das Gleichgewicht eingreifen. Zu den Treg gehören natürliche regulatorische T-Zellen, Tr1- und Th3-Zellen. Sie exprimieren inhibitorische Zytokine und unterdrücken überschießende Immunantworten [10].

Tregs sind CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die zunächst antigenunabhängig immunsuppressiv wirken (nTregs) und CD25, die IL-2R $\alpha$ -Kette, und den Transkriptionsfaktor forkhead box protein 3 (Foxp3) exprimieren. Nach Kontakt mit dem Fremdanigen in der Peripherie entstehen antigenspezifische Tregs (aTregs), die CD25 erst im Laufe ihrer Entwicklung und Foxp3 nur zum Teil und vor allem nach gleichzeitiger Aktivierung über CD3, CD28 und TGF- $\beta$  exprimieren. Solche aTregs werden nun auch über antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 durch antigen-präsentierende dendritische Zellen (dendritic cells, DCs) induziert. IL-10 und TGF- $\beta$ , die beide auch von aTregs produziert werden, induzieren im Weiteren über einen positiven Feedback-Mechanismus Toleranz vermittelnde DCs. Immunsuppressive und antiinflammatorisch wirkende Foxp3<sup>+</sup> aTregs entstehen unter spezifischer Immuntherapie (SIT) und können so durch eine verminderte allergenspezifische T-Zell-Proliferation und verstärkte Entwicklung IFN- $\gamma$  produzierender T-Zellen eine lebenslange Toleranz induzieren [12].

Die immer differenziertere Untersuchung der Regulationsmechanismen des Immunsystems führte zur Beschreibung weiterer T-Zell-Linien, so dass das Modell der Th1-/Th2-Dichotomie auf ein 4-Wege-Balance-System erweitert wurde, das neben Th1- und Th2-Zellen auch Tregs und Th17-Zellen umfasst [13]. Aufgrund der Vielzahl involvierter Mechanismen kann jedoch auch dieses nur modellhaften Charakter haben, weshalb einige Autoren bereits von diesen Modellsystemen abrücken [14].



**Abbildung 2: 4-Wege-Balance-System [13]** Erweiterung des dichotomen Th1/Th2-Modells: Naive T-Helferzellen differenzieren nach Aktivierung durch DCs in Abhängigkeit vom vorliegenden Zytokinprofil in Th1-, Th2-, Th17-Zellen oder Tregs.

### 2.1.5 Besonderheiten des kindlichen Immunsystems

Bei Neugeborenen findet sich eine erhöhte Anzahl von Th2-Zellen, verbunden mit entsprechender Produktion der Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-13 und dominiert von einer hohen Produktion an IL-10. Dies wird auf Th2-fördernde mütterliche Hormone *in utero* zurückgeführt und stellt einen Schutz vor plazenta-toxischem IFN- $\gamma$  dar. Ebenso zeigt sich eine fehlende Ausreifung von Th1-Zellen und antigen-präsentierenden Zellen [15]. Im Laufe des ersten Lebensjahres bildet sich bei später gesunden Kindern eine „antiallergische“ Th1-Immunreaktivität aus, während bei später atopisch belasteten Kindern die Th2-Reaktivität persistiert [16]. Mikrobielle Stimuli wie die bakterielle Besiedlung des Darms sind essentiell für die postnatale Reifung der Th1-Zellen [17].

## **2.2 Die atopische Dermatitis**

### **2.2.1 Definition und Prävalenz der atopischen Dermatitis**

Inzidenz und Prävalenz allergischer Erkrankungen haben insbesondere in den Industrienationen in den letzten Jahrzehnten rasant zugenommen. Die Prävalenz der atopischen Dermatitis (AD) stieg innerhalb der letzten 30 Jahre um das Zwei- bis Dreifache. 15 bis 30% der Kinder sowie 2 bis 10% der Erwachsenen sind betroffen. In 45% der Fälle entwickelt sich die AD bereits im ersten Lebenshalbjahr, in 60% innerhalb des ersten Lebensjahres und in 85% bis zum Ende des 4. Lebensjahres. Für bis zu 70% der Kinder ist eine spontane Remission im Laufe der Kindheit zu erwarten [18]. Der wichtigste Risikofaktor für das Auftreten einer AD ist eine positive Familienanamnese [19].

Die AD als einer der Hauptvertreter des atopischen Formenkreises ist definiert als chronisch rezidivierende Entzündung der Haut, die sich oft schon im frühen Säuglingsalter manifestiert und mit starkem Juckreiz einhergeht. Damit ist es die früheste atopische Manifestation mit der höchsten Prävalenz in den ersten vier Lebensjahren. Leitsymptome der AD sind die trockenen, stark juckenden, erythematösen, teils papulösen entzündlichen Hautveränderungen. Im Säuglingsalter sind insbesondere Gesicht, Hals und die Streckseiten der Extremitäten betroffen, wobei später vor allem die Beugen, Handgelenke und Füße die Prädilektionsstellen darstellen. Bei genetisch prädisponierten Kindern tritt das Ekzem oft schon unmittelbar nach der Neonatalperiode auf. Ungefähr ein Drittel dieser Kinder mit AD entwickelt ebenfalls eine Sensibilisierung gegen Nahrungsmittel, ein Viertel davon eine klinisch manifeste Nahrungsmittelallergie. Im Laufe der Erkrankung kommt es bei einem Teil der Patienten zum langsamen Abklingen der Ekzemschübe, bei anderen treten sie bis ins Erwachsenenalter auf. Einige Patienten treten den so genannten „atopischen Marsch“ an und entwickeln zusätzlich ein Asthma bronchiale und/oder eine allergische Rhinokonjunktivitis [20].

Zur Diagnosestellung der AD bei Kindern und Erwachsenen dienen die Kriterien nach Hanifin und Rajka (1980); es sollten jeweils drei der Haupt- und Nebenkriterien erfüllt sein, dann gilt die Diagnose als gesichert ([21], modifiziert nach [22]).

- Hauptkriterien:**
1. Juckreiz und Exkorationen
  2. Ekzem mit typischer Morphologie und Verteilung
  3. chronischer und/oder rezidivierender Verlauf
  4. persönliche oder Familienanamnese für atopische Erkrankungen

- Nebenkriterien:**
- a) objektive klinische Symptome
  - b) subjektive klinische Symptome
  - c) immunologische Abweichungen, Typ I
  - d) immunologische Abweichungen, Typ IV
  - e) funktionelle Anomalien
  - f) Anomalien des Auges und seiner Umgebung

Der Schweregrad der AD wird anhand des SCORAD-Score gemessen, in den der prozentuale Anteil der betroffenen Hautfläche, die Schwere der Entzündung sowie subjektive Symptome wie Stärke des Juckreizes und Beeinträchtigung des Schlafes einfließen [23].

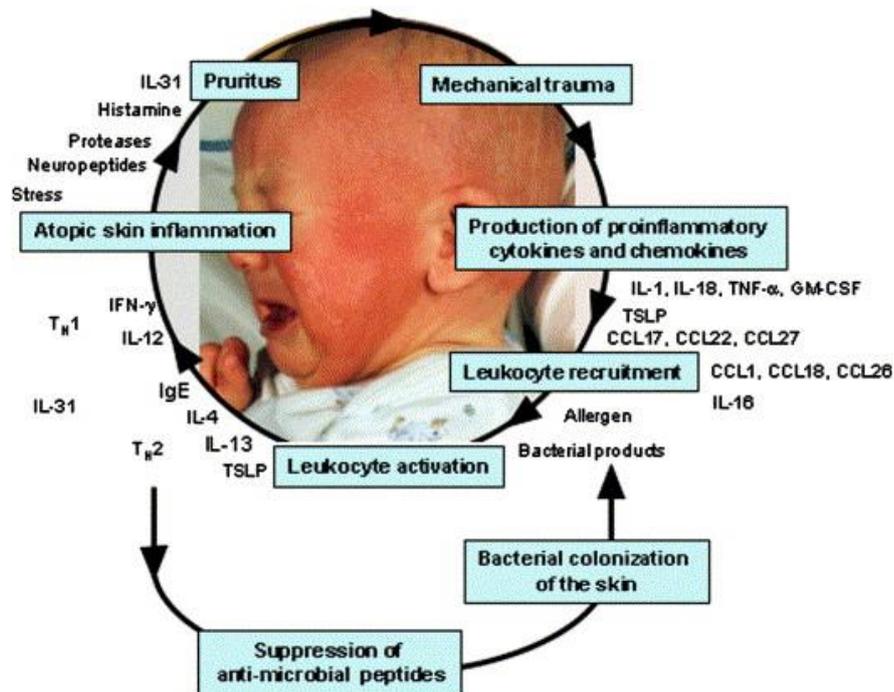
Innerhalb der AD werden zwei Typen unterschieden: die extrinsische AD ist durch hohe Konzentration von spezifischem IgE gegen Umwelt- oder Nahrungsmittelallergene gekennzeichnet, während bei intrinsischer oder nichtallergischer AD spezifische Sensibilisierungen fehlen und keine Assoziation mit Atemwegserkrankungen besteht [24].

### **2.2.2 Pathophysiologie und Immunologie der atopischen Dermatitis**

Juckreiz ist eines der Hauptsymptome der AD. Die betroffenen Patienten kratzen sich, was zu einer mechanischen Verletzung der Haut und daraus resultierend zur Produktion proinflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-18, TNF- $\alpha$ , und GM-CSF) und Chemokine (CCL27) führt [25]. Zusammen mit Adhäsionsmolekülen leiten weitere Chemokine (CCL1, CCL11, CCL18, CCL22, CCL26 und CCL27) Leukozyten zur Haut. Innerhalb der Haut werden die verschiedenen T-Zell-Subgruppen auf unterschiedlichen Wegen aktiviert [26].

(1) Memory-T-Zellen erkennen ihr spezifisches Antigen bzw. Allergen oder ein bakterielles Superantigen; (2) Zytokine von Epithelzellen aktivieren DCs zur Differenzierung von Th2-Zellen [27]; (3) DCs binden antigen-spezifische IgE-Komplexe und zeigen eine verstärkte Antigenpräsentation; (4) antigen-spezifische IgE-Komplexe induzieren Fc $\epsilon$ -Rezeptoraggregation

und aktivieren Mastzellen; und (5) Effektorzytokine (IL-4 und IL-13) von aktivierten Th2-Zellen unterdrücken die Produktion von antimikrobiellen Peptiden (humanes  $\beta$ -Defensin 2 und 3) [26]. Viren, Pilze und Bakterien (z.B. Staphylococcus aureus) nutzen den Vorteil der verringerten Menge an antimikrobiellen Peptiden in bzw. auf der Haut atopischer Patienten, kolonisieren diese und setzen proinflammatorische Produkte (z.B. Superantigene, Proteoglycan und Lipoteichoic acid) frei, welche wiederum die Leukozytenaktivierung beeinflussen und verstärken. Die Aktivierung von Leukozyten führt zu einer verstärkten Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Zytokinen (IL-31) und Proteasen (Trypsinase), die zusammen mit Stress-induzierten Neuropeptiden den Juckreiz aufrechterhalten [28].



**Abbildung 3: Circulus vitiosus der Entzündung bei atopischer Dermatitis [28]:** Das Kratzen bei Juckreiz führt zu einem mechanischen Trauma und Störung der Hautbarriere, die zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine mit nachfolgender Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten führt. Die lokale Entzündung verstärkt wiederum den Juckreiz und begünstigt eine bakterielle Kolonisation.

Als immunologische Grundlage dieses Geschehens bzw. der Entwicklung atopischer Erkrankungen wird nach dem vereinfachten Th1-/Th2-Dichotomie-Modell eine Th1/Th2-Imbalance zugunsten von Th2 angesehen, verbunden mit den entsprechenden Zytokinprofilen [10]. So wurde eine erhöhte Produktion von IL-4 und IL-13 bei der AD belegt und bereits im Nabelschnurblut später atopischer Patienten nachgewiesen [29]. In chronischen Hautläsionen können erhöhte Titer der Th-1-Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-12 gefunden werden, während sich in akuten Läsionen Th-2-Zytokine finden lassen [13]. Neben der Th1/Th2-Imbalance wird eine Verminderung von Tregs als weitere mögliche Ursache für die Entwicklung atopischer Erkrankungen beschrieben [30]. Zudem wird aktuell der Einfluss von spezialisierten dendritischen Zellen und neu identifizierten T-Helfer-Zell-Subpopulationen wie Th17- und Th22-Zellen untersucht und diskutiert.

Die verschiedenen Effektor-T-Zell-Subpopulationen exprimieren eine Vielzahl pro-inflammatorischer Zytokine und stellen den Gegenpart zu den IL-10-bildenden anti-inflammatorischen, immunmodulierenden Tregs dar. IL-9 und IL-9-Rezeptoren sind in AD-Hautläsionen im Vergleich zu gesunder Haut signifikant erhöht, zudem sind einige Polymorphismen in IL-9- und IL9-Rezeptor-Genen mit AD assoziiert. Die Rolle von IL-17 und IL-17-produzierenden T-Zellen ist Gegenstand von Diskussionen und zeigt verschiedene Ergebnisse. IL-22-produzierende Zellen sind dagegen mit dem Schweregrad der AD verknüpft. Die Anzahl und Funktion von Tregs ist umfassend untersucht worden, allerdings mit widersprüchlichen Resultaten. Andere Studien zeigen einen Einfluss von hohen IL-31-Titern bzw. niedrigen IL-21-Titern auf die Pathogenese der AD [31].

Neben immunologischen Ursachen wird auch eine Vielzahl genetischer Veränderungen beschrieben. Für einen Teil der Probanden mit atopischer Dermatitis wird z.B. eine genetisch prädestinierte gestörte epitheliale Hautbarriere (loss-of-function-Mutationen im Filaggrin-Gen) als Hauptursache angesehen [14]. Filaggrin-Null-Mutationen sind signifikant mit atopischem Ekzem und begleitendem bzw. im Sinne des atopischen Marsches nachfolgendem Asthma bronchiale assoziiert [32]. Bei gleichzeitigem Vorliegen einer Sensibilisierung gegen Nahrungsmittelallergene bei Kindern mit AD erlaubt die Genotypisierung von Filaggrin-Mutationen sogar eine Vorhersage der Entwicklung von Asthma noch vor dem Eintreten von Atemwegssymptomen [33].

### **2.2.3 Die Hygienehypothese**

Die ansteigende Prävalenz von Erkrankungen des atopischen Formenkreises war und ist Gegenstand zahlreicher Studien. Aus der Beobachtung heraus, dass ein inverser Zusammenhang zwischen der Prävalenz von Heuschnupfen bei Kindern und der Anzahl älterer Geschwister besteht, wurde die Hygienehypothese entwickelt [34]: Der Kontakt mit Umweltallergenen stellt einen protektiven immunmodulatorischen Effekt dar. Gesteigerte Hygienemaßnahmen in Industrienationen führen zu einer verminderten Exposition gegenüber Antigenen. Der fehlende Stimulus für die Entwicklung des Immunsystems mit Antigenen führt dann zu einer Imbalance und damit zur Zunahme allergischer Erkrankungen. Als zugrundeliegende Mechanismen spielen bakterielle und virale Infektionen, die Exposition mit nichtinvasiven Mikroben und der Einfluss beider auf das Immunsystem eine Rolle [35]. Durch eine verminderte mikrobielle Exposition kommt es zu einem Ausbleiben der Th1-Aktivierung und damit zu einem über die Neonatalperiode hinaus persistierenden Übergewicht der Th2-Immunantwort. Darüber hinaus führt die verminderte Exposition gegenüber mikrobiellen Antigenen zu einer verminderten Induktion toleranzvermittelnder Tregs [10].

Die Beobachtung, dass Kinder, die auf Bauernhöfen aufwachsen, im Vergleich zu Stadtkindern deutlich niedrigere Prävalenzen für allergische Erkrankungen aufweisen, wird auf höhere Expositionen mit Endotoxinen durch den frühzeitigen Kontakt mit der Viehwirtschaft und damit im Zusammenhang stehender weiterer Faktoren (Stroh, Staub, Bakterien, Pilze) zurückgeführt [36], [37]. Endotoxine (Lipopolysaccharide, LPS) sind Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien, die die Produktion von IL-12 durch Monozyten und Makrophagen induzieren, welches wiederum die Differenzierung von Th0- zu Th1-Lymphozyten fördert [38]. Dieser Mechanismus ist Grundlage für die Idee des präventiv-therapeutischen Einsatzes natürlich vorkommender Th1-induktiver Immunmodulatoren, wie z.B. LPS.

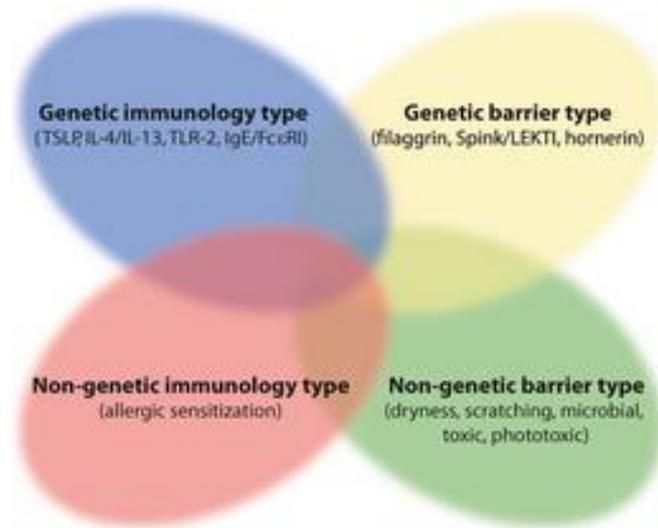
### **2.2.4 Einflussfaktoren auf die atopische Dermatitis**

Neben den genetischen Faktoren spielen Umwelteinflüsse, Infektionen und Lebensgewohnheiten eine entscheidende Rolle bei der Entstehung atopischer Erkrankungen.

Als Risikofaktoren der AD gelten vor allem eine positive Heredität (mindestens ein Elternteil mit atopischer Manifestation), weitere atopische Erkrankungen wie allergische Rhinokonjunktivitis oder Asthma, eine allergische Sensibilisierung gegen Nahrungsmittel- oder Umweltallergene

sowie ein hoher sozioökonomischer Status [19]. Unter den Umwelteinflüssen spielen Innenraumallergene, Staubexposition [19] und Passivrauchen [39], [40] eine Rolle. Einen protektiven Effekt zeigen die Gegenwart älterer Geschwister, der Besuch einer Kindertagesstätte [41], Haustierhaltung [42], Infektionen und Impfungen sowie Stillen in den ersten vier Lebensmonaten [43]. Einen Einfluss zeigt auch die intestinale Flora (Kinder mit AD zeigen eine geringere Kolonisation mit Clostridium cluster IV bzw. Faecalibacteriae mit konsekutivem Übermaß an Enterobacteriaceae [44]) und dadurch vermittelt auch Geburtsmodus und Geburtsort (häusliche vaginale Entbindungen sind im Gegensatz zu vaginalen Entbindungen im Krankenhaus mit einer geringeren AD-Prävalenz verknüpft, vermittelt durch eine intestinale Kolonisation mit Clostridium difficile [45]). Des Weiteren spielen Ernährungsgewohnheiten als Kofaktoren eine Rolle bei der Prävalenz der AD. Ausschließliches Stillen für 4 Monate mit anschließender Gabe von teilhydrolysiertes Formulanahrung, Beikosteführung nach dem 4. Lebensmonat und Meiden von Ei und Fisch bis zum 1. Geburtstag können die AD-Prävalenz bei Hoch-Risiko-Kindern senken [46]. Auch der Vitamin-D-Status zeigt einen Einfluss. AD-Patienten mit niedrigem Vitamin-D-Spiegel weisen eine erhöhte Rate an bakteriellen Hautinfektionen auf; unter Vitamin-D-Supplementierung zeigt sich eine anhand des SCORAD gemessene niedrigere Krankheitsaktivität [47]. Bei Erwachsenen spielt auch das Geschlecht eine Rolle; Frauen erkranken häufiger an AD als Männer [19]. Für einige Parameter (Infektionen, Tierhaltung) ist bereits ein pränataler Einfluss nachweisbar.

Zusammenfassend kann die Pathogenese der AD anhand von vier Aspekten bildlich beschrieben werden (Abbildung 4). Sie kann durch genetische Prädisposition (oben), Umweltfaktoren (unten), Unterbrechung der Hautbarriere (links) oder ein hyperreagibles Immunsystem (rechts) verursacht werden. Jeder Aspekt für sich kann eine AD auslösen, in der Mehrzahl der Fälle ist jedoch eine Kombination mehrerer Faktoren verantwortlich [14].



**Abbildung 4: Heterogenität der atopischen Dermatitis [14]**

Die Pathogenese der AD beruht auf einem Zusammenspiel zwischen genetischer Prädisposition, Umweltfaktoren, Unterbrechung der Hautbarriere und hyperreagiblem Immunsystem.

### 2.2.5 Prävention der atopischen Dermatitis

Diese epidemiologischen Beobachtungen stellen unter anderem die Grundlage für die gegenwärtige Entwicklung einer Reihe primär und/oder sekundär präventiver Strategien insbesondere für Kinder mit einem erhöhten Atopierisiko dar. Ansatzpunkt ist vor allem die physiologische Rolle der Darmflora auf die postnatale Entwicklung des Immunsystems, so dass eine Beeinflussung der intestinalen Flora über die Ernährung eine vielversprechende und für die Kinder wenig belastende Interventionsmöglichkeit darstellen könnte [48]. Der Einsatz von Präbiotika (nicht verdaubare Nahrungskomponenten, z.B. Oligosaccharide) und Probiotika (lebende Mikroorganismen, z.B. Laktobazillen oder Bifidobakterien) ist Gegenstand intensiver Forschung sowohl zur Prävention als auch Therapie der AD. Für Probiotika wurde nachgewiesen, dass sie die Zusammensetzung der intestinalen Flora beeinflussen und einen immunmodulatorischen Effekt zeigen können. Klinische Studien mit Kindern ergaben unterschiedliche Ergebnisse, die Mehrheit untersuchte Hochrisiko-Populationen und postuliert sowohl einen positiven protektiven als auch therapeutischen Effekt [49], [50]. Präbiotika zielen darauf ab, das intestinale Ökosystem zugunsten einer gesundheitsfördernden Zusammensetzung zu beeinflussen. Oligosaccharide sind natürlicher Bestandteil z.B. der Muttermilch und können als künstlicher Zusatz zu Formulanahrung die Inzidenz der atopischen Dermatitis senken [48], [51].

Eine prophylaktische Gabe von Oligosacchariden im ersten Lebenshalbjahr führte bei Säuglingen genetisch vorbelasteter Eltern zu einer Reduktion des Auftretens atopischer Erkrankungen (AD, Atemwegsobstruktion, allergische Urtikaria) sowie von Infektionen [52]. Eine Kombination von Prä- und Probiotika, sogenannte Synbiotics, zeigten widerstreitende Ergebnisse, die sehr abhängig von der verwendeten Substanzkombination sind [53], [54].

Auf einen präventiven Effekt zielen auch Ernährungsempfehlungen ab, die ausschließliches Stillen bis mindestens zum Alter von 4 Monaten und anschließende Gabe von teilhydrolysiertes Formulanahrung in Kombination mit Einführung von Beikost nach dem 4. Monat und Meiden von Ei und Fisch bis zum 12. Monat beinhalten [46]. Der Einsatz von Rohmilch anstelle von verarbeiteter Milch wird kontrovers diskutiert [55].

Als immunmodulatorische Einzelkomponente organischer Stäube wurde insbesondere der Effekt der Lipopolysaccharide in zahlreichen tierexperimentellen und klinischen Studien untersucht [56], [36].

### **2.2.6 Effekte und Mechanismus von Endotoxinen (LPS)**

In bisherigen Untersuchungen variiert die immunogene Wirkung der Endotoxine in hohem Maße. Hohe Expositionsdosen induzieren eine Th1-Immunantwort und neutrophile Inflammation, geringe Dosen lösen dagegen eine Th2-Immunantwort aus und können eine allergische Entzündung verstärken. Der mögliche protektive Effekt der Endotoxine auf allergische Erkrankungen geht wahrscheinlich auf eine kontinuierliche Exposition mit einer hohen Dosis noch vor Manifestation der allergischen Erkrankung zurück. Die Dosisangaben sind relativ und Schwellendosen für die jeweilige Immunantwort bisher nicht quantifiziert [57]. Im Mausmodell verhinderte die bereits pränatal begonnene und postnatal fortgeführte Exposition mit LPS eine allergische Sensibilisierung und Atemwegsentzündung in den Nachkommen, immunologisch zeigte sich ein Wechsel von einer Th2- zu einer überwiegenden Th1-Immunantwort. Der Mechanismus dieses primär präventiven LPS-Effektes wurde auf die gleichzeitige Induktion der LPS-Rezeptoren lipopolysaccharid-bindendes Plasmaprotein (LPS-binding protein, LBP), CD14 und toll-like receptor (TLR-)4 sowie des Th1-kontrollierenden Transkriptionsfaktors T-bet zurückgeführt [58]. Die intranasale Applikation von LPS bei Balb/c-Mäusen im Alter von 2 bis 3 Wochen führte zu einer transienten bronchialen Hyperreagibilität, verbunden mit erhöhtem Nachweis von Neutrophilen und Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavage, allerdings nicht

von IFN- $\gamma$  oder IL-4. Auf die anschließende allergische Provokation fiel die Reaktion jedoch schwächer aus, was eine protektive Wirkung auf eine allergen-induzierte Atemwegsdysfunktion vermuten lässt [59].

Die immunogene Wirksamkeit wird neben Dosis, Dauer und Frequenz der Exposition auch von gleichzeitigen Koexpositionen mit z.B. Allergenen oder mikrobiellen Substanzen beeinflusst. Eine wesentliche Rolle spielt auch die genetische Variabilität der Suszeptibilität des Organismus auf Endotoxine, speziell werden Polymorphismen für CD14 und TLR-4 genannt [60], [61].

Endotoxine binden im Plasma an LBP sowie an den löslichen und zellmembrangebundenen Rezeptor CD14. Durch Aktivierung des Rezeptors TLR-4 führen Endotoxine zur Induktion einer Signaltransduktionskaskade, an deren Ende die Aktivierung des regulatorischen Gens NF-k-B steht. Dies führt wiederum zur Aktivierung der Gene für proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL2, IL-6 und IL-12. Die beiden Trägermoleküle LBP und CD14 wirken durch Komplexbildung mit TLR-4 katalysierend auf die Induktion dieser Signaltransduktion [62].

Die orale Applikation des auch in dieser Arbeit verwendeten spezifischen Bakterienlysats zeigte eine mit LPS vergleichbare Wirkung auf das Genexpressionsprofil immunologischer Parameter. Es führte im Tiermodell zu erhöhter Produktion von IL-10, geringerer allergischer Sensibilisierung (reduzierte spezifische IgE- und IgG-Titer) und verringerter intestinaler Permeabilität [63]. Das Bakterienlysat enthält neben LPS-ähnlichen Strukturen auch Muramyl-dipeptide, Lipoteichonsäure und bakterielle DNA, die auch unabhängig voneinander das Immunsystem beeinflussen können [64].

### **2.3 Die PAPS-Studie - Bisherige Ergebnisse**

Anhand einer randomisierten, placebokontrollierten, doppelblinden klinischen Studie wurde der mögliche primär präventive Effekt des Bakterienlysats Pro-Symbioflor<sup>®</sup> auf die Entwicklung einer AD bei Säuglingen mit atopisch vorbelastetem Elternpaar untersucht. PAPS steht für “Prophylaxe atopischer und allergischer Manifestationen und Aktivierung bzw. Modulation körpereigener Abwehrkräfte durch Pro-Symbioflor<sup>®</sup> bei Säuglingen mit atopisch vorbelasteten Eltern“.

Pro-Symbioflor<sup>®</sup> ist ein Bakterienlysat aus *Enterococcus faecalis* und *Escherichia (E.) coli*, befindet sich seit 1954 im Handel und wird zur Regulierung der körpereigenen Abwehrkräfte und bei funktionellen Störungen des Magen-Darm-Traktes sowie bei Reizdarmsyndrom (Colon

irritable) eingesetzt [65]. Das Medikament ist für die Anwendung bei Säuglingen ab einem Alter von 4 Wochen zugelassen.

606 Säuglinge wurden in die PAPS-Studie eingeschlossen, von denen 303 das Verum und 303 das Placebo erhielten. 526 Probanden (253 Verum / 273 Placebo) konnten bis zum Ende der Intervention im 7. Lebensmonat und 487 (237 Verum / 250 Placebo) bis zum Studienende am Ende des 3. Lebensjahres ausgewertet werden (Tabelle 4). 299 Probanden hatten eine einfache, 305 eine doppelte Atopie-Heredität. [66]

**Tabelle 4: Elterliche Atopie-Anamnese (nach [66])**

Familiäre Atopie Anamnese			Häufigkeiten	
			Verum (N=303)	Placebo (N=303)
Auswertbare Atopieanamnese	n	Väter	302	302
		Mütter	303	303
		Elternpaare	302	302
Elterliche Atopie Heredität	n (%)	Doppelt	148 (48,8)	157 (51,8)
		Einzeln	154 (50,8)	145 (47,9)
		Nur Mutter	79 (26,1)	85 (28,1)
		Nur Vater	75 (24,8)	60 (19,8)
		Fehlt	1 (0,3)	1 (0,3)
Elterliche Atopie Grunderkrankung			Verum (N=303)	Placebo (N=303)
Mutter	n (%)	Atopisches Ekzem	117 (38,6)	109 (36,0)
		Allergische Rhinitis	171 (56,4)	194 (64,0)
		Allergisches Asthma	89 (29,4)	99 (32,7)
		Gesamtzahl Ekzem + Rhinitis + Asthma	377	402
Vater	n (%)	Atopisches Ekzem	55 (18,2)	65 (21,2)
		Allergische Rhinitis	204 (62,0)	189 (58,9)
		Allergisches Asthma	70 (21,3)	67 (20,9)
		Gesamtzahl Ekzem + Rhinitis + Asthma	329	321
Cochran-Mantel-Haenszel-Test auf Unterschied zwischen elterlichem Geschlecht				
Atopisches Ekzem:			p=0,0000 ***	
Allergische Rhinitis			p=0,0824	
Allergisches Asthma:			p=0,0011 **	

In der gesamten Studiengruppe fand sich kein Unterschied zwischen der Verum- und Placebogruppe im Hinblick auf die primäre Zielgröße, der AD-Prävalenz zum Ende der Intervention im Alter von 31 Wochen (17,2 vs. 20,8%). In der Subgruppe der Kinder mit einfacher Atopie-Heredität war jedoch die AD-Prävalenz zu diesem Zeitpunkt signifikant reduziert (relatives Risiko 0.52; 95% CI 0.3-0.9). Zehn Prozent (15/154) der Kinder in der Verumgruppe entwickelten eine AD verglichen mit 19% (27/154;  $p=0.031$ ) in der Placebogruppe. Dies zeigte sich noch deutlicher in der Subgruppe der Kinder mit einfacher väterlicher Atopie-Heredität (11% vs. 32%,  $p=0.004$ ; relatives Risiko, 0.34; 95% CI, 0.2-0.7) [66]. Für die Subgruppe mit einfacher Heredität konnte eine Kosteneffektivität der prophylaktischen Behandlung bis zum Ende der Beobachtungszeit von 3 Jahren nachgewiesen werden [67].

Nach quantitativer DNA-Analyse von Bifidobacteria, Bacteroides fragiles, Lactobacilli, E. coli, Clostridium difficile und Clostridium cluster I im Stuhl ließ sich in der multivariaten Analyse ein Effekt von Geburtsmodus, Stillverhalten und Geschwisterreihenfolge auf die Zusammensetzung der Darmflora belegen. Mit zunehmender Anzahl älterer Geschwister zeigte sich im Alter von 5 Lebenswochen eine ansteigende Kolonisation mit Lactobacilli ( $p<0.001$ ) und Bacteroides fragiles ( $p=0.02$ ), jedoch eine abnehmende Kolonisation mit Clostridien ( $p<0.001$ ). Ein Nachweis von Clostridien war mit einem erhöhten Risiko einer atopischen Dermatitis assoziiert; dies galt sowohl für das Alter von 5 Wochen (OR 2.35; CI 1.36 – 3.94) als auch von 31 Wochen (OR 2.51; CI 1.30 – 4.86). Zudem fand sich ein indirekter Zusammenhang zwischen einer Kolonisation mit Clostridium cluster I, Geburtsmodus, Geschwisterreihenfolge und AD. Somit könnte die veränderte Darmflora in Gegenwart älterer Geschwister den protektiven Effekt der Geschwister auf eine atopische Erkrankung erklären [68].

## **2.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Als Teil der PAPS-Studie soll die vorliegende Arbeit klären, ob sich die beschriebenen Effekte des Bakterienlysats auf die Prävalenz der AD auch auf immunologischer Ebene finden lassen. Der Nachweis eines immunmodulatorischen Effekts beim Menschen, der eine Senkung der Prävalenz allergischer Erkrankungen nach sich zieht, würde einen weiteren Schritt hin zu neuen präventiven Therapiekonzepten darstellen. Unter den Kriterien der immunologischen Wirkung steht für die vorliegende Arbeit die Induktion bzw. Verstärkung einer Th1-Immunantwort (Expression von IFN- $\gamma$  und IL-2) und/oder die mögliche Suppression einer Th2-Immunantwort im Fokus der

Untersuchung. Analysiert werden die im Rahmen der PAPS-Studie erhobenen Messwerte der Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-5, IL-4 sowie IL-2 im Zusammenhang mit den klinischen Daten. Auf die nach aktuellem Stand der Forschung mögliche Rolle der regulatorischen T-Zellen kann nur bedingt eingegangen werden, da diese bei Studienbeginn 2002 noch nicht im Zentrum des Interesses lag, die Untersuchung regulatorischer T-Zellen methodisch für eine Studie dieses Umfangs nicht zur Verfügung stand, und damit auch die Datenerhebung nicht darauf ausgerichtet war.

Konkret sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss hat die Intervention mit Pro-Symbioflor<sup>®</sup> auf die Entwicklung des Zytokinprofils in den ersten zwei Lebensjahren?
2. Wie entwickelt sich das Zytokinprofil bei den gesunden und kranken Kindern im Verlauf der ersten zwei Lebensjahre?
3. Welchen Einfluss hat das Zytokinprofil auf die Entwicklung einer AD? Spielen weitere bzw. andere Faktoren eine Rolle?

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Studiendesign**

Die Studie wird als monozentrische, randomisierte, placebo-kontrollierte, doppelblinde Studie (Registrierungsnummer ISRCTN60475069) mit Säuglingen mit familiär erhöhtem Atopierisiko durchgeführt, wobei mindestens ein Elternteil betroffen sein muss. Die Probanden stammen vorwiegend aus dem Großraum Berlin.

Primäre Zielgröße ist die mögliche prophylaktische Wirkung von Pro-Symbioflor<sup>®</sup> gegenüber Placebo auf die Entwicklung einer atopischen Dermatitis am Ende der Interventionsphase im Alter von 7 Monaten. Kriterium für eine Manifestation ist das Zutreffen des „Major“-Kriteriums nach Hanifin und Rajka, modifiziert nach Sampson [66].

Die Studie wird entsprechend den Vorschriften des Deutschen Arzneimittelgesetzes (AMG), weiterhin unter Beachtung der Deklaration von Helsinki (revidiert im Oktober 2000 in Edinburgh, Schottland), der EC-Richtlinie zur Guten Klinischen Praxis (EC-GCP), und der konsolidierten ICH-Richtlinie zur Good Clinical Practice (ICH-GCP) durchgeführt. Die Studie erhält im Februar 2002 ein positives Votum der zuständigen unabhängigen Ethik-Kommission des Charité Universitätsklinikums – Medizinische Fakultät der Humboldt Universität Berlin. Sponsoren sind die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG HA 2162/4-1) und der Hersteller des Prüfpräparates, die SymbioPharm GmbH (Herborn, Deutschland, SY 2001/1).

Die Rekrutierung beginnt im Mai 2002, die Studie wird nach Abschluss aller Visiten im November 2010 entblindet [69]. Das Daten-Clearing und -management unter Einschluss der Zusammenführung der laborchemischen mit den klinischen Daten ist im Oktober 2013 abgeschlossen; zu diesem Zeitpunkt steht ein Gesamtdatensatz für die sekundären Analysen und damit auch für diese Arbeit bereit.

#### **3.1.1 Einschluss- und Ausschlusskriterien**

Eingeschlossen werden gesunde männliche oder weibliche reifgeborene Säuglinge (Gewicht  $\geq 2500\text{g}$  / Geburt  $> 37+0$  Schwangerschaftswochen), die eine positive atopische Anamnese bei mindestens einem Elternteil aufweisen. Unter Atopie werden die atopische Dermatitis, Asthma bronchiale und die allergische Rhinokonjunktivitis zusammengefasst. Die Kinder müssen gesund sein, außer einer ggf. transienten Hyperbilirubinämie dürfen keine relevanten Erkrankungen seit

der Geburt aufgetreten sein. Die Eltern bzw. die gesetzlichen Vertreter müssen ihr Einverständnis schriftlich erklärt haben.

Ausgeschlossen werden Probanden, die eine positive Anamnese bezüglich immunologischer Einflussfaktoren aufweisen. Dazu gehören Erkrankungen, die eine immunmodulatorische Therapie (systemische Verabreichung von Steroiden oder Ciclosporin A) erforderlich machen, bekannte Immunstörungen oder -defekte (Lymphopenie, Thrombopenie) oder eine positive Familienanamnese für eine angeborene Abwehrschwäche. Eine Verlegung auf eine Intensivstation nach der Geburt führt ebenso zum Ausschluss wie die Notwendigkeit einer medikamentösen Behandlung; ausgenommen ist die prophylaktische Gabe von Vitamin D und/oder Fluor.

### **3.1.2 Intervention mit Bakterienlysat**

Während der 6-monatigen Behandlung vom 2. bis 7. Lebensmonat wird den Säuglingen dreimal täglich Pro-Symbioflor® oral zusammen mit etwas Flüssigkeit appliziert. Pro-Symbioflor® ist ein steriles, kommerziell hergestelltes Autolysat aus gleichen Teilen einer Mischung von *Enterococcus faecalis* (DSM 16440) und *Escherichia coli* (DSM 17525) mit einer Konzentration von je  $1.5 - 4.5 \times 10^7$  Bakterien/ml. Die Anfangsdosis beträgt 3 x 5 Tropfen täglich und wird über 2 Wochen auf 3 x 10 Tropfen (3 x 0,7 ml) täglich gesteigert. Dies entspricht der Standarddosierung, die für Kinder dieser Altersgruppe empfohlen wird. Das von der Firma zur Verfügung gestellte Placebo besteht aus dem flüssigen Kulturmedium ohne Bakterienlysat und wird entsprechend in gleicher Menge verabreicht. Es enthält Lactosemonohydrat (4,9 mg/ml), Natriumchlorid (8,8 mg/ml), Magnesiumchlorid (0,608 mg/ml), Calciumchlorid (0,076 mg/ml), Kaliumchlorid (0,133 mg/ml), Magnesiumsulfat (0,779 mg/ml) und destilliertes Wasser (998,2 mg/ml).

### **3.1.3 Studienvisiten**

Rekrutiert werden die Probanden zwischen Mai 2002 und September 2007 in den Bundesländern Berlin (94,6 %), Brandenburg (5 %) und Hamburg und Niedersachsen (<1 %) aus insgesamt 27 Kliniken in Berlin, 12 Kliniken in Brandenburg, 2 Kliniken in Niedersachsen und 1 Klinik in Hamburg. Alle Studienvisiten werden an der Kinderklinik der Charité Berlin durchgeführt (Abbildung 5).

Visite 1 findet in einem Zeitraum kurz vor bis etwa 24 Stunden nach der Geburt statt und dient dem Einschluss der Probanden. Die Studie gliedert sich in eine Interventionsphase vom 2. bis 7. Lebensmonat und eine Nachbeobachtungsphase vom 8. Lebensmonat bis zum Ende des 3. Lebensjahres. Die Behandlung beginnt zu Beginn der 5. Lebenswoche mit Besuch 2 (V2). Es folgen 2 Kontrollbesuche in der 13. (V3) und 21. (V4) Lebenswoche ( $\pm 2$  Wochen). Visite 5 erfolgt am Ende der Behandlung in der 31. Lebenswoche. In der Nachbeobachtungsphase finden drei weitere Besuche jeweils bei Beendigung des ersten (V6), zweiten (V7) und dritten (V8) Lebensjahres statt (Abbildung 5).

Bei Auftreten von Symptomen mit Verdacht auf eine atopische Dermatitis werden zusätzliche Zwischenvisiten (M1, M2) nach Entscheidung des Arztes frei durchgeführt.

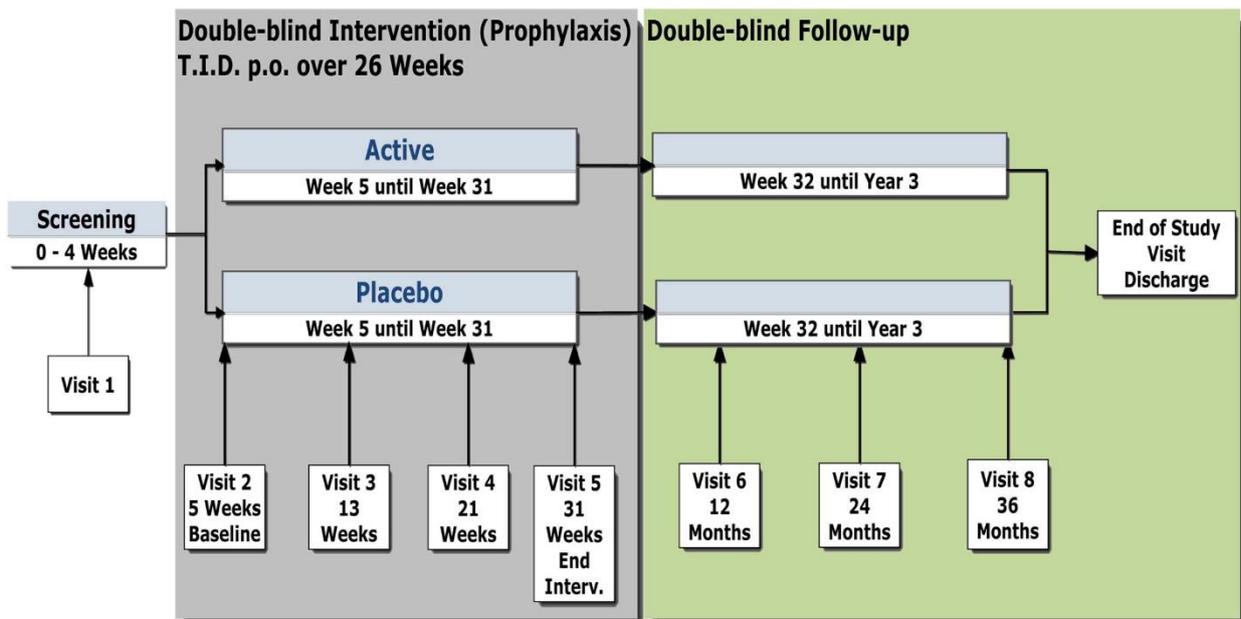


Abbildung 5: Studiendesign [66]

### 3.1.4 Vorliegende Parameter

Folgende Parameter werden zu den Studienvisiten erhoben und liegen für die aktuelle Sekundäranalyse vor:

1. Demographische Daten des Kindes einschließlich Geburtsdatum, Geschlecht, Gewicht, Größe, Geburtsmodus, ethnische Zugehörigkeit; Anzahl der Geschwister, sozioökonomischer Status der Familie.

2. Sensibilisierung des Kindes: Gesamt-IgE, allergische Sensibilisierung gegen Inhalations- und Nahrungsmittelallergene (Screening-Test fx5 und sx1); bei positivem Screeningtest Differenzierung des allergenspezifischen IgE.
3. Laborchemische Parameter: Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCH, MCHC, MCV, RDW, Thrombozyten, MPV, Differentialblutbild, Natrium, Kalium, Chlorid, Kreatinin, Harnstoff, Bilirubin total, Bilirubin konjugiert, AST, ALT,  $\gamma$ -GT und CRP.
4. Stuhlproben zur Analyse der Darmflora.
5. Hausstaubproben zur Messung des Allergen- und Endotoxingehalts werden vor und nach der Interventionsphase gesammelt (bisher nicht gemessen und daher hier nicht verfügbar).
6. Allergianamnese und laborchemische Untersuchung hinsichtlich einer allergischen Sensibilisierung der Eltern (V1).
7. Rauchverhalten der Eltern.
8. Unerwünschte Ereignisse mit Zeitpunkt, Schweregrad, Kausalität und Maßnahmen.

Neben dem primären Zielkriterium der atopischen Dermatitis werden weitere sekundäre Parameter erhoben:

1. Dauer bis zur Erstmanifestation einer AD (Zutreffen des „Major“ Kriteriums nach Hanifin und Rajka, modifiziert von Sampson).
2. Schweregrad der AD bei Erstmanifestation: SCORAD-Score.
3. Häufigkeit und Dauer bis zum Auftreten sowie Schweregrad einer allergischen / atopischen Manifestation des Gastrointestinaltraktes.
4. Häufigkeit und Dauer bis zum Auftreten sowie Schweregrad einer allergischen / atopischen Manifestation an den Atemwegen.
5. Häufigkeit einer Sensibilisierung gegen Nahrungsmittelallergene.
6. Atopische Dermatitis (AD, Ja/Nein) in der Nachbeobachtungsphase.
7. Atopische Dermatitis (AD, Ja/Nein) über die gesamte Studie.
8. Schweregrad der atopischen Dermatitis: SCORAD-Score.
9. Häufigkeit von allergischen / atopischen Manifestationen im Magen-Darm-Trakt als Nahrungsmittelunverträglichkeit.

10. Stillen / Zeitraum, Nahrung während der ersten Lebenswoche, Beginn der Gabe fester Nahrung, Gabe von Vitaminpräparaten, Angaben zur Unterbringung in Kinderkrippe /Tagesbetreuung, Frage nach Bestehen von Tierkontakten.

### 3.2 Zytokine: Erhebung der Messdaten

#### 3.2.1 Vorbereitung und Stimulation der Blutproben

Das entnommene heparinisierte oder EDTA-Vollblut der Patienten (Transport und Lagerung bis max. 24 h bei Raumtemperatur) wird 10 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert und anschließend das Serum abgenommen. Die verbliebenen Zellen werden mit dem Kulturmedium (AIM V® Medium, Gibco, USA - enthält L-Glutamin, Human Serum Albumin, Streptomycinsulfat 50 µg/ml, Gentamycinsulfat 10 µg/ml) resuspendiert. Die Menge des Mediums entspricht dabei der des entnommenen Serums. Anschließend wird der Kulturansatz vorbereitet. Dafür werden je 160 µl der Zellsuspension mit 40 µl des Kulturzusatzes in einer 96-well Rundbodenplatte versetzt und dann bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> über 24 Stunden kultiviert. Die antigen-spezifische Stimulation (Tabelle 5) erfolgt mit Lipopolysacchariden (E. coli) oder mit den Allergenen Ovalbumin (OVA) oder Hausstaubmilbe (Der p1). Als Vergleichs- bzw. Basiswert wird je eine Probe mit Kulturmedium ohne Stimulans mitgeführt.

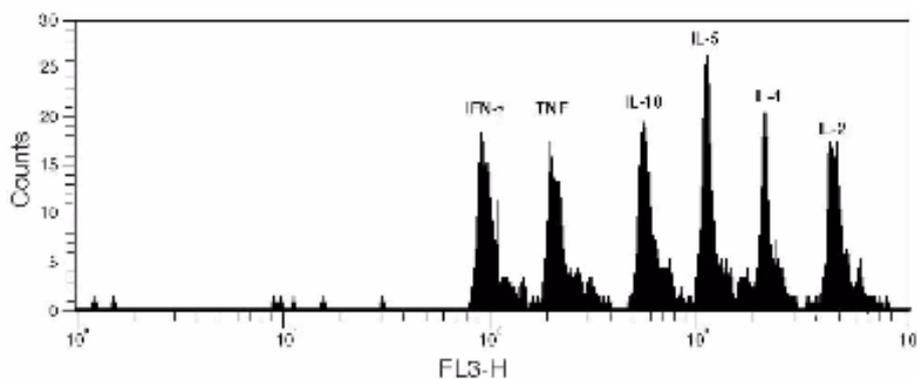
**Tabelle 5: Stimulanzen für die Zellkultur**

Nr.	Zell-suspension	Kulturzusatz	Abk.	Volumen - Konzentration	Gesamtvolumen des Ansatzes
1	160 µl	<b>Medium</b> (AIM V®, Gibco, USA)	MED	40 µl	200 µl
2	160 µl	<b>Lipopolysaccharide</b> (E. coli 0111:B4, Sigma, Deutschland)	LPS	40 µl – 25 µg/ml	200 µl
3	160 µl	<b>Ovalbumin</b> (Grade VI, Sigma, Deutschland)	OVA	40 µl – 250 µg/ml	200 µl
4	160 µl	<b>Dermatophagoides pteronyssimus</b> (Der p 1, ALK, Schweden)	Der p1	40 µl – 50 µg/ml	200 µl

Nach Ablauf von 24 Stunden werden die Platten zentrifugiert und der Überstand in Eppendorf-Röhrchen überführt. Diese werden dann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und später aus diesen die Zytokine bestimmt.

### 3.2.2 Messung der Zytokintiter

Der *Cytometric Bead Array* ist ein Detektionssystem, um lösliche Produkte wie z.B. Zytokine aus dem Kulturüberstand oder dem Serum quantitativ zu bestimmen. Vom Prinzip her handelt es sich dabei um einen Sandwich-ELISA, bei dem der Capture-Antikörper jedoch nicht an eine Microtiterplatte, sondern an ein Polymerkügelchen (=Bead) gekoppelt ist, welches in der FL-3 fluoresziert. Die Geräteeinstellung erfolgt mittels je einer PE- (Phycoerythrin-) und FITC-Positiv Kontrolle. Für jedes zu bestimmende Zytokin existiert eine Population an spezifischen Capture-Beads, die sich in ihrer Fluoreszenzintensität unterscheiden (Abbildung 6).

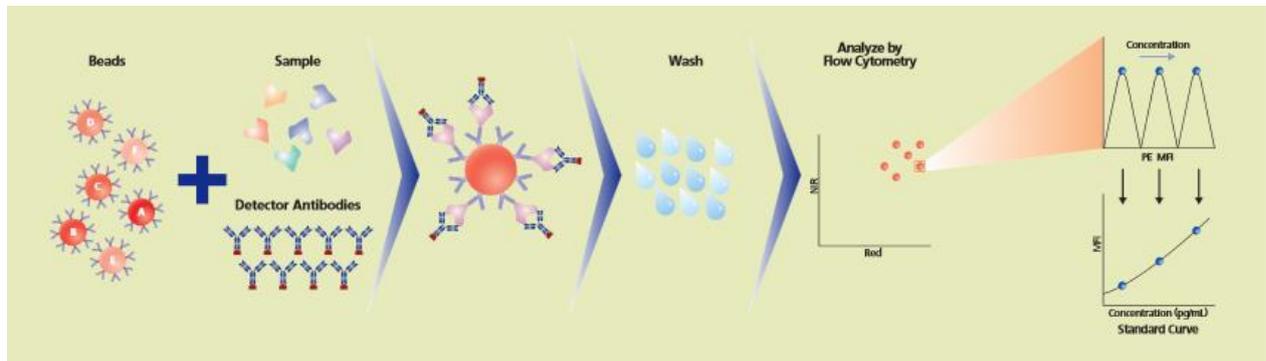


**Abbildung 6: Fluoreszenzschema der Zytokin-spezifischen Capture-Beads**

In einem zweiten Schritt bindet der spezifische Detektionsantikörper, der in einer anderen Fluoreszenz (FL-2) eingesetzt wird, an den Komplex aus Capture-Bead und Zytokin (Abbildung 7). Jeder Bead-Komplex wird dabei als eine eigenständige Messung betrachtet, so dass eine Mehrfachbestimmung der Probe automatisch gegeben ist. Durch die Verwendung einer entsprechenden Eichreihe können quantitative Ergebnisse erhalten werden. Dazu werden Standardlösungen mit bekannter Konzentration der jeweiligen Zytokine in einer Verdünnungsreihe

mitgeführt. Die erhobenen Messwerte haben eine Spannweite von 10 pg/ml bis 10.000 pg/ml (untere und obere Nachweisgrenze).

Die Fluoreszenzmessung erfolgt mit dem FACSCalibur™ flow cytometer, BD, USA.



**Abbildung 7: Schema des Cytometric Bead Array.**

Die Komplexe aus zytokinspezifischen Capture-Beads, Zytokinen aus der zu analysierenden Probe und spezifischen Detektionsantikörpern werden nach dem Waschen der Probe mittels Durchflußzytometrie anhand einer Standardkurve analysiert.

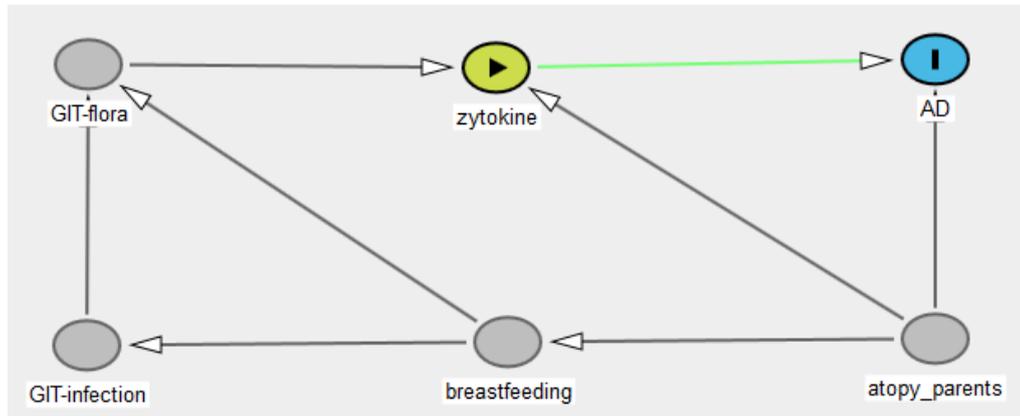
Der große Vorteil eines CBA gegenüber einem konventionellen ELISA ist das geringe Probenvolumen (50µl reichen für die simultane Bestimmung von 6 Zytokinen) und die erhebliche Zeitersparnis. Mit dem verwendeten Testsystem für humane Th1-/Th2-Zytokine (CBA, PharMingen, USA) der Firma BD™ (BD Biosciences) können die Zytokine IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN-γ und TNF-α gleichzeitig aus einer Probe quantifiziert werden. Die Analyse erfolgt mittels BD™ CBA Software.

### 3.3 Auswertung der Daten

#### 3.3.1 Einschätzung der Confounder mittels DAG

Seit 1999 steht mit den gerichteten, azyklischen Graphen (*directed acyclic graphs*, oder DAGs) ein Instrument zur Verfügung, um mögliche Einfluss- und Störgrößen in empirischen Studien zu identifizieren, Confounding zu konzeptualisieren und eine geeignete minimale Anzahl von Adjustierungsvariablen (minimal sufficient adjustment set, MSAS) zu ermitteln (Abbildung 8) [70].

Die Theorie beruht darauf, die ursächlichen Zusammenhänge zwischen Kovariaten und Analysevariablen graphisch darzustellen und damit einfach und transparent zu visualisieren. Die Pfeile zwischen den Variablen kodieren die kausalen Annahmen, alle angenommenen direkten sowie indirekten Einflüsse müssen theoretisch begründet werden können [71].



**Abbildung 8: Vereinfachtes Beispiel eines DAG für den Einfluss der Zytokine auf das Outcome AD.** Die Variablen Darmflora, Darmtraktinfektion, Stillen und Atopie der Eltern können direkt und indirekt sowohl die Expositionsvariable Zytokine als auch die Outcomevariable AD beeinflussen, die Pfeile geben die Richtung des Einflusses an.

Die Pfeile zeigen von der beeinflussenden Variable (Ursache) mit der Pfeilspitze auf die beeinflusste Variable (Wirkung) und können nur in eine Richtung zeigen, d.h. die Beziehung sollte eindeutig sein. Des Weiteren dürfen keine Schleifen oder Zyklen entstehen, Variablen dürfen sich nicht über andere Variablen erneut selbst beeinflussen. Um dies zu vermeiden, wird der zeitliche Verlauf von Variablen (Auftreten, Änderung über die Zeit, Messzeitpunkte) einbezogen. Ein Graph besteht aus Knoten (Variablen) und Pfeilen; wenn er gerichtet ist (*directed*) und keine geschlossenen Zyklen (*acyclic*) enthält, wird er als *directed acyclic graph* bezeichnet. Ein Pfad von der Exposition zum Outcome heißt kausal (auch offener *frontdoor*-Pfad), wenn der Pfad nur Pfeile enthält, die von der Exposition wegführen und in Richtung des Outcomes zeigen. Beginnt ein solcher Pfad mit einem Pfeil in Richtung Exposition, wird er als *backdoor*-Pfad bezeichnet und gehört zu den Confounding-Pfaden (auch *biasing paths*, verzerrende Pfade). Diese können Ursache nicht-kausaler Effekte (Scheinassoziationen) sein [72].

Das sogenannte *back-door criterion*, ein wichtiges Instrument zur Identifikation von Adjustierungssets, wurde von Pearl [73] definiert. Die Menge der Adjustierungsvariablen muss

dieses Kriterium erfüllen, indem es keine Kovariate enthält, die durch die Exposition beeinflusst wird (alle kausalen Pfade bleiben offen), und alle *backdoor*-Pfade zwischen der Exposition und der Zielgröße blockiert (Blockade nicht-kausaler Pfade). Damit ist der gesamte kausale Effekt identifizier- und abschätzbar. Alle Adjustierungsmengen, die diese Voraussetzung erfüllen, werden als suffizient bezeichnet. Als *minimal sufficient* gelten die Adjustierungssets, die selbst keine suffiziente Teilmenge mehr enthält. Adjustierungsvariablen können generell alle Variablen sein, die nicht direkt von der Exposition beeinflusst werden und Ahne der Exposition, der Zielgröße oder von beiden sind. Das gewählte *minimal sufficient adjustment set* sollte möglichst valide, verlässliche und gemessene Variablen enthalten. Kann ein ungemessener Parameter in der Datenanalyse nicht berücksichtigt werden, weil er entweder nicht gemessen wurde oder technisch nicht zu messen ist, sollte das bei der Interpretation der Ergebnisse als sogenanntes residuelles Confounding diskutiert werden.

Sind alle Variablen und ihre gegenseitigen Effekte nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft zusammengetragen, kann aus dem DAG direkt abgelesen werden, ob ein kausaler Zusammenhang unverzerrt geschätzt werden kann und welche Variablen zur Adjustierung hinzugezogen werden müssen. Für komplexe kausale Graphen existiert bereits geeignete Software zur Bestimmung der minimalen Adjustierungsvariablen [72].

Kritisch zur Methode anzumerken ist jedoch, dass die Voraussetzung, alle kausalen Annahmen korrekt und vollständig wiederzugeben, gerade bei umfassenden Modellen nur schwer erfüllt werden kann. So kann es zu falschen Spezifikationen und Verzerrungen im Modell kommen, wenn beispielsweise direkte Effekte einer Kovariate nicht beachtet werden oder die Präsenz einer unbeobachteten Variable nicht bekannt ist. Zudem können sehr komplexe Zusammenhänge wie Interaktionseffekte zwischen Variablen nur bedingt ausreichend dargestellt werden. Auch bildet ein DAG nur den qualitativen Zusammenhang ab, nicht jedoch Art und Stärke oder die Funktionalität, z.B. Linearität oder Effektmaßmodifikation [71].

Die Theorie der kausalen Graphen mit der Erstellung von *Minimal sufficient adjustment sets* wurde nicht, wie eigentlich von der Methodik her vorgesehen, bereits beim Studiendesign berücksichtigt, soll aber in der vorliegenden Arbeit zur Identifizierung der in den multivariaten Modellen zu berücksichtigenden Variablen angewandt werden.

### 3.3.2 Datensatz und Basalcharakteristik

Die verwendeten Parameter entstammen dem Intention-to-treat (ITT)-Datensatz, d. h. es fließen alle erhobenen Daten in die Berechnungen ein, unabhängig davon, ob die Probanden vorzeitig aus der Studie ausscheiden oder Parameter nicht vollständig erhoben werden (können). Die Zytokine INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-5, IL-4 und IL-2 werden jeweils nach 3 verschiedenen Stimulationen (LPS, Der p1, OVA) bestimmt, so dass sich insgesamt 18 Messwerte pro Proband und Zeitpunkt ergeben. Bei 4 Messzeitpunkten (Visit 2, 5, 6 und 7) entstehen so bis zu 72 Werte pro Kind.

Aufgrund der nur geringen möglichen Blutentnahmemenge und der generell bei Säuglingen und Kleinkindern schwierigeren Blutentnahme stehen nicht von allen eingeschlossenen Probanden zu den gewünschten Zeitpunkten ausreichende Blutmengen zur Bestimmung aller vorgesehenen bzw. gewünschten Parameter zur Verfügung. Zytokintitermessungen werden von bis zu 494 Kindern durchgeführt.

Mit den erhobenen Daten wird zunächst sowohl für die Gesamtstudiengruppe als auch für die Subgruppe der Probanden mit Zytokinmessungen eine Basalcharakteristik nach Interventionsgruppen vor Beginn der Intervention erstellt. Anschließend erfolgt eine Sensitivitätsanalyse der Zytokingruppe stratifiziert nach der Erkrankung. Die statistischen Testverfahren werden in Abhängigkeit vom Variablentyp und damit entsprechend ihrer Gültigkeit gewählt (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Eingesetzte statistische Testverfahren**

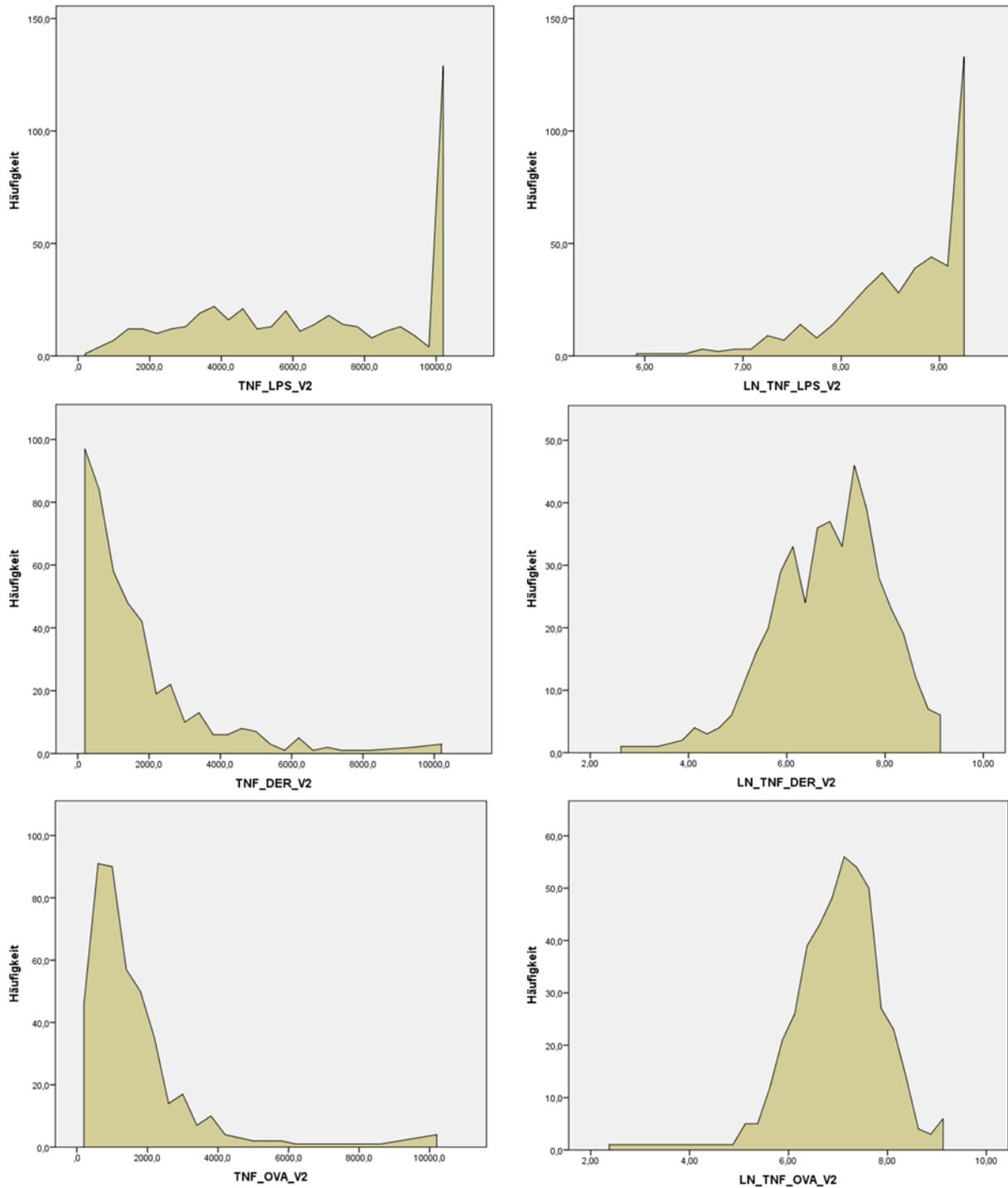
Variablentyp	Testkategorie	Testverfahren
Numerisch, stetig, normal verteilt	Parametrisch	T-Test
Numerisch, stetig, nicht normal verteilt	Nicht-parametrisch	Mann-Whitney-U-Test, Rangsummentest
Kategoriell, Häufigkeiten	2 x 2 Tabellen	Exakter Test nach Fisher
Kategoriell	K x 2 x 2 K=2, 3...	Cochran-Mantel-Haenszel-Test, Chi-Quadrat

Das Signifikanzniveau für alle Analysen wird bei 0,05 festgelegt. Die Auswertung erfolgt mittels der Statistiksoftware SAS Version 9.2 (SAS Institute, Inc, Cary NC) und IBM SPSS Statistics 20 (IBM Corp., Armonk, NY).

### **3.3.3 Deskriptive Statistik der absoluten Zytokintiter**

Die Zytokintiter stellen sich nicht normalverteilt und mit großer Streuung dar. Aus den Densitogrammen der nativen Titer wird in der Regel eine rechtsschiefe und manchmal dreigipflige Verteilung sichtbar (Abbildung 9): ein Gipfel an der unteren und einer an der oberen Bestimmungsgrenze sowie ein weiterer Gipfel in der Mitte des Messbereiches. Nach logarithmischer (ln-)Transformation zeigt sich zwar ein deutlich symmetrischeres Bild, aber auch hier ist keine normale Verteilung in der Mitte des Messbereiches erkennbar (Abbildung 9).

Die absoluten Titer werden einer deskriptiven Analyse unterzogen, es werden die Mittelwerte inkl. Standardabweichung und Varianz berechnet. Der Vergleich der Mittelwerte zwischen den Erkrankungsgruppen erfolgt mittels T-Test, der Vergleich der Varianzen mittels Levene-Test. Aufgrund des geringen Alters der Probanden und der damit verbundenen geringen Sensibilisierungswahrscheinlichkeit fallen die absoluten Titer nach OVA- und Der p1-Stimulation deutlich geringer aus als nach LPS-Stimulation.

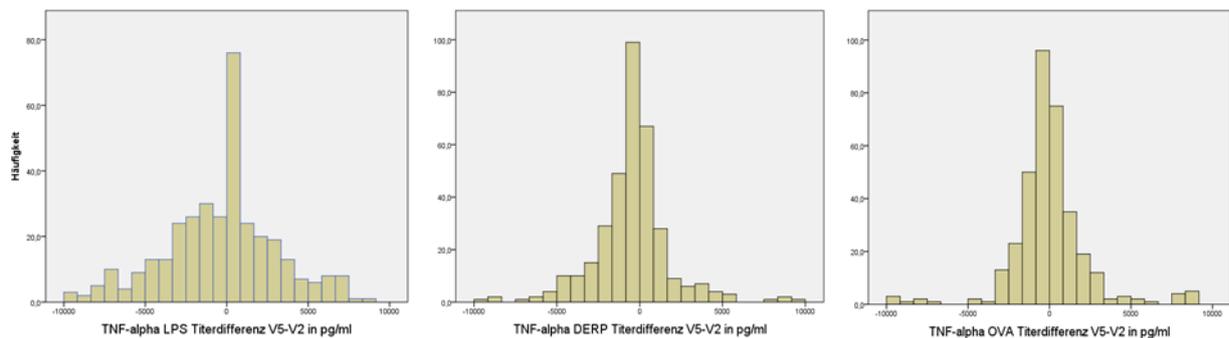


**Abbildung 9: Histogramme der absoluten Titer am Beispiel TNF- $\alpha$  zu Visit 2 für die Stimulationen LPS, Der p1 und OVA.**

Native Titer (links) und logarithmische Transformation (rechts).

### 3.3.4 Bestimmung von Titerdifferenzen

Aufgrund der enormen Streuung der Zytokintiter zwischen den Individuen wird mit der Berechnung von Titerdifferenzen die intraindividuelle Änderung berücksichtigt. Damit werden sowohl exogenen Einflussfaktoren wie z.B. Infektionskrankheiten als auch der individuellen Ausgangslage und Reifung des Immunsystems Rechnung getragen. Zudem existieren bisher keine Normwerte für die Zytokintiter (insbesondere nicht nach Altersgruppen). Es werden die Titerdifferenzen zwischen V5 und V2 sowie zwischen V7 und V2 berechnet. So werden sowohl die Zeitabschnitte mit dem größeren klinischen Interesse (V5-V2: Ende der Intervention mit 7 Lebensmonaten minus Ausgangswert; V7-V2: Wert im Alter von 2 Lebensjahren minus Ausgangswert) als auch die Zeitpunkte mit der größten Anzahl an gültigen Messwerten berücksichtigt. Daraus ergibt sich eine positive Differenz bei Zunahme des Titers von V2 zu V5/V7, ein negativer Wert bei Titerabnahme. Die Verteilung der Werte stellt sich symmetrisch um den Mittelpunkt dar (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Histogramme der Titerdifferenzen am Beispiel TNF- $\alpha$  (V5-V2)**

Unterschiede der Mittelwerte zwischen den Erkrankungsgruppen werden mittels T-Test untersucht. Ausgegeben werden jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung, Median mit 25. und 75. Perzentile sowie Minimum, Maximum und die Varianz. Die Varianz als Maß der Streuung gibt die mittlere quadratische Abweichung der Ergebnisse um den Mittelwert an und ist das Quadrat der Standardabweichung. Mögliche Unterschiede zwischen den Varianzen der Erkrankungsgruppen werden mit dem Levene-Test der Varianzgleichheit ermittelt. Eine höhere Varianz bedeutet eine größere Streuung der Werte um den Mittelwert und ist klinisch als höhere interindividuelle Variabilität in einer heterogenen Gruppe zu werten; umgekehrt weist eine kleine Varianz auf eine geringe Variabilität und eine homogene Gruppe hin.

Zusätzlich zum linearen Ansatz der Bestimmung der Titerdifferenzen wird auch ein multiplikatorisches Vorgehen geprüft, das die Berechnung von Indizes bzw. Quotienten ( $V5/V2$  und  $V7/V2$ ) umfasst. Es ergeben sich jedoch keine wesentlichen Unterschiede oder neuen Aspekte, so dass nur die Ergebnisse zu den absoluten Titerdifferenzen berichtet werden.

### 3.3.5 Kategorisierung der Titerdifferenzen

Im nächsten Schritt werden die Differenzen kategorisiert. Die entstehenden Kategorien beinhalten die Differenzen kleiner „Null“ (Shift -), größer „Null“ (Shift +) und gleichbleibend (Shift 0). In die Kategorie „Shift 0“ fallen alle Werte, die innerhalb des 95% Konfidenzintervalls des Ausgangswertes zu  $V2$  liegen:

Aus den Qualitätsparametern und Sicherheitsdaten des Zytokinassays ist der Interassay-Variationskoeffizient CV bekannt [74]. Dieser wird individuell für jedes Zytokin angegeben und ist auch abhängig von der Höhe des Titers. Die Höhe des Variationskoeffizienten liegt zwischen 4 und 9% und entspricht der einfachen Standardabweichung. Ermittelt wurde er aus den Medianen der Messwerte von jeweils 8 Zytokinproben bekannter Konzentration mit 80, 600 und 2500 pg/ml. Aus den Datenpaaren der Proben für 80 und 600 pg/ml sowie 600 und 2500 pg/ml und deren Variationskoeffizienten wird, da kein stetiger Zusammenhang besteht, mittels linearer Regression eine untere Regressionsgerade für die Zytokintiter  $< 1000$  pg/ml und eine obere Regressionsgerade für Titer  $> 1000$  pg/ml mit der dazugehörenden x-Koordinate (a) und dem Anstieg der Geraden (b) berechnet. Anhand der Funktion  $CV(V2) = a + b \cdot \text{Titer}(V2)$  kann individuell für jeden Zytokinausgangswert zu  $V2$  entsprechend der Titerhöhe der Variationskoeffizient zu  $V2$  bestimmt werden. Daraus werden die Intervallgrenzen für das 95%-Konfidenzintervall um den Ausgangstiter berechnet: untere Grenze =  $\text{Titer}(V2) - 2 \cdot CV(V2)$  sowie obere Grenze =  $\text{Titer}(V2) + 2 \cdot CV(V2)$ . Liegt der Zytokintiter bei den Messungen zu den späteren Zeitpunkten  $V5$  bzw.  $V7$  innerhalb dieses Bereiches, wird die Titerdifferenz  $V5-V2$  bzw.  $V7-V2$  der Kategorie „Shift 0“ zugeordnet. Alle Titerveränderungen außerhalb des Intervalls werden als klinisch relevant in „Shift -“, bzw. „Shift +“ kategorisiert.

Mit den kategorisierten Zytokindifferenzen wird eine Frequenzstatistik inkl. Spalten- und Reihenprozenten erstellt, stratifiziert nach Zytokin, Stimulation und Visit. Die Signifikanz einer möglichen Korrelation wird mittels Chi-Quadrat-Test überprüft.

### 3.3.6 Logistische Regression

Anschließend wird der mögliche Einfluss der Variablen, die mit dem DAG (directed acyclic graph) und dem daraus resultierendem *minimal sufficient adjustment set* bestimmt werden, auf die atopische Dermatitis überprüft. Dazu wird das Modell einer logistischen Regressionsanalyse unterzogen. Zielvariable ist die Prävalenz der atopischen Dermatitis jeweils zum Zeitpunkt V5 bzw. V7. Als unabhängige Parameter enthält das Modell die Zytokintiterdifferenz (kategorisiert für V5-V2 bzw. V7-V2), das Geschlecht des Kindes, das Geburtsgewicht, den Geburtsmodus (vaginale Entbindung vs. geplante Sectio caesarea), die Anzahl der Geschwister, die familiäre Atopiebelastung (beide Eltern, nur Vater, nur Mutter), die Stilldauer (nie, weniger bzw. mehr als 6 Monate), das Rauchverhalten der Mutter (vor, in bzw. nach der Schwangerschaft), die Intervention mit Pro-Symbioflor<sup>®</sup>, die Prävalenz von Bifidobacteria, E. coli, Clostridium difficile, Clostridium cluster I (Clostridium sensu stricto), Bacteroides fragilis group und Lactobacilli als Vertreter der Darmflora jeweils zu V5, den Eosinophilen-Score (< oder  $\geq$  5% zu V2), den UE-Score (entzündliche bzw. infektiöse Erkrankung in der Woche vor dem Visit) sowie die Haustierhaltung.

Da bei der logistischen Regression und der Berechnung von Odds ratios insbesondere auf die Belegung der Kategorien der Variablen zu achten ist, wird der höchste Categorieschlüssel jeweils dem Status gesund bzw. dem Status mit dem geringsten Erkrankungsrisiko zugeordnet. Dieser bildet dann jeweils die Referenz zur Risikoeinschätzung.

Die Analyse erfolgt für die Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 und IL-10 jeweils nach LPS-Stimulation. Aufgrund der geringen Varianz der Messwerte bei IL-2 und IL-5 kann der Einfluss der Variablen auf die Änderungen der Messwerte nicht zugeordnet und verwertet werden.

Die Evaluation erfolgt stratifiziert nach V5 bzw. V7. Dafür werden zuerst alle Parameter einer Vorwärtsselektion und Rückwärtselemination unterzogen, wobei Variablen mit  $p < 0.25$  im Modell belassen bzw. Variablen mit  $p > 0.15$  aus dem Modell ausgeschlossen werden. In einem zweiten Schritt werden von den verbliebenen Parametern die Variablen mit  $p < 0.10$  in die endgültige Berechnung aufgenommen. Berechnet wird die Odds ratio und deren 95%-Konfidenzintervall sowie die Irrtumswahrscheinlichkeiten. Schließlich wird für die Parameter mit signifikanter Odds ratio eine deskriptive Frequenzanalyse erstellt, inklusive Berechnung der Odds ratios aus 2x2-Tabellen der signifikant assoziierten Variablenpaare.

## 4 Ergebnisse

Bezogen auf die Subpopulation der Probanden mit Zytokinmessungen werden 494 zu Visit 2 in die beiden Studienarme randomisiert (Verum N=244, Placebo N=255), von denen 89% bis zu Visit 5 am Ende der Intervention und noch 86% zu Visit 7 am Ende des 2. Lebensjahres in der Studie verbleiben (Tabelle 7). In dieser Subpopulation entwickelt sich eine AD in 73% der Fälle bereits bis zu Visit 5, in der Gesamtpopulation in 70% der Fälle (95 zu Visit 5, 109 zu Visit 6 und 135 zu Visit 7).

**Tabelle 7: Fallzahlen der Population mit Zytokinbestimmungen, stratifiziert nach Erkrankungsgruppen**

	N (%)		
	AD	Gesund	Gesamt
Randomisiert zu Visit 2	0 (0,0)	494 (100,0)	494 (100,0)
Visit 5 vollendet	84 (19,1)	355 (80,9)	439 (89,0)
Visit 6 vollendet	96 (22,2)	336 (77,8)	432 (87,0)
Visit 7 vollendet	115 (27,2)	308 (72,8)	423 (86,0)

In beiden Populationen, der Subpopulation mit Zytokinbestimmungen und der Gesamtstudienpopulation, jeweils stratifiziert nach Intervention, unterscheiden sich die Prävalenzen der AD zu den jeweiligen Visits nicht signifikant (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Vergleich der Erkrankungszahlen zwischen Gesamtstudienpopulation und der Population mit Zytokinbestimmungen, stratifiziert nach Intervention**

Visit	Probanden mit Zytokinwerten				PAPS Gesamtstudienpopulation [69]			
	Verum		Placebo		Verum		Placebo	
	AD	Total	AD	Total	AD	Total	AD	Total
5	35 (16,9)	207	49 (21,1)	232	52 (17,2)	303	63 (20,8)	303
6	43 (21,1)	204	53 (23,3)	228	65 (21,5)	303	70 (23,1)	303
7	56 (27,9)	201	59 (26,6)	222	84 (27,7)	303	87 (28,7)	303

## **4.1 Charakteristika der Studienpopulation**

### **4.1.1 Charakteristik der Interventionsgruppen zum Einschlusszeitpunkt**

Ausgehend von dem ursprünglichen Studiendesign werden im Folgenden zunächst die Basalcharakteristika der Population mit Zytokinbestimmungen und der Gesamtpopulation nach der Intervention stratifiziert und miteinander verglichen.

Die Charakteristika der beiden Interventionsgruppen mit Zytokinbestimmungen zum Einschlusszeitpunkt zeigen keine signifikanten Unterschiede und entsprechen der Gesamtstudienpopulation (Tabelle 9).

Wie für die Manifestation einer atopischen Dermatitis und der Intervention in der Gesamtstudienpopulation [66] gezeigt, besteht auch zwischen den Zytokintitern und der Intervention in der Population mit Zytokinbestimmungen keine Korrelation (Tabelle 10, 11 und 12). Pro-Symbioflor<sup>®</sup> übt damit keinen direkten Einfluss auf die Entwicklung der Zytokine in den ersten zwei Lebensjahren aus.

Im Folgenden wird daher der mögliche Zusammenhang zwischen dem Zytokinprofil und der Entwicklung einer AD in den Fokus der weiteren Untersuchungen gestellt und nur noch nach dem Eintreten der Erkrankung (AD/ gesund) stratifiziert.

**Tabelle 9: Basalcharakteristika der Population mit Zytokinbestimmungen und der Gesamtstudienpopulation, stratifiziert nach Intervention.** Die statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  definiert (Verum versus Placebo; T-Test<sup>1)</sup>, Cochran-Mantel-Haenszel-Test<sup>2)</sup>, Exakter Test nach Fisher<sup>3)</sup>).

Parameter		Population mit Zytokinbestimmungen			Gesamtstudienpopulation	
		Verum (N=244)	Placebo (N=255)	p-Wert	Verum (N=303)	Placebo (N=303)
Alter der Neugeborenen bei Beginn der Intervention [Wochen]	Mittelwert $\pm$ SD	5,1 $\pm$ 0,7	5,1 $\pm$ 0,7	0,914 <sup>1)</sup>	5,1 $\pm$ 0,7	5,1 $\pm$ 0,7
Geschlecht	n (%) weiblich	124 (50,8)	123 (49,2)	0,787 <sup>2)</sup>	142 (46,9)	151 (49,8)
	männlich	120 (49,2)	127 (50,8)		161 (53,1)	152 (50,2)
Geburtsgewicht [g]	Mittelwert $\pm$ SD	3.487 $\pm$ 439	3.493 $\pm$ 436	0,883 <sup>1)</sup>	3.471 $\pm$ 444	3.499 $\pm$ 441
Gestationsalter bei Geburt [Wochen]	Mittelwert $\pm$ SD	39,5 $\pm$ 1,2	39,4 $\pm$ 1,3	0,309 <sup>1)</sup>	39,5 $\pm$ 1,2	39,4 $\pm$ 1,3
Alter der Mutter bei Geburt [Jahre]	Mittelwert $\pm$ SD	32,9 $\pm$ 4,9	32,7 $\pm$ 4,9	0,728 <sup>1)</sup>	33,0 $\pm$ 4,9	32,8 $\pm$ 4,9
Geburtsmodus	n (%) Vaginale Entbindung	174 (71,9) <sup>4)</sup>	191 (76,7) <sup>5)</sup>	0,223 <sup>2)</sup>	226 (74,6)	226 (74,6)
	Sectio, primär	68 (28,1) <sup>4)</sup>	58 (23,3) <sup>5)</sup>		75 (24,8)	76 (25,1)
Ältere Geschwister	Mittelwert $\pm$ SD	1,2 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,6	0,338 <sup>1)</sup>	1,2 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,6
Rauchverhalten der Mutter	n (%) Nichtraucher	150 (61,5)	150 (60,0)	0,782 <sup>3)</sup>	222 (73,3)	230 (75,9)
	Vor der Schwangerschaft	67 (27,5)	65 (26,0)	0,761 <sup>3)</sup>	81 (26,7)	73 (24,1)
	Während der Schwangerschaft	63 (25,8)	59 (23,6)	0,602 <sup>3)</sup>	75 (24,8)	66 (21,8)
	Nach der Schwangerschaft	64 (26,2)	66 (26,4)	1,000 <sup>3)</sup>	71 (23,4)	74 (24,4)
Familien mit Haustieren	n (%)	77 (34,7)	70 (30,7)	0,421 <sup>3)</sup>	102 (33,7)	91 (30,1)

**Tabelle 10: Zytokintiter nach Stimulation des Vollblutes mit LPS, stratifiziert nach Intervention und Visit.** Die statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  definiert (Gruppe Verum versus Placebo; Mann-Whitney-U-Test).

Zytokin nach LPS-Stimulation	Visit	Verum		Placebo		p-Wert
		N	Titer [pg/ml] Mittelwert $\pm$ SD	N	Titer [pg/ml] Mittelwert $\pm$ SD	
IFN- $\gamma$	2	220	1.850 $\pm$ 2.730	218	1.890 $\pm$ 2.500	0,354
	5	193	2.140 $\pm$ 3.080	208	1.870 $\pm$ 2.630	0,727
	6	97	2.840 $\pm$ 3.330	112	2.950 $\pm$ 3.270	0,587
	7	147	1.430 $\pm$ 2.060	160	1.410 $\pm$ 1.920	0,970
TNF- $\alpha$	2	220	6.330 $\pm$ 3.040	218	6.820 $\pm$ 2.940	0,095
	5	193	6.120 $\pm$ 3.440	209	6.400 $\pm$ 3.340	0,503
	6	97	7.120 $\pm$ 3.210	111	6.870 $\pm$ 3.120	0,503
	7	147	5.440 $\pm$ 3.330	160	5.400 $\pm$ 3.540	0,917
IL-2	2	220	61 $\pm$ 673	218	21 $\pm$ 76	0,454
	5	193	14 $\pm$ 10	209	13 $\pm$ 10	0,348
	6	97	19 $\pm$ 19	111	17 $\pm$ 14	0,679
	7	147	11 $\pm$ 6	158	11 $\pm$ 3	0,393
IL-4	2	220	58 $\pm$ 110	218	55 $\pm$ 107	0,430
	5	193	59 $\pm$ 124	209	46 $\pm$ 100	0,689
	6	97	93 $\pm$ 189	111	94 $\pm$ 234	0,940
	7	147	35 $\pm$ 39	158	30 $\pm$ 33	0,468
IL-5	2	220	19 $\pm$ 16	218	21 $\pm$ 17	0,111
	5	193	14 $\pm$ 10	209	14 $\pm$ 8	0,823
	6	97	20 $\pm$ 50	111	20 $\pm$ 58	0,698
	7	147	12 $\pm$ 5	158	12 $\pm$ 5	0,709
IL-10	2	220	5.030 $\pm$ 2.690	218	5.160 $\pm$ 2.980	0,751
	5	193	4.460 $\pm$ 2.450	209	4.660 $\pm$ 2.530	0,433
	6	97	4.840 $\pm$ 2.570	111	4.740 $\pm$ 2.630	0,739
	7	147	4.240 $\pm$ 2.140	160	4.040 $\pm$ 1.910	0,553

**Tabelle 11: Zytokintiter nach Stimulation des Vollblutes mit dem Hausstauballergen Der p1, stratifiziert nach Intervention und Visit.** Die statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  definiert (Verum versus Placebo; Mann-Whitney-U-Test).

Zytokin nach Der p1-Stimulation	Visit	Verum		Placebo		p-Wert
		N	Titer [pg/ml] Mittelwert $\pm$ SD	N	Titer [pg/ml] Mittelwert $\pm$ SD	
IFN- $\gamma$	2	221	60 $\pm$ 111	219	63 $\pm$ 98	0,063
	5	194	79 $\pm$ 288	208	49 $\pm$ 97	0,515
	6	97	64 $\pm$ 90	112	80 $\pm$ 125	0,971
	7	162	79 $\pm$ 417	177	40 $\pm$ 95	0,364
TNF- $\alpha$	2	221	1.580 $\pm$ 1.710	219	1.650 $\pm$ 1.750	0,557
	5	194	1.280 $\pm$ 1.860	209	1.040 $\pm$ 1.420	0,198
	6	97	1.260 $\pm$ 1.690	111	1.080 $\pm$ 1.390	0,939
	7	162	920 $\pm$ 1.640	177	990 $\pm$ 1.740	0,721
IL-2	2	221	12 $\pm$ 5	219	12 $\pm$ 7	0,647
	5	194	11 $\pm$ 6	209	14 $\pm$ 28	0,492
	6	97	14 $\pm$ 7	111	14 $\pm$ 9	0,591
	7	162	41 $\pm$ 306	176	15 $\pm$ 33	0,008 *
IL-4	2	221	18 $\pm$ 21	219	20 $\pm$ 26	0,231
	5	194	19 $\pm$ 28	209	17 $\pm$ 29	0,311
	6	97	26 $\pm$ 32	111	21 $\pm$ 24	0,742
	7	162	15 $\pm$ 20	176	13 $\pm$ 10	0,059
IL-5	2	221	11 $\pm$ 7	219	12 $\pm$ 6	0,066
	5	194	10 $\pm$ 2	209	11 $\pm$ 4	0,337
	6	97	10 $\pm$ 2	111	11 $\pm$ 3	0,827
	7	162	22 $\pm$ 126	176	11 $\pm$ 8	0,162
IL-10	2	221	502 $\pm$ 619	219	483 $\pm$ 584	0,896
	5	194	405 $\pm$ 368	209	369 $\pm$ 412	0,452
	6	97	373 $\pm$ 291	111	417 $\pm$ 445	0,796
	7	162	357 $\pm$ 672	177	330 $\pm$ 360	0,756

**Tabelle 12: Zytokintiter nach Stimulation des Vollblutes mit dem Hühnereiallergen OVA, stratifiziert nach Intervention und Visit.** Die statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  definiert (Verum versus Placebo; Mann-Whitney-U-Test).

Zytokin nach OVA-Stimulation	Visit	Verum		Placebo		p-Wert
		N	Titer [pg/ml] Mittelwert $\pm$ SD	N	Titer [pg/ml] Mittelwert $\pm$ SD	
IFN- $\gamma$	2	221	13 $\pm$ 9	218	13 $\pm$ 12	0,812
	5	194	12 $\pm$ 5	208	11 $\pm$ 5	0,455
	6	97	14 $\pm$ 9	112	13 $\pm$ 7	0,928
	7	160	11 $\pm$ 3	173	10 $\pm$ 2	0,469
TNF- $\alpha$	2	221	23 $\pm$ 33	218	23 $\pm$ 37	0,617
	5	194	23 $\pm$ 42	209	21 $\pm$ 47	0,831
	6	97	38 $\pm$ 64	111	30 $\pm$ 49	0,294
	7	160	17 $\pm$ 16	173	15 $\pm$ 12	0,614
IL-2	2	221	12 $\pm$ 9	218	11 $\pm$ 4	0,723
	5	194	10 $\pm$ 2	209	10 $\pm$ 1	0,220
	6	97	10 $\pm$ 1	111	10 $\pm$ 4	0,650
	7	160	10 $\pm$ 1	173	10 $\pm$ 0	0,080
IL-4	2	221	958 $\pm$ 791	218	946 $\pm$ 790	0,907
	5	194	826 $\pm$ 576	209	853 $\pm$ 598	0,529
	6	97	935 $\pm$ 702	111	900 $\pm$ 552	0,948
	7	159	985 $\pm$ 812	173	959 $\pm$ 673	0,135
IL-5	2	221	13 $\pm$ 9	218	13 $\pm$ 12	0,934
	5	194	12 $\pm$ 5	209	11 $\pm$ 5	0,037 *
	6	97	14 $\pm$ 9	111	13 $\pm$ 7	0,954
	7	160	11 $\pm$ 3	173	10 $\pm$ 2	0,517
IL-10	2	221	23 $\pm$ 33	218	23 $\pm$ 37	0,899
	5	194	23 $\pm$ 42	209	21 $\pm$ 47	0,826
	6	97	38 $\pm$ 64	111	30 $\pm$ 49	0,961
	7	160	17 $\pm$ 16	173	15 $\pm$ 12	0,900

#### 4.1.2 Sensitivitätsanalyse der Erkrankungsgruppen

Die Population der Probanden mit Zytokinmessungen wird einer Sensitivitätsanalyse unterzogen; dabei werden die Basalparameter vor Beginn der Intervention zu V2 anhand der späteren Erkrankungsgruppen verglichen. In dieser Analyse gelten alle Kinder als erkrankt, die am Ende der Intervention im Alter von 7 Monaten eine AD entwickelt haben.

**Tabelle 13: Sensitivitätsanalyse der Population mit Zytokinbestimmungen, stratifiziert nach Erkrankungsgruppen.** Die Prävalenz der AD bezieht sich auf V5, dem Visit am Ende der sechsmonatigen Intervention. Die statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  definiert (AD versus Gesund; T-Test<sup>1)</sup>, Cochran-Mantel-Haenszel-Test<sup>2)</sup>, Exakter Test nach Fisher<sup>3)</sup>, Mann-Whitney-U-Test<sup>4)</sup>).

Parameter		Erkrankung			
		AD (N=84)	Gesund (N=355)	p-Wert	
Alter der Neugeborenen bei Beginn der Intervention [Wochen]	Mittelwert $\pm$ SD	5,0 $\pm$ 0,8	5,1 $\pm$ 0,7	0,460 <sup>1)</sup>	
	Median (25./75.P.)	5,0 (4,4/5,6)	5,0 (4,6/5,7)	--	
Geschlecht	n (%)	weiblich	36 (42,9)	184 (51,8)	0,14 <sup>2)</sup>
		männlich	48 (57,1)	171 (48,2)	--
Geburtsgewicht [g]	Mittelwert $\pm$ SD	3.586 $\pm$ 454	3.463 $\pm$ 421	0,026 <sup>1)</sup> *	
	Median (25./75.P.)	3.600 (3.248/3.915)	3.440 (3.173/3.758)	--	
Gestationsalter bei Geburt [Wochen]	Mittelwert $\pm$ SD	39,6 $\pm$ 1,3	39,4 $\pm$ 1,3	0,105 <sup>1)</sup>	
	Median (25./75.P.)	40,0 (39,0/41,0)	40,0 (39,0/41,0)	--	
Alter der Mutter bei Geburt [Jahre]	Mittelwert $\pm$ SD	33,2 $\pm$ 4,7	32,7 $\pm$ 4,9	0,388 <sup>1)</sup>	
	Median (25./75.P.)	34 (30/36)	33 (29/36)	--	
Geburtsmodus	n (%)	Vaginale Entbindung	64 (77,1)	265 (74,9)	0,669 <sup>2)</sup>
		Geplante Sectio	19 (22,9)	89 (25,1)	
		Notfall-Sectio	0 (0,0)	0 (0,0)	
Anzahl älterer Geschwister	Mittelwert $\pm$ SD	1,2 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,6	0,547 <sup>1)</sup>	
	Median (25./75.P.)	1 (1/1)	1 (1/1)	--	

Parameter (Fortsetzung)		Erkrankung			
		AD (N=84)	Gesund (N=355)	p-Wert	
Probanden mit n älteren Geschwistern	n (%)	keine	46 (54,8)	205 (57,8)	0,626 <sup>3)</sup>
		1	30 (79,0)	118 (78,7)	0,703 <sup>2)</sup>
		2	8 (21,1)	27 (18,0)	
		3	0 (0,0)	4 (2,1)	
		4	0 (0,0)	0 (0,0)	
		5	0 (0,0)	1 (0,5)	
Rauchverhalten der Mutter	n (%)	Nichtraucher	60 (71,4)	216 (60,9)	0,071 <sup>3)</sup>
		Vor der Schwangerschaft	4 (10,5)	39 (26,0)	0,051 <sup>3)</sup>
		Während der Schwangerschaft	3 (7,9)	38 (25,3)	0,026 <sup>3)</sup> *
		Nach der Schwangerschaft	5 (13,2)	40 (26,7)	0,092 <sup>3)</sup>
Familien mit Haustieren	n (%)	21 (27,3)	112 (33,5)	0,345 <sup>3)</sup>	
Eosinophile im peripheren Blut bei Beginn der Intervention [%]	Mittelwert ± SD	5,75 ± 3,1	4,65 ± 3,1	0,002 <sup>4)</sup> *	
	Median (25./75.P.)	5,0 (3,0/8,0)	4,0 (3,0/6,0)		
Intestinale Kolonisation bei Beginn der Intervention (Prävalenz)	n (%)	Bifidobacteria	66 (93,0)	276 (88,7)	0,391 <sup>3)</sup>
		Clostridium cluster I	41 (57,7)	135 (43,4)	0,035 <sup>3)</sup> *
		Clostridium difficile	20 (28,2)	70 (22,5)	0,352 <sup>3)</sup>
		Lactobacilli	20 (28,2)	71 (22,8)	0,356 <sup>3)</sup>
		Bacteroides fragilis group	41 (57,7)	186 (59,8)	0,789 <sup>3)</sup>
		E. coli	47 (66,2)	196 (63,0)	0,683 <sup>3)</sup>

Die Mehrzahl der untersuchten Basalparameter zeigt keinen Unterschied zwischen den Probanden, die bis Visit 5 und damit dem Ende der Intervention eine AD entwickeln und denen, die gesund bleiben. Das Geschlecht, das Gestationsalter bei Geburt, das Alter der Neugeborenen bei Eintritt in die Studie, das Alter der Mütter bei Geburt sowie insbesondere der Geburtsmodus, die Anzahl älterer Geschwister und die Haustierhaltung sind zwischen den Erkrankungsgruppen gleich verteilt.

Statistisch signifikante Unterschiede gibt es jedoch beim Geburtsgewicht, dem Rauchverhalten der Mutter sowie dem Anteil der Eosinophilen im Blut und der Kolonisation des Darmes mit Clostridium cluster I.

## **Geburtsgewicht**

Kinder, die im weiteren Verlauf eine AD entwickeln, haben mit  $3.586 \text{ g} \pm 454 \text{ g}$  ein signifikant höheres Geburtsgewicht als Kinder, die gesund bleiben ( $3.463 \text{ g} \pm 421 \text{ g}$ ) ( $p=0,026$ ).

## **Rauchverhalten der Mutter**

Der Anteil der Nichtraucherinnen unter den Müttern ist in der AD-Gruppe höher (71,7% vs. 60,9%), allerdings ist dieser Trend mit  $p=0,071$  nicht signifikant. Mütter mit gesunden Kindern rauchen insgesamt gesehen vor, in und nach der Schwangerschaft häufiger.

Vor der Schwangerschaft rauchen 26% der Mütter mit später gesunden Kindern verglichen mit 10,5% der Mütter aus der AD-Gruppe ( $p=0,051$ ). Noch deutlicher und damit signifikant wird dieses Phänomen beim Rauchverhalten in der Schwangerschaft (25,3% vs. 7,9%,  $p=0,026$ ). Nach Geburt des Kindes rauchen 26,7% der Mütter mit gesunden Kindern und 13,2% der Mütter mit Kindern mit atopischer Dermatitis ( $p=0,092$ ). Diese differenzierte Beurteilung des Rauchverhaltens beruht jedoch insbesondere in der AD-Gruppe aufgrund der Gruppengröße nur noch auf sehr geringen Fallzahlen.

## **Eosinophile**

Kinder mit atopischer Dermatitis haben bereits im Alter von 5 Wochen und damit vor der Intervention einen signifikant höheren Anteil an eosinophilen Granulozyten (in % der Leukozyten). Während gesunde Kinder Ausgangswerte um 4,6% aufweisen, zeigen Kinder mit AD Werte um 5,6% ( $p=0,001$ ).

## **Darmflora**

Eine Kolonisation des Darmes mit Clostridium cluster I findet sich bei 58% der Kinder, die später eine AD entwickeln, und nur bei 43% der gesunden Kinder ( $p=0,035$ ). Für die Prävalenz der Besiedlung mit Bifidobakterien, Laktobazilli, E. coli, Clostridium difficile und Bacteroides fragilis group zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Erkrankungsgruppen.

In der Sensitivitätsanalyse zwischen den Erkrankungsgruppen zeigen sich zusammenfassend Unterschiede bezüglich des Geburtsgewichtes, der Eosinophilen, der Kolonisation des Darmes mit

Clostridium cluster I und im Rauchverhalten der Mutter. Der Anteil der Nichtraucherinnen unter den Müttern ist in der AD-Gruppe höher, Mütter mit gesunden Kindern rauchen sowohl vor, in als auch nach der Schwangerschaft häufiger.

## 4.2 Absolute Zytokintiter

Die Tabellen 14, 15 und 16 zeigen die Absolutwerte der Zytokintiter nach Stimulation des Vollblutes mit LPS, Der p1 und OVA im zeitlichen Verlauf zu den Visiten V5, V6 und V7. Erwartungsgemäß sind sie nach allergenspezifischer Stimulation mit Der p1 und OVA um ein Vielfaches niedriger als nach Stimulation mit LPS.

**Tabelle 14: Zytokintiter nach Stimulation des Vollblutes mit LPS, stratifiziert nach Erkrankung und Visit.** Die statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  definiert (AD versus Gesund; Mann-Whitney-U-Test<sup>1)</sup>).

Zytokin nach LPS-Stimulation	Visit	AD		Gesund		p-Wert <sup>1)</sup>	Vergleich der Varianzen (p-Wert)
		N	Titer [pg/ml] Mittelwert $\pm$ SD	N	Titer [pg/ml] Mittelwert $\pm$ SD		
IFN- $\gamma$	5	75	2.088 $\pm$ 2.833	326	1.984 $\pm$ 2.864	0,497	0,812
	6	66	2.771 $\pm$ 3.276	142	2.945 $\pm$ 3.315	0,774	0,784
	7	78	1.296 $\pm$ 1.598	229	1.456 $\pm$ 2.103	0,888	0,177
TNF- $\alpha$	5	75	6.084 $\pm$ 3.573	327	6.312 $\pm$ 3.350	0,537	0,215
	6	66	6.536 $\pm$ 3.209	141	7.181 $\pm$ 3.121	0,188	0,481
	7	78	5.644 $\pm$ 3.423	229	5.345 $\pm$ 3.439	0,484	0,932
IL-2	5	75	11,6 $\pm$ 4,7	327	13,7 $\pm$ 10,6	0,300	0,002 *
	6	66	20,5 $\pm$ 22,2	141	16,2 $\pm$ 12,3	0,254	0,011 *
	7	77	10,1 $\pm$ 0,7	228	11,3 $\pm$ 5,2	0,074	0,000 *
IL-4	5	75	34,5 $\pm$ 59,7	327	55,9 $\pm$ 120	0,019 *	0,038 *
	6	66	103 $\pm$ 287	141	89,8 $\pm$ 171	0,658	0,426
	7	77	36,9 $\pm$ 35,6	228	31,3 $\pm$ 36,6	0,003 *	0,656
IL-5	5	75	15,7 $\pm$ 14,2	327	13,8 $\pm$ 7,3	0,633	0,000 *
	6	66	31,4 $\pm$ 95,5	141	14,8 $\pm$ 8,3	0,466	0,000 *
	7	77	12,1 $\pm$ 4,7	228	12,2 $\pm$ 5,2	0,817	0,706
IL-10	5	75	5.056 $\pm$ 2.649	327	4.449 $\pm$ 2.446	0,075	0,140
	6	66	4.993 $\pm$ 2.913	141	4.679 $\pm$ 2.446	0,693	0,027 *
	7	78	3.881 $\pm$ 1.856	229	4.226 $\pm$ 2.073	0,207	0,241

**Tabelle 15: Zytokintiter nach Stimulation des Vollblutes mit dem Hausstauballergen Der p1, stratifiziert nach Erkrankung und Visit.** Die statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  definiert (AD versus Gesund; Mann-Whitney-U-Test<sup>1)</sup>).

Zytokin nach Der p1-Stimulation	Visit	AD		Gesund		p-Wert <sup>1)</sup>	Vergleich der Varianzen (p-Wert)
		N	Titer [pg/ml] Mittelwert $\pm$ SD	N	Titer [pg/ml] Mittelwert $\pm$ SD		
IFN- $\gamma$	5	75	58,3 $\pm$ 128,4	327	64,7 $\pm$ 227,6	0,917	0,612
	6	66	79,2 $\pm$ 122,9	142	69,6 $\pm$ 103,8	0,828	0,222
	7	85	94,1 $\pm$ 534,1	254	46,6 $\pm$ 148,6	0,347	0,022 *
TNF- $\alpha$	5	75	862,1 $\pm$ 1401,6	328	1220 $\pm$ 1697	0,005 *	0,189
	6	66	1155 $\pm$ 1772	141	1173 $\pm$ 1427	0,572	0,627
	7	85	1032 $\pm$ 1654	254	935 $\pm$ 1702	0,266	0,730
IL-2	5	75	21,6 $\pm$ 46,4	328	11,0 $\pm$ 3,7	0,009 *	0,000 *
	6	66	16,2 $\pm$ 11,3	141	12,3 $\pm$ 5,5	0,002 *	0,000 *
	7	84	68,0 $\pm$ 426,1	254	14,2 $\pm$ 19,6	0,549	0,000 *
IL-4	5	75	14,1 $\pm$ 16,0	328	18,6 $\pm$ 30,6	0,089	0,056
	6	66	23,4 $\pm$ 29,1	141	23,6 $\pm$ 28,1	0,434	0,987
	7	84	13,9 $\pm$ 19,4	254	14,0 $\pm$ 14,3	0,976	0,967
IL-5	5	75	11,9 $\pm$ 6,3	328	10,3 $\pm$ 1,8	0,002 *	0,000 *
	6	66	10,6 $\pm$ 2,1	141	10,4 $\pm$ 2,4	0,068	0,318
	7	84	31,0 $\pm$ 173,5	254	11,7 $\pm$ 13,0	0,179	0,001 *
IL-10	5	75	380,9 $\pm$ 424,7	328	404,4 $\pm$ 383,4	0,324	0,966
	6	66	435,2 $\pm$ 472,1	141	380,6 $\pm$ 330,6	0,758	0,168
	7	85	363,3 $\pm$ 870,1	254	335,6 $\pm$ 355,0	0,305	0,262

**Tabelle 16: Zytokintiter nach Stimulation des Vollblutes mit dem Hühnereiallergen OVA, stratifiziert nach Erkrankung und Visit.** Die statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  definiert (AD versus Gesund; Mann-Whitney-U-Test<sup>1)</sup>).

Zytokin nach OVA-Stimulation	Visit	AD		Gesund		p-Wert <sup>1)</sup>	Vergleich der Varianzen (p-Wert)
		N	Titer [pg/ml] Mittelwert $\pm$ SD	N	Titer [pg/ml] Mittelwert $\pm$ SD		
IFN- $\gamma$	5	75	132,9 $\pm$ 205,1	327	265,7 $\pm$ 884,5	0,554	0,032 *
	6	66	367,7 $\pm$ 979,9	142	395,1 $\pm$ 828,5	0,348	0,028 *
	7	84	85,9 $\pm$ 115,8	249	150,4 $\pm$ 442,1	0,901	0,021 *
TNF- $\alpha$	5	75	1174 $\pm$ 1420	328	1706 $\pm$ 2050	0,003 *	0,045 *
	6	66	1664 $\pm$ 2082	141	2089 $\pm$ 1985	0,027 *	0,422
	7	84	1989 $\pm$ 2353	249	1802 $\pm$ 2116	0,415	0,615
IL-2	5	75	10,8 $\pm$ 3,0	328	11,5 $\pm$ 5,2	0,725	0,028 *
	6	66	13,5 $\pm$ 10,1	141	13,2 $\pm$ 7,0	0,727	0,825
	7	83	10,2 $\pm$ 1,4	250	10,7 $\pm$ 3,0	0,166	0,006 *
IL-4	5	75	17,9 $\pm$ 22,9	328	22,9 $\pm$ 48,3	0,464	0,173
	6	66	29,0 $\pm$ 50,7	141	36,0 $\pm$ 59,0	0,631	0,179
	7	83	15,8 $\pm$ 11,1	249	16,0 $\pm$ 15,4	0,192	0,417
IL-5	5	75	10,3 $\pm$ 1,9	328	10,3 $\pm$ 1,8	0,845	0,807
	6	66	10,3 $\pm$ 1,2	141	10,3 $\pm$ 3,2	0,253	0,693
	7	83	10,0 $\pm$ 0,0	250	10,0 $\pm$ 1,0	0,317	0,158
IL-10	5	75	856,8 $\pm$ 620,0	328	836,5 $\pm$ 579,7	0,876	0,666
	6	66	863,2 $\pm$ 544,9	141	942,7 $\pm$ 661,4	0,481	0,562
	7	84	970,1 $\pm$ 858,0	249	972,2 $\pm$ 700,7	0,716	0,782

Die Zytokintiter zeigen eine hohe intra- und interindividuelle Variabilität und unterliegen einer circadianen Fluktuation. Dem kann aufgrund des Studiendesigns, der Ökonomisierung von Abläufen und mit der Verwendung eines gemeinsamen Assays für alle sechs Zytokine nur bedingt Rechnung getragen werden. Die Verteilung der Zytokine unterscheidet sich kaum in den Erkrankungsgruppen, gleiches gilt für die Analyse der Varianzen.

Die Titer von IL-2 bewegen sich zu allen Visits nahe der unteren Bestimmungsgrenze von 10 pg/ml und werden bei den folgenden Auswertungen nicht mehr berücksichtigt.

### 4.3 Zytokintiter-Differenzen

Um der intraindividuellen Variabilität der Zytokintiter über die Zeit Rechnung zu tragen, wurden Titerdifferenzen berechnet. Demnach entsteht bei einem Titeranstieg ein positiver Wert, bei einer Titerabnahme eine negative Differenz. Anschließend wurden die Differenzen kategorisiert und eine Frequenzanalyse durchgeführt. In die Analyse konnten zu V5 348 und zu V7 262 Probanden eingeschlossen werden.

#### 4.3.1 Absolute Titerdifferenzen nach Erkrankungsgruppen

Die Tabellen 17, 18 und 19 zeigen die absoluten Titerdifferenzen für die Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-4 und IL-5 nach Stimulation mit LPS, Der p1 und OVA für V5 und V7. Zwischen den Erkrankungsgruppen zeigten sich kaum Unterschiede im Vergleich der Mittelwerte der Titerdifferenzen.

**Tabelle 17: Zytokintiterdifferenzen (V5-V2 bzw. V7-V2) nach Stimulation des Vollblutes mit LPS, stratifiziert nach Erkrankung und Visit.** Die statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  definiert (AD versus Gesund; T-Test).

Visit	Zytokin (LPS)	Zytokin-Titerdifferenz zu V2 [pg/ml]							
		AD		Gesund		p-Wert	AD	Gesund	p-Wert
		n	Mittelwert $\pm$ SD [pg/ml]	n	Mittelwert $\pm$ SD [pg/ml]		Varianz [pg <sup>2</sup> /ml <sup>2</sup> ]	Varianz [pg <sup>2</sup> /ml <sup>2</sup> ]	
5	IFN- $\gamma$	64	45,9 $\pm$ 3.077	283	-51,9 $\pm$ 3.048	0,819	9.468.016	9.288.537	0,890
	TNF- $\alpha$	64	-562 $\pm$ 2.973	284	-368 $\pm$ 3.521	0,650	8.840.420	12.399.000	0,107
	IL-4	64	8,1 $\pm$ 34,2	284	-6,1 $\pm$ 162,3	0,177	1.171	26.345	0,000 *
	IL-5	64	-10,1 $\pm$ 21,2	284	-6,6 $\pm$ 17,1	0,223	451	294	0,021 *
	IL-10	64	-1.181 $\pm$ 2.707	284	-669 $\pm$ 2.649	0,173	7.329.646	7.019.118	0,793
7	IFN- $\gamma$	68	-771 $\pm$ 2.678	194	-681 $\pm$ 3.138	0,820	7.171.988	9.850.063	0,132
	TNF- $\alpha$	68	-1.209 $\pm$ 4.506	194	-1.422 $\pm$ 4.030	0,731	20.306.000	16.240.000	0,245
	IL-4	67	8,7 $\pm$ 71,4	193	-47,2 $\pm$ 145	0,000 *	5.104	21.025	0,000 *
	IL-5	67	-11,2 $\pm$ 19,0	193	-8,0 $\pm$ 16,0	0,218	362	254	0,068
	IL-10	68	-2.402 $\pm$ 3.808	194	-860 $\pm$ 3.346	0,004 *	14.502.000	11.195.000	0,178

**Tabelle 18: Zytokintiterdifferenzen (V5-V2 bzw. V7-V2) nach Stimulation des Vollblutes mit dem Hausstauballergen Der p1, stratifiziert nach Erkrankung und Visit.** Die statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  definiert (AD versus Gesund; T-Test).

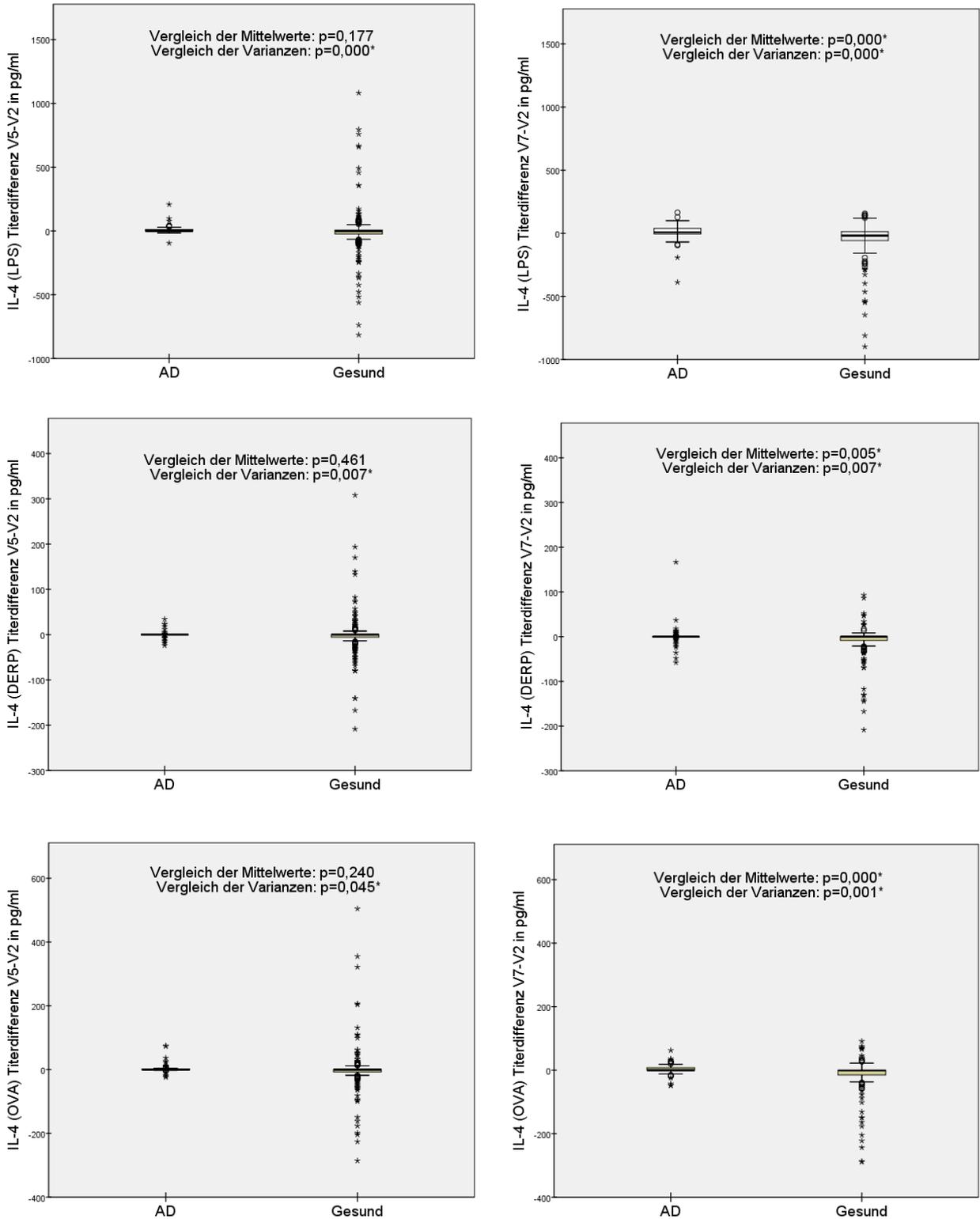
Visit	Zytokin (Der p1)	Zytokin-Titerdifferenz zu V2 [pg/ml]							
		AD		Gesund			AD	Gesund	
		n	Mittelwert $\pm$ SD [pg/ml]	n	Mittelwert $\pm$ SD [pg/ml]	p-Wert	Varianz [pg <sup>2</sup> /ml <sup>2</sup> ]	Varianz [pg <sup>2</sup> /ml <sup>2</sup> ]	p-Wert
5	IFN- $\gamma$	64	8,6 $\pm$ 140,9	285	-2,1 $\pm$ 260,2	0,646	19.849	67.691	0,707
	TNF- $\alpha$	64	-631,4 $\pm$ 2.018	286	-406,4 $\pm$ 2.290	0,434	4.073.977	5.245.610	0,855
	IL-4	64	0,3 $\pm$ 8,3	286	-1,5 $\pm$ 38,2	0,461	69	1.462	0,007*
	IL-5	64	0,4 $\pm$ 7,4	286	-1,3 $\pm$ 7,1	0,102	55	51	0,621
	IL-10	64	-234,5 $\pm$ 748,5	286	-62,7 $\pm$ 517,7	0,085	560.306	268.060	0,031*
7	IFN- $\gamma$	76	48,5 $\pm$ 565,0	217	-30,4 $\pm$ 186,5	0,235	319.194	34.777	0,131
	TNF- $\alpha$	76	-550,1 $\pm$ 2.507	217	-945,3 $\pm$ 2.138	0,222	6.283.115	4.570.038	0,444
	IL-4	75	0,5 $\pm$ 22,9	217	-9,2 $\pm$ 31,9	0,005 *	527	1.015	0,007*
	IL-5	75	20,3 $\pm$ 182,7	217	0,6 $\pm$ 15,4	0,354	33.371	237	0,001*
	IL-10	76	-281,3 $\pm$ 1.157	217	-146,2 $\pm$ 594,3	0,333	1.338.083	353.167	0,015*

Für IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  bestehen zu keinem der Messzeitpunkte oder Stimulationen signifikante Unterschiede zwischen den Erkrankungsgruppen bezüglich der absoluten Titerdifferenzen oder deren Varianzen. Für IL-5 zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Mittelwerten, allerdings sind die Varianzen für LPS zu V5 sowie für Der p1 zu V5 und V7 in der AD-Gruppe signifikant größer. Nach OVA-Stimulation sind die Varianzen in der Gruppe der gesunden Kinder größer. Probanden der AD-Gruppe zeigen für IL-10 nach LPS-Stimulation zu V7 und nach OVA-Stimulation zu V5 einen 3- bis 4-fach höheren Abfall des Titers als die gesunden Kinder. Die Varianzen von IL-10 unterscheiden sich nur nach Der p1-Stimulation signifikant und sind in der AD-Gruppe größer.

**Tabelle 19: Zytokintiterdifferenzen (V5-V2 bzw. V7-V2) nach Stimulation des Vollblutes mit dem Hühnereiallergen OVA, stratifiziert nach Erkrankung und Visit.** Die statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  definiert (AD versus Gesund; T-Test).

Visit	Zytokin (OVA)	Zytokin-Titerdifferenz zu V2 [pg/ml]							
		AD		Gesund		p-Wert	AD	Gesund	p-Wert
		n	Mittelwert $\pm$ SD [pg/ml]	n	Mittelwert $\pm$ SD [pg/ml]		Varianz [pg <sup>2</sup> /ml <sup>2</sup> ]	Varianz [pg <sup>2</sup> /ml <sup>2</sup> ]	
5	IFN- $\gamma$	64	-115,5 $\pm$ 404,2	285	-44,2 $\pm$ 1.215,4	0,418	163.388	1.477.197	0,253
	TNF- $\alpha$	64	-386,9 $\pm$ 1.882	286	91,8 $\pm$ 2.449	0,086	3.540.792	5.995.684	0,087
	IL-4	64	3,2 $\pm$ 15,3	286	-1,5 $\pm$ 59,8	0,240	235	3.579	0,045*
	IL-5	64	-1,9 $\pm$ 5,4	286	-1,1 $\pm$ 7,4	0,319	29	55	0,231
	IL-10	64	-397,6 $\pm$ 955,4	286	-100,5 $\pm$ 859,0	0,025 *	912.797	737.944	0,353
7	IFN- $\gamma$	75	-154,2 $\pm$ 400,3	211	-181,4 $\pm$ 861,2	0,718	160.213	741.733	0,339
	TNF- $\alpha$	75	484,3 $\pm$ 2.786	211	123,6 $\pm$ 2.332	0,318	7.764.127	5.437.959	0,267
	IL-4	74	2,0 $\pm$ 16,0	211	-13,5 $\pm$ 49,1	0,000 *	257	2415	0,001*
	IL-5	74	-2,0 $\pm$ 5,3	212	-1,3 $\pm$ 8,5	0,412	28	73	0,350
	IL-10	75	-120,0 $\pm$ 1.185	211	29,9 $\pm$ 981,5	0,328	1.404.103	963.314	0,346

Die Titerdifferenzen des Th2-Zytokins IL-4 zeigen bei allen Stimulationen ein konsistentes Bild: Die Mittelwerte der Titerdifferenzen zu V7 unterscheiden sich in allen Stimulationen signifikant und liegen für die AD-Gruppe höher als für die gesunden Kinder. Während bei den kranken Kindern kaum bzw. eher eine positive Titeränderung zu verzeichnen ist, nehmen die Titer der Kontrollgruppe ab. Die Varianz der Werte unterscheidet sich zu beiden Zeitpunkten und in allen Stimulationen hoch signifikant und ist in der Gruppe der atopischen Kinder deutlich geringer. Die deutlichen Unterschiede zwischen den Varianzen der Differenzen als Maß für die Streuung verdeutlicht sich auch optisch bereits in der größeren und meist unsymmetrischen Streubreite der Messpunkte, wie in der folgenden Abbildung 11 für IL-4 gezeigt wird.



**Abbildung 11: Boxplots der Titerdifferenzen von IL-4 zu V5 (links) und V7 (rechts) nach Stimulation des Vollblutes mit LPS, Der p1 und OVA, stratifiziert nach Erkrankungsgruppen**

#### 4.3.2 Kategorisierte Titerdifferenzen (Shifts)

Die berechneten Titerdifferenzen von V5-V2 und V7-V2 werden anschließend im Sinne eines Vorzeichentests kategorisiert, um mögliche Unterschiede zwischen den Erkrankungsgruppen in Korrelation zu den Kategorien noch deutlicher hervortreten zu lassen. Zudem fließen die Kategorien in die anschließende Regressionsanalyse ein. Die entstehenden Kategorien „Shift +“, „Shift –“, und „kein Shift“ werden zunächst einer Frequenzanalyse, stratifiziert nach Visit und Erkrankung unterzogen. Die Ergebnisse zeigen die Tabellen 20 und 21.

**Tabelle 20: Kategorisierte Zytokintiterdifferenzen (V5-V2), stratifiziert nach Erkrankung und Visit.** Die statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  definiert (AD versus Gesund; Chi-Quadrat-Test).

Zytokin	Stimulation	n (%)						p
		AD (N=64)			Gesund (N=284)			
		Shift +	Shift –	kein Shift	Shift +	Shift –	kein Shift	
IFN- $\gamma$	LPS	32 (50,0)	30 (46,9)	2 (3,1)	113 (39,9)	147 (51,9)	23 (8,1)	0,188
	Der p1	18 (28,1)	28 (43,8)	18 (28,1)	87 (30,5)	140 (49,1)	58 (20,4)	0,394
	OVA	17 (26,6)	37 (57,8)	10 (15,6)	96 (33,7)	157 (55,1)	32 (11,2)	0,421
TNF- $\alpha$	LPS	18 (28,1)	24 (37,5)	22 (34,4)	98 (34,5)	115 (40,5)	71 (25,0)	0,290
	Der p1	19 (29,7)	42 (65,6)	3 (4,7)	100 (35,0)	172 (60,1)	14 (4,9)	0,708
	OVA	24 (37,5)	38 (59,4)	2 (3,1)	122 (42,7)	141 (49,3)	23 (8,0)	0,208
IL-4	LPS	24 (37,5)	15 (23,4)	25 (39,1)	77 (27,1)	130 (45,8)	77 (27,1)	0,005*
	Der p1	8 (12,5)	10 (15,6)	46 (71,9)	57 (19,9)	92 (32,2)	137 (47,9)	0,002*
	OVA	17 (26,6)	14 (21,9)	33 (51,6)	60 (21,0)	101 (35,3)	125 (43,7)	0,115
IL-5	LPS	6 (9,4)	38 (59,4)	20 (31,2)	45 (15,8)	160 (56,3)	79 (27,8)	0,408
	Der p1	6 (9,4)	10 (15,6)	48 (75,0)	9 (3,1)	35 (12,2)	242 (84,6)	0,055
	OVA	1 (1,6)	10 (15,6)	53 (82,8)	7 (2,4)	33 (11,5)	246 (86,0)	0,621
IL-10	LPS	14 (21,9)	30 (46,9)	20 (31,2)	87 (30,6)	136 (47,9)	61 (21,5)	0,171
	Der p1	19 (29,7)	36 (56,2)	9 (14,1)	130 (45,5)	129 (45,1)	27 (9,4)	0,063
	OVA	14 (21,9)	40 (62,5)	10 (15,6)	128 (44,8)	121 (42,3)	37 (12,9)	0,003*

Für IL-4 besteht sowohl nach LPS- als auch nach Der p1-Stimulation eine signifikante Assoziation zwischen den kategorisierten Zytokintiterdifferenzen (V5-V2) und den Erkrankungsgruppen. Nach LPS-Stimulation zeigen 39% der kranken Kinder und 27% der gesunden Probanden keine Titeränderung ( $p=0,005$ ), nach Der p1-Stimulation sind es jeweils 72% bzw. 48%. Zudem ist die

AD assoziiert mit einer geringeren Häufigkeit an negativen Shifts (LPS 23% vs. 46%; Der p1 16% vs. 32%).

Für die Stimulation mit OVA zeigt nur IL-10 signifikante Unterschiede in den kategorisierten Titerdifferenzen zwischen den Erkrankungsgruppen. In der AD-Gruppe weisen im Gegensatz zu 45% der gesunden Kinder nur 22% einen positiven Shift auf.

Für IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-5 besteht zu V5 keine Assoziation zwischen den Zytokinshifts und der atopischen Dermatitis.

**Tabelle 21: Kategorisierte Zytokintiterdifferenzen (V7-V2), stratifiziert nach Erkrankung und Visit.** Die statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  definiert (AD versus Gesund; Chi-Quadrat-Test).

Zytokin	Stimulation	n (%)						p
		AD (N=76)			Gesund (N=217)			
		Shift +	Shift –	kein Shift	Shift +	Shift –	kein Shift	
IFN- $\gamma$	LPS	25 (36,8)	39 (57,4)	4 (5,9)	78 (40,2)	109 (56,2)	7 (3,6)	0,676
	Der p1	22 (28,9)	35 (46,1)	19 (25,0)	53 (24,4)	130 (59,9)	34 (15,7)	0,079
	OVA	23 (30,7)	44 (58,7)	8 (10,7)	52 (24,6)	137 (64,9)	22 (10,4)	0,574
TNF- $\alpha$	LPS	24 (35,3)	37 (54,4)	7 (10,3)	50 (25,8)	112 (57,7)	32 (16,5)	0,222
	Der p1	24 (31,6)	50 (65,8)	2 (2,6)	40 (18,4)	169 (77,9)	8 (3,7)	0,057
	OVA	36 (48,0)	35 (46,7)	4 (5,3)	78 (37,0)	118 (55,9)	15 (7,1)	0,242
IL-4	LPS	44 (65,7)	18 (26,9)	5 (7,5)	72 (37,3)	111 (57,5)	10 (5,2)	0,000*
	Der p1	15 (20,0)	15 (20,0)	45 (60,0)	29 (13,4)	94 (43,3)	94 (43,3)	0,001*
	OVA	26 (35,1)	15 (20,3)	33 (44,6)	43 (20,4)	102 (48,3)	66 (31,3)	0,000*
IL-5	LPS	5 (7,5)	40 (59,7)	22 (32,8)	20 (10,4)	113 (58,5)	60 (31,1)	0,781
	Der p1	6 (8,0)	12 (16,0)	57 (76,0)	16 (7,4)	25 (11,5)	176 (81,1)	0,579
	OVA	0 (0,0)	11 (14,9)	63 (85,1)	2 (0,9)	25 (11,8)	185 (87,3)	0,566
IL-10	LPS	14 (20,6)	44 (64,7)	10 (14,7)	74 (38,1)	100 (51,5)	20 (10,3)	0,029*
	Der p1	21 (27,6)	51 (67,1)	4 (5,3)	71 (32,7)	118 (54,4)	28 (12,9)	0,080
	OVA	31 (41,3)	40 (53,3)	4 (5,3)	102 (48,8)	83 (39,3)	25 (11,8)	0,064

Signifikante Assoziationen ergeben sich für IL-4 auch zu V7. Unter allen Stimulationen lässt sich ein Zusammenhang von AD mit deutlich häufigerer Titerzunahme und seltenerer Titerabnahme

darstellen. Für die Stimulationen mit Der p1 und OVA ist die AD auch mit einem höheren Anteil an stagnierenden IL-4-Titern (kein Shift) verbunden.

Für IL-10 zeigt nur die Stimulation mit LPS signifikante Unterschiede zwischen den Shiftkategorien und der AD-Prävalenz. Ein deutlich höherer Anteil der AD-Gruppe von 65% zeigt eine Titerabnahme, in der Gruppe der gesunden Kinder sind es nur 52%. Einen positiven Shift weisen 38% der gesunden Probanden und nur 21% der kranken Kinder auf.

Für IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-5 besteht auch zu V7 keine Assoziation zwischen den Zytokinshifts und der atopischen Dermatitis.

Zusammenfassend zeigen die absoluten Zytokintiter von INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-5, IL-4 und IL-2 keine Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen und kaum Unterschiede zwischen den Erkrankungsgruppen. Im longitudinalen Verlauf finden sich keine systematischen Unterschiede zu den Messzeitpunkten.

Deutliche Unterschiede fallen in den Varianzen der Titer und Titerdifferenzen auf. Für IL-4 zeigt sich in der AD-Gruppe eine konsistent niedrigere Streubreite als in der Gruppe der gesunden Kinder.

Die absoluten und kategorisierten Titerdifferenzen zeigen, dass ein hoher Titer von IL-4 bzw. ein Titeranstieg mit einer höheren AD-Prävalenz verbunden ist; die Daten unterstützen damit die wichtige Rolle von IL-4 als Th2-Zytokin in der Pathogenese der AD. IL-10 zeigt als Zytokin regulatorischer T-Zellen eine Assoziation der Titerhöhe bzw. des Titeranstiegs mit niedriger AD-Prävalenz. Für INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-5 und IL-2 finden sich keine Unterschiede zwischen den Erkrankungsgruppen.

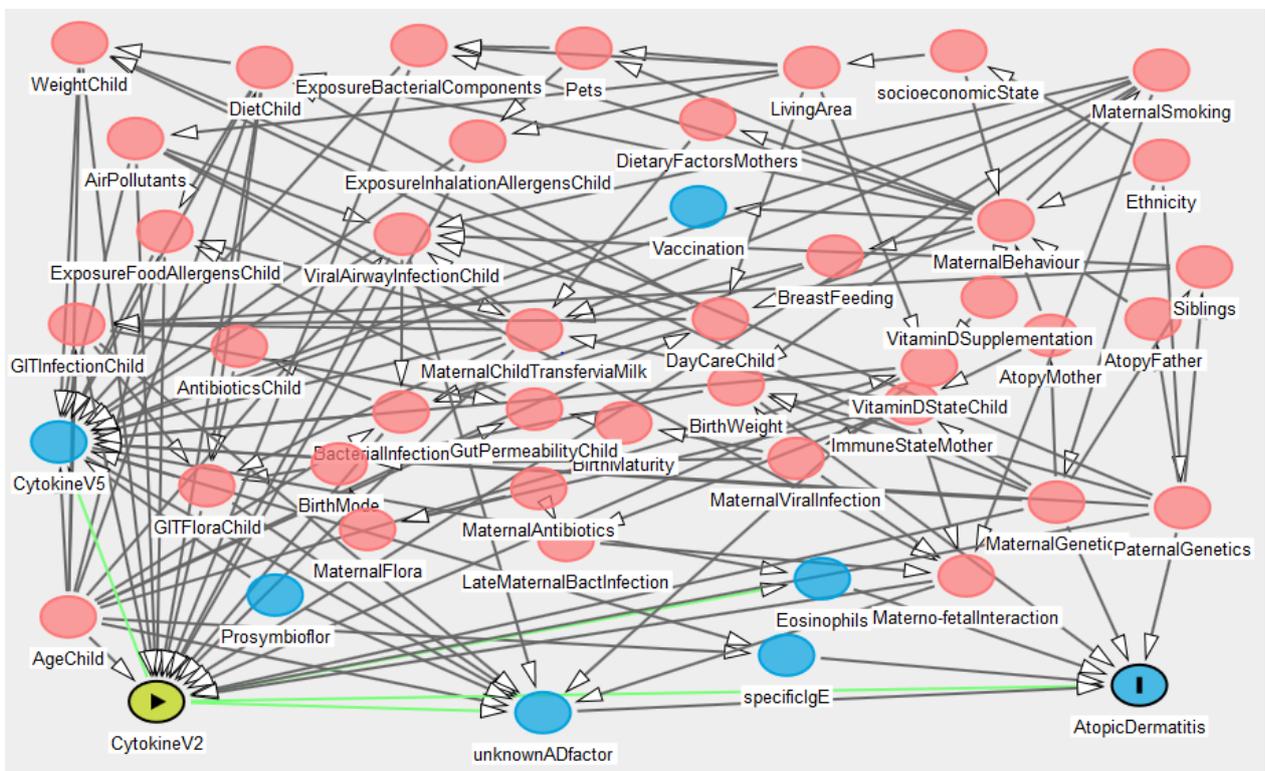
#### **4.4 Einfluss des Zytokinprofils auf die Entwicklung einer atopischen Dermatitis - Regressionsmodelle**

Anhand eines Regressionsmodells sollen die Faktoren bestimmt werden, die zu den Zeitpunkten V5 bzw. V7 einen Einfluss auf die Entwicklung einer atopischen Dermatitis haben. Es wird eine binäre logistische Regressionsanalyse (*stepwise forward*) durchgeführt. Die atopische Dermatitis geht als abhängige Variable und alle übrigen aus dem DAG (*directed acyclic graph*) ermittelten Parameter als unabhängige Variablen in das Modell ein. Die Odds ratio zeigt den Einfluss auf die

atopische Dermatitis an, der p-Wert das Signifikanzniveau. Für die Zytokine werden die kategorisierten Titerdifferenzen einbezogen.

#### 4.4.1 Kausaler Graph

Für die vorliegende Fragestellung wurde ein komplexes DAG mit dem Zytokinprofil zu Visit 2 als Expositionsvariable und der atopischen Dermatitis als Outcome zu Visit 7 erstellt. Mithilfe einer ausführlichen Literaturrecherche und Expertenwissen wurden insgesamt weitere 45 Variablen berücksichtigt. Zur unterstützenden computerbasierten Auswertung wurde das von Johannes Textor entwickelte und online verfügbare Tool DAGitty verwendet [75].



**Abbildung 12: DAG mit dem Zytokinprofil zu Visit 2 als Expositionsvariable und der atopischen Dermatitis als Outcome zu Visit 7**

Aufgrund der Komplexität der Fragestellung durch die Vielzahl der zu berücksichtigenden Variablen und Interaktionen enthält das *minimal sufficient adjustment set*, das den totalen kausalen

Effekt der ZytokineV2 auf die atopische Dermatitis beschreibt, noch 17 Kovariaten zur Adjustierung:

Alter, aktuelles Gewicht, Ernährung, Vitamin-D-Status, Darmflora, virale gastrointestinale und Atemwegsinfektionen, bakterielle Infektion, Exposition mit bakteriellen Komponenten über die Umwelt (wie zum Beispiel LPS in organischen Stäuben, Exposition mit Nahrungsmittel- und Inhalationsallergenen, Luftverschmutzung, Transfer via Muttermilch zwischen Mutter und Kind, mütterliche Atopie, väterliche Atopie, Rauchverhalten der Mutter und die maternal-fetale Interaktion.

In das Regressionsmodell einbezogen werden neben den kategorisierten Zytokintiterdifferenzen als Expositionsvariablen und der AD als Outcome-Variable zu Visit 5 bzw. Visit 7 die folgenden Parameter: die elterliche Atopie-Heredität, das Geburtsgewicht, das Geschlecht, die Intervention, der Geburtsmodus, die Anzahl älterer Geschwister, die Stilldauer, das Rauchverhalten der Mutter vor, in und nach der Schwangerschaft, die intestinale Flora (als Prävalenz der Kolonisation mit Clostridium Cluster I, Bacteroides fragilis, Bifidobakterien, Lactobazilli, E. coli und Clostridium difficile) sowie der Eosinophilen-Score zu V2 und der Score unerwünschter Ereignisse. Letzterer repräsentiert sowohl die bakteriellen als auch die viralen Infektionen. Die Exposition gegenüber Antigenen und Allergenen wird neben den unerwünschten Ereignissen auch durch den Geburtsmodus, die Intervention und der Anzahl älterer Geschwister vertreten. Der Eosinophilen-Score wird aufgrund der Unterschiede zwischen den Erkrankungsgruppen in der Sensitivitätsanalyse zu Beginn der Untersuchung zusätzlich in das Modell aufgenommen. Das Alter der Kinder wurde bei einheitlichen Werten zu den Messzeitpunkten nicht im Modell berücksichtigt.

Die Parameter Ernährung (teilweise berücksichtigt in Stilldauer), Vitamin-D-Status und Luftverschmutzung können nicht oder nur unzureichend gemessen werden und können daher zu residuellem Confounding führen, was bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten ist.

#### **4.4.2 Regressionsmodell V5**

Angaben zu allen Variablen hatten 317 Fälle, die in die Analyse aufgenommen werden können. Als Einflussfaktoren auf die atopische Dermatitis zum Zeitpunkt V5 im Alter von 7 Monaten (Tabelle 22) werden der IL-4-Shift, das Rauchverhalten der Mutter nach der Schwangerschaft und der Eosinophilen-Score ( $<$  oder  $\geq 5\%$  der Leukozyten zu V2) identifiziert. Auch für den IL-10-Shift

und die Kolonisation mit Bifidobakterien wird ein Zusammenhang gefunden. Stärke und Richtung des Einflusses wird im Folgenden für die Faktoren einzeln erörtert.

Keinen Einfluss auf die atopische Dermatitis zu Visit 5 haben die Shifts von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-5 sowie IL-2, das Geschlecht des Kindes, das Geburtsgewicht, der Geburtsmodus, die Anzahl der Geschwister, die familiäre Atopiebelastung, die Stilldauer, das Rauchverhalten der Mutter vor sowie in der Schwangerschaft, die Intervention mit Pro-Symbioflor<sup>®</sup>, die Prävalenz von E. coli, Clostridium difficile, Clostridium cluster I (Clostridium sensu stricto), Bacteroides fragilis group und Lactobacilli, der UE-Score (entzündliche bzw. infektiöse Erkrankung in der Woche vor dem Visit) sowie die Haustierhaltung.

**Tabelle 22: Einflussfaktoren auf die Prävalenz der atopischen Dermatitis zu V5.** Die statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  definiert (Logistische Regression).

Parameter	Odds Ratio	95% Konfidenzintervall		p-Wert
		Untere Grenze	Obere Grenze	
IL-4 (LPS) Shift +	0,873	0,415	1,836	0,721
IL-4 (LPS) Shift -	0,336	0,157	0,719	0,005 *
IL-10 (LPS) Shift +	0,463	0,201	1,064	0,070
IL-10 (LPS) Shift -	0,680	0,334	1,387	0,289
TNF- $\alpha$ (LPS) Shift +	0,729	0,336	1,584	0,425
TNF- $\alpha$ (LPS) Shift -	0,858	0,412	1,787	0,682
Geburtsgewicht	1,001	0,100	1,001	0,135
Rauchen nach der Schwangerschaft pos.	0,425	0,190	0,949	0,037 *
Eosinophilen-Score $\geq 5\%$	1,991	1,091	3,634	0,025 *
Prävalenz Bacteroides fragilis neg.	0,644	0,337	1,231	0,183
Prävalenz Bifidobakterien pos.	6,002	0,772	46,649	0,087

#### IL-4

Ein negativer Shift von IL-4 und damit eine Titerabnahme zwischen V2 und V5 ist mit einer niedrigeren Prävalenz der atopischen Dermatitis (24% vs. 39% bei Shift 0) assoziiert (OR 0,35; CI 0,1569 - 0,7187;  $p=0,0049$ ).

**Tabelle 23: Häufigkeitsverteilung zwischen den Kategorien von AD und dem IL-4 Shift zu V5**

n (%)	IL-4 (LPS) Shift			Gesamt
	Shift +	Shift -	Kein Shift	
AD	23 (37,1)	15 (24,2)	24 (38,7)	62 (100,0)
Gesund	70 (27,5)	117 (45,9)	68 (26,7)	255 (100,0)
Gesamt	93 (29,3)	132 (41,6)	92 (29,0)	317 (100,0)

### **Rauchverhalten der Mutter nach der Schwangerschaft**

Rauchte die Mutter nach der Schwangerschaft, war die Prävalenz der AD mit 12% deutlich geringer als bei 22% AD-Fällen bei nichtrauchenden Müttern (OR 0,43; p=0,037). Allerdings beruht dies auf einer Fallzahl von n=9 für Kinder mit AD und rauchender Mutter.

**Tabelle 24: Häufigkeitsverteilung zwischen den Kategorien von AD und Rauchen nach der Schwangerschaft zu V5**

n (%)	Rauchen nach der Schwangerschaft		Gesamt
	ja	nein	
AD	9 (12,0)	53 (21,9)	62 (19,6)
Gesund	66 (88,0)	189 (78,1)	255 (80,4)
Gesamt	75 (100,0)	242 (100,0)	317 (100,0)

n (%)	Rauchen nach der Schwangerschaft		Gesamt
	ja	nein	
AD	9 (14,5)	52 (85,5)	62 (100,0)
Gesund	66 (25,9)	189 (74,1)	255 (100,0)
Gesamt	75 (23,7)	242 (76,3)	317 (100,0)

In der AD-Gruppe rauchen 14% der Mütter nach der Schwangerschaft im Vergleich zu 26% der Mütter gesunder Kinder. In der AD-Gruppe ist auch der Anteil der Nichtraucherinnen mit 86% am größten.

## Eosinophilen-Score

Ein erhöhter Eosinophilen-Score von über 5% zu V2 bedeutet eine höhere AD-Prävalenz von 26% verglichen mit 15% bei normalem Score unter 5%. Ein normwertiger Eosinophilenscore kann demnach als protektiver Parameter auf die atopische Dermatitis gewertet werden (OR 1,99;  $p=0,025$ ).

**Tabelle 25: Häufigkeitsverteilung zwischen den Kategorien von AD zu V5 und dem Eosinophilen-Score zu V2**

n (%)	Eosinophilen-Score V2		Gesamt
	$\geq 5\%$ Erhöht	$< 5\%$ Normal	
AD	34 (26,2)	28 (15,0)	62 (19,6)
Gesund	96 (73,8)	159 (85,0)	255 (80,4)
Gesamt	130 (100,0)	187 (100,0)	317 (100,0)

## IL-10

Ein positiver Shift von IL-10 ist mit einem Trend für ein geringeres Auftreten von atopischer Dermatitis verknüpft und senkt die Prävalenz von 31% für Shift none auf 21%, allerdings ist dies statistisch nicht signifikant (OR 0,46;  $p=0,07$ ).

**Tabelle 26: Häufigkeitsverteilung zwischen den Kategorien von AD und dem IL-10 Shift zu V5**

n (%)	IL-10 (LPS) Shift			Gesamt
	Shift +	Shift -	Kein Shift	
AD	13 (21,0)	30 (48,4)	19 (30,6)	62 (100,0)
Gesund	81 (31,8)	121 (47,5)	52 (20,8)	255 (100,0)
Gesamt	94 (29,7)	151 (47,6)	72 (22,7)	317 (100,0)

## Kolonisation des Darmtrakts mit Bifidobakterien

Fand sich zu V5 eine Kolonisation des Darmes mit Bifidobakterien, zeigte sich ein Trend ( $p=0,087$ ) zu erhöhter AD-Prävalenz (OR 6,0). Allerdings waren nur wenige Probanden nicht mit Bifidobakterien kolonisiert ( $n=21$ , davon  $n=1$  mit AD), weshalb das Ergebnis als klinisch nicht verwertbar angesehen wird.

**Tabelle 27: Häufigkeitsverteilung zwischen den Kategorien von AD und der Kolonisation mit Bifidobakterien zu V5**

n (%)	Kolonisation mit Bifidobakterien		Gesamt
	Kolonisiert	Nicht kolonisiert	
AD	61 (20,6)	1 (4,8)	62 (19,6)
Gesund	235 (79,4)	20 (95,2)	255 (80,4)
Gesamt	296 (100,0)	21 (100,0)	317 (100,0)

#### 4.4.3 Regressionsmodell V7

Angaben zu allen Variablen hatten 237 Fälle, die in die Analyse einbezogen werden konnten. Als Einflussfaktoren auf die atopische Dermatitis zum Zeitpunkt V7 im Alter von 2 Jahren wurde der IL-4-Shift identifiziert. Auch für den TNF- $\alpha$ -Shift, die Kolonisation mit Bacteroides fragilis group und den Eosinophilen score wird ein Zusammenhang gefunden.

Keinen Einfluss auf die atopische Dermatitis zu Visit 7 haben demnach die Shifts von IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-5 sowie IL-2, das Geschlecht des Kindes, das Geburtsgewicht, der Geburtsmodus, die Anzahl der Geschwister, die familiäre Atopiebelastung, die Stilldauer, das Rauchverhalten der Mutter (vor, in bzw. nach der Schwangerschaft), die Intervention mit Pro-Symbioflor<sup>®</sup>, die Prävalenz von Bifidobacteria, E. coli, Clostridium difficile, Clostridium cluster I (Clostridium sensu stricto) und Lactobacilli, der Eosinophilen-Score (< oder  $\geq$  5% zu V2), der UE-Score (entzündliche bzw. infektiöse Erkrankung in der Woche vor dem Visit) sowie die Haustierhaltung.

**Tabelle 28: Einflussfaktoren auf die Prävalenz der atopischen Dermatitis zu V7.** Die statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  definiert (Logistische Regression).

Parameter	Odds Ratio	95% Konfidenzintervall		p-Wert
		Untere Grenze	Obere Grenze	
TNF- $\alpha$ (LPS) Shift +	2,561	0,859	7,639	0,092
TNF- $\alpha$ (LPS) Shift -	1,742	0,632	4,804	0,284
IL-4 (LPS) Shift +	1,252	0,380	4,123	0,712
IL-4 (LPS) Shift -	0,221	0,062	0,789	0,020 *
Rauchen nach der Schwangerschaft pos.	0,525	0,240	1,149	0,107
Prävalenz Bacteroides fragilis pos.	0,523	0,255	1,073	0,077
Eosinophilen-Score $\geq$ 5%	1,895	0,997	3,602	0,051

## IL-4

Ein negativer Shift von IL-4 zwischen V2 und V7 ist mit einer geringeren AD-Prävalenz verbunden (OR 0.2) und senkt diese von 36% auf 13% im Vergleich zu Shift none (OR 0,20;  $p=0,02$ ).

**Tabelle 29: Häufigkeitsverteilung zwischen den Kategorien von AD und dem IL-4 Shift zu V7**

n (%)	IL-4 (LPS) Shift			Gesamt
	Shift +	Shift -	Kein Shift	
AD	42 (39,3)	15 (12,9)	5 (35,7)	62 (26,2)
Gesund	65 (60,7)	101 (87,1)	9 (64,3)	175 (73,8)
Gesamt	107 (100,0)	116 (100,0)	14 (100,0)	237 (100,0)

## TNF- $\alpha$

Zeigt sich eine Titerzunahme von TNF- $\alpha$ , ist dies mit einem Trend zu höherer AD-Prävalenz bei einer Odds ratio von 2,56 ( $p=0,09$ ) verbunden. Das Risiko einer AD steigt im Vergleich zu Shift none von 16% auf 32%.

**Tabelle 30: Häufigkeitsverteilung zwischen den Kategorien von AD und dem TNF- $\alpha$  Shift zu V7**

n (%)	TNF- $\alpha$ (LPS) Shift			Gesamt
	Shift +	Shift -	Kein Shift	
AD	20 (31,7)	36 (26,3)	6 (16,2)	62 (26,2)
Gesund	43 (68,3)	101 (73,7)	31 (83,8)	175 (73,8)
Gesamt	63 (100,0)	137 (100,0)	37 (100,0)	237 (100,0)

## Eosinophilen-Score

Ein erhöhter Eosinophilen-Score zu V2 bedeutet eine höhere AD-Prävalenz, ein normwertiger Eosinophilenscore bedeutet einen allerdings statistisch nicht signifikanten protektiven Effekt und senkt das AD-Risiko von 33% auf 22% (OR 1,89;  $p=0,051$ ).

**Tabelle 31: Häufigkeitsverteilung zwischen den Kategorien von AD zu V7 und dem Eosinophilen-Score zu V2**

n (%)	Eosinophilen-Score V2		Gesamt
	≥5% Erhöht	<5% Normal	
AD	31 (33,3)	31 (21,5)	62 (26,2)
Gesund	62 (66,7)	113 (78,5)	175 (73,8)
Gesamt	93 (100,0)	144 (100,0)	237 (100,0)

### **Kolonisation des Darmtrakts mit Bacteroides fragilis**

Auch für die Darmkolonisation mit Bacteroides fragilis zeigt sich ein Trend zu niedrigerer AD-Prävalenz bei Nachweis der Kolonisation von 24% im Vergleich zu 30%. Die Odds ratio beträgt 0,52 (p=0,077).

**Tabelle 32: Häufigkeitsverteilung zwischen den Kategorien von AD und der Kolonisation mit Bacteroides fragilis zu V7**

n (%)	Kolonisation mit Bacteroides fragilis		Gesamt
	Kolonisiert	Nicht kolonisiert	
AD	41 (24,4)	21 (30,4)	62 (26,2)
Gesund	127 (75,6)	48 (69,6)	175 (73,8)
Gesamt	168 (100,0)	69 (100,0)	237 (100,0)

In der Regressionsanalyse zeigt sich zusammenfassend, dass Rauchen nach der Schwangerschaft mit einer niedrigeren AD-Prävalenz im Alter von 7 Monaten verbunden ist, im Lebensalter von 2 Jahren findet sich dieser Zusammenhang nicht mehr. Ein erhöhter Eosinophilen-Score von über 5% mit 5 Wochen bedeutet eine höhere AD-Prävalenz, ein normwertiger Eosinophilen-Score kann als protektiver Parameter auf die atopische Dermatitis gewertet werden.

Als Einflussfaktoren unter den Zytokinen auf die atopische Dermatitis im Alter von 7 Monaten werden IL-4 und IL-10 identifiziert. Dabei haben eine Titerabnahme von IL-4 sowie eine

Titerzunahme von IL-10 einen protektiven Effekt. Für das Alter von 2 Jahren gilt dies auch weiterhin für IL-4, zudem zeigt eine Titerzunahme von TNF- $\alpha$  einen Zusammenhang mit höherer AD-Prävalenz. Im Alter von 2 Jahren zeigt sich ein protektiver Effekt für die Kolonisation des Darmes mit *Bacteroides fragilis*.

Residuelles Confounding durch die nicht gemessenen Parameter ist jedoch nicht auszuschließen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Studiendesign

Die Studie wird als placebo-kontrollierte, doppelblinde Studie mit Säuglingen mit familiär erhöhtem Atopierisiko durchgeführt. Es handelt sich um eine randomisierte Interventionsstudie, die Zuordnung zu den Interventionsgruppen erfolgte zufällig über eine Blockrandomisierung in Blocks zu 10 auf der Basis von Zufallszahlen durch eine unabhängige Organisation. Der Randomplan enthielt die Zuordnung von „Kind ID“ zu entweder Verum oder Placebo, die Zuweisung zur nächsten freien Teilnehmerlaufzahl, der Kindlaufzahl „Kind ID“, erfolgte nur nach der zeitlichen Abfolge des Eintreffens vor den Prüfern bei der Eingangsuntersuchung. Alle weiteren Parameter wurden bei der Randomisierung nicht berücksichtigt und traten somit rein zufällig auf. Die Kontrolle per Placebo verbunden mit der doppelten Verblindung der Studie minimiert seitens der Probanden bzw. deren Eltern und der Prüfärzte sowohl bewusste als auch unbewusste Einflüsse auf das Studienergebnis. Ab dem Zeitpunkt der Entblindung und Bereitstellung des Gesamtdatensatzes ist allen Beteiligten an der Studie inkl. der Autorin dieser Arbeit die Zuordnung der Probanden zur Prüfmedikation bekannt. Änderungen an den erhobenen Daten erfolgten nicht mehr.

Die Studie wurde monozentrisch durchgeführt, das heißt alle Studienvisiten fanden in dem Studienzentrum in Berlin statt. Die meisten Probanden stammten aus dem Großraum Berlin. Diese beiden Aspekte sollten bei der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden. Eine multizentrische Studie und die Einbeziehung von Probanden aus verschiedenen Lebensräumen würden zu einer Verbesserung der Allgemeingültigkeit der Resultate auf Populationen mit einem hohen Atopierisiko führen, aber auch einen deutlich höheren Aufwand bedeuten. Die Verallgemeinerungsfähigkeit einer randomisierten kontrollierten Studie wird immer auch durch die strikt definierten Ein- und Ausschlusskriterien vermindert. Hier wurden nur bei Geburt gesunde Kinder eingeschlossen. Die Klassifikation der familiären Atopieheredität erfolgte anhand validierter Fragen der MAS- und GINI-Studie [76], [77].

Der Stichprobenumfang der randomisiert kontrollierten Studie von 606 Neugeborenen wurde für eine Hochrisiko-Population mit einer erwarteten Erkrankungsprävalenz von ca. 20% im Vergleich zur Normalbevölkerung berechnet (Lebenszeitprävalenz 13%, 8,7% für die Altersgruppe 0 – 2 Jahre, 13,3% für 3 – 6 Jahre [78]); der angenommene  $\beta$ -Fehler betrug 20%. Damit beruht diese

Studie, aber auch die Subgruppenanalyse der 499 Probanden mit Zytokinmessungen auf einer im Vergleich mit ähnlichen Studien großen Fallzahl (vgl. [79], [80], [81]).

In der Literatur wird die Auswertung einer Subgruppe innerhalb einer größeren Studie kontrovers diskutiert [82]. Einer der Hauptkritikpunkte ist die geringere Teststärke aufgrund des geringeren Stichprobenumfangs, zumal sich die Fallzahlberechnung nur auf die primäre Fragestellung bezieht. Damit sinkt die Wahrscheinlichkeit, einen tatsächlich bestehenden Unterschied aufzudecken. Andererseits steigt mit der zunehmenden Zahl von Subgruppenanalysen auch die Wahrscheinlichkeit für ein zufälliges falschpositives Ergebnis [83]. Der Forderung nach bereits im Studienprotokoll festgelegten Subgruppenanalysen wurde in dieser Studie Rechnung getragen. Zudem wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass zwischen der Basalcharakteristik der Gesamtpopulation und der Gruppe mit Zytokinbestimmungen keine statistisch signifikanten Unterschiede nachzuweisen sind. Einzig für weiterführende Analysen, z.B. die Untersuchung des Einflusses der Zytokine auf die atopische Dermatitis in Abhängigkeit von den Hereditäts-Subgruppen, reicht die Fallzahl in der AD-Gruppe nicht mehr für valide Aussagen.

In dieser Präventionsstudie wurde ein Bakterienlysat aus *Enterococcus faecalis* und *Escherichia coli* verwendet. Die klinische Verwendung von Bakterienlysaten ist bisher hauptsächlich in Studien zur Prophylaxe von Infektionen des Respirationstraktes mit OM-85, einem Extrakt aus acht verschiedenen Bakterienstämmen, untersucht worden [84], [85]. Dabei senkt die Behandlung mit OM-85 (Broncho-Vaxom) signifikant und konsistent die Häufigkeit von Episoden bei chronisch-rezidivierenden Atemwegsinfektionen. Der Effekt scheint zudem in Risikopopulationen stärker ausgeprägt [84]. Das hier verwendete Lysat wird mit nachgewiesener Wirkung zur Regulierung körpereigener Abwehrkräfte, bei gastrointestinalen Störungen sowie Colon irritabile angewendet. Bei erwachsenen Patienten mit Reizdarmsyndrom führte eine achtwöchige Therapie mit Pro-Symbioflor<sup>®</sup> zu einer Symptomreduktion [65]. Ein Einfluss von Pro-Symbioflor<sup>®</sup> auf die allergische Sensibilisierung und das Zytokinprofil wurde bisher nur im Tierversuch nachgewiesen [63].

Andere Studien zur Prävention atopischer Erkrankungen mit Probiotika verwenden in der Mehrzahl Laktobazillen und/oder Bifidobakterien [81]. Für Laktobazillen wurde eine Senkung der AD-Prävalenz erstmals 2001 an einer finnischen Hochrisiko-Population nachgewiesen [86]. Auch der aktuelle Vergleich verschiedener Studien mit Laktobazillen kommt zu dem Schluss, dass deren Einsatz zur Prävention der AD und zur Reduktion des Schweregrades geeignet ist, auch wenn zusätzliche Interventionsstudien, die eine breite Anwendung empfehlen und rechtfertigen, noch

ausstehen [87]. Ein vielversprechender Ansatz könnte auch der Einsatz von Probiotika bei Subpopulationen wie beispielsweise bei Kindern, die durch Sectio entbunden werden, sein [88].

Einige Studien nutzen auch apathogene *E. coli*-Stämme [89]. So senkt die Applikation von *E. coli* O83 innerhalb der ersten 4 Lebenswochen die Allergie-Prävalenz bei Risiko-Kindern, ein Einfluss auf das Zytokinprofil im Lebensalter von 3 Monaten konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

Die Pro-Symbioflor<sup>®</sup>-Dosis von 3 x täglich 0,7 ml (10 Tropfen) entspricht der empfohlenen Dosis des Herstellers für Kinder. Eine Gabe von 2,5 bis 5,0 ng LPS pro kg Körpergewicht hat sich bezüglich der allergischen Sensibilisierung gegen Ovalbumin, der allergenspezifischen Produktion von IgE und IgG und der IL-10-Produktion in Tierexperimenten als wirksam erwiesen [63]. Pro-Symbioflor<sup>®</sup> enthält 0,48 ng LPS/ml, daraus errechnet sich eine tägliche Dosis von 1,01 ng LPS. Bezogen auf das durchschnittliche Körpergewicht der Probanden von 4.509 g zu V2 bzw. 7.928 g zu V5 entspricht dies einer Gabe von 0,22 ng bzw. 0,13 ng LPS pro kg Körpergewicht und liegt damit deutlich niedriger als die Dosis in tierexperimentellen Studien. Dies könnte ein Grund für den geringen Einfluss der Intervention auf die Prävalenz der atopischen Dermatitis sein. Es gibt allerdings auch Anhaltspunkte dafür, dass die immunmodulatorische Wirkung des Bakterienlysats als Ganzes auch von anderen Komponenten als LPS und dosisunabhängig vermittelt wird. Es konnte nachgewiesen werden, dass auch starke Verdünnungen des Lysats sowohl inhibitorische als auch stimulatorische Effekte auf das Immunsystem haben [90]. Möglicherweise hätten aber auch eine höhere Dosierung und/oder eine längere Anwendungsdauer (z.B. 11 Monate bis Vollendung des 1. Lebensjahres) einen stärkeren interventionellen Effekt gezeigt.

Die Behandlungsdauer von 6 Monaten wurde dem Zeitraum mit der höchsten Inzidenz von atopischer Dermatitis im ersten Lebenshalbjahr angepasst [91]. Eine Erweiterung der Intervention auf die Pränatalzeit wäre ein weiterer vielversprechender Aspekt. Eine japanische Arbeitsgruppe konnte die Prävalenz der atopischen Dermatitis bei Kleinkindern im Alter von 18 Monaten durch die Gabe von Bifidobakterien an die Mutter pränatal ab der 36. SSW und postnatal an das Kind bis zum Ende des 6. Lebensmonats senken [92]. Eine aktuelle Metaanalyse verschiedener Studien mit Probiotika-Einsatz (Laktobazillen und/oder Bifidobakterien) kommt zu dem Schluss, dass eine Reduktion der AD-Prävalenz nur unter prä- und postnataler Applikation im Vergleich zu ausschließlicher postnataler Gabe zu erwarten ist – sowohl für die allgemeine als auch die Hoch-Risiko-Population [93].

## 5.2 Methodik zur Bestimmung der Zytokine

Die Zytokinkonzentrationen werden in dieser Arbeit unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Alternative Methoden wären die Messung per klassischem ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) oder die Quantifizierung der entsprechenden mRNA-Transkripte. Der Vorteil des verwendeten *Cytometric Bead Array* besteht in der gleichzeitigen Detektion von 6 Zytokinen aus einer Probe von nur 50 µl, was sich als einfach, zeit- und kostensparend erweist [94]. Mit einem klassischen ELISA kann jeweils nur ein Zytokin aus einer Probe gemessen werden, d.h. für die Messung mehrerer Parameter wird entsprechend ein größeres Probenvolumen benötigt. Die Bestimmung der mRNA ist eine sensitivere Methode, die auch die Messung sehr niedriger Titer erlaubt (insb. IL-5 und IFN- $\gamma$ ) und auch in unstimulierten Zellen funktioniert, allerdings mit höheren Kosten verbunden ist und daher hier nicht umsetzbar war [95]. Die gleichzeitige Messung verschiedener Zytokine erfordert jedoch Kompromisse bezüglich des Detektionsniveaus und der Bestimmungsgrenzen.

Viele Zytokine sind im peripheren Blut gesunder Probanden nicht nachweisbar. Aus diesem Grund werden die Blutproben einer zellulären Stimulation unterzogen. In dieser Arbeit wurden die Stimulanzen LPS, Der p1 und OVA verwendet. LPS ist ein Bestandteil der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien und simuliert so den Kontakt mit LPS, das ubiquitär in organischen Stäuben sowie in Pro-Symbioflor® vorhanden ist. OVA und Der p1 sind zwei der Vertreter für häufige Allergieauslöser im Kindesalter und simulieren den Kontakt mit Umwelt- (Der p1) und Nahrungsmittelallergenen (OVA).

Von der Art des Stimulanz hängt auch die Höhe der Zytokintiter ab, was bei der Interpretation der Ergebnisse und insbesondere beim Vergleich verschiedener Studien zu beachten ist. Konzentrationen nach Der p1- und OVA-Stimulation sind um ein Vielfaches geringer als nach LPS-Stimulation. Neben dem jungen Alter der Probanden und der damit zeitlich teilweise noch nicht stattgefundenen Sensibilisierung gegen Hühnerei und Hausstaubmilbe spielt möglicherweise auch eine Kontamination der Stimulanzen mit LPS eine Rolle. Die (unbeabsichtigte) Co-Administration von LPS bei der Stimulation mit kommerziellen, häufig LPS-kontaminierten Allergenen kann eine Toleranz und damit eine geringere Reaktion auf das Allergen induzieren [96].

Des Weiteren lassen sich Zytokine unterschiedlich stark stimulieren. IL-1 beta, TNF-alpha und IL-6 werden im Gegensatz zu IL-2, IFN- $\gamma$  und GM-CSF sehr gut durch LPS stimuliert [97]. Dies

erklärt die niedrigen IL-2 Titer nahe der Bestimmungsgrenze. Zusätzlich ergeben sich auch unterschiedliche Zytokinkonzentrationen in Abhängigkeit von der Dauer der Stimulation [98]. Nach 24 Stunden ist jedoch für alle Zytokine von einer ausreichenden Synthese auszugehen. Die optimalen Zeitpunkte liegen z. B. für IFN- $\gamma$  und IL-5 eher bei 48 Stunden, während für IL-4 nach 24 Stunden ein Maximum erreicht wird [99].

Eine weitere Rolle spielt auch die Konzentration des verwendeten Stimulanz. In Tiermodellen wird nachgewiesen, dass eine hohe LPS-Dosis zu einer Th1-Antwort führt, während eine niedrige LPS-Konzentration eine antigen-induzierte Th2-Reaktion unterstützt [100]. Die hier verwendete Konzentration von 25  $\mu\text{g/ml}$  LPS unterscheidet sich beispielsweise im Vergleich mit anderen Arbeiten, die 100 ng/ml (entspricht 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) verwenden [101].

Die Höhe der Zytokinkonzentration differiert in Abhängigkeit vom Geschlecht [102] und zeigt sowohl circadiane [103], [104], [105] als auch saisonale Unterschiede [106]. Zwischen Kindern und Erwachsenen finden sich ebenfalls Konzentrationsunterschiede, so haben Kinder mit atopischer Dermatitis signifikant höhere Titer an IL-6, IFN- $\gamma$  und IL-10 [107].

Daraus ergibt sich eine hohe intra- und interindividuelle Variabilität der Zytokintiter, was wiederum auch die fehlenden Normwerte für viele Zytokine erklärt [5].

Die in dieser Studie erhobenen Zytokine werden unter dem Gesichtspunkt der Th1/Th2-Dichotomie ausgewählt und sind Marker für Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2), Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) und Treg (IL-10).

Die Bestimmung der Titer nach Stimulation erfolgt aus Vollblut, nach Zentrifugation wird das Serum abgenommen und durch Medium gleicher Menge ersetzt. Die entstehende Zellsuspension ist Ausgangsmaterial für die Stimulation. Mit der unbekanntem Anzahl zytokinproduzierender Zellen variieren auch die Zytokinkonzentrationen [5]. Die mögliche Alternative der Stimulation von isolierten PBMC's (peripheral blood mononuclear cells) erfordert eine deutlich höhere Menge an Vollblut, ist zudem zeit- und kostenintensiver und damit für größere Studien mit Säuglingen ungeeignet und birgt zudem den Nachteil höherer Apoptoseraten. Individuelle Schwankungen fallen nach Stimulation in Vollblut geringer aus als in PBMC's [97].

### 5.3 Zytokine und atopische Dermatitis

Eine Vielzahl von klinischen Studien untersucht die Zytokinprofile atopischer Probanden. Die in dieser Arbeit untersuchten Zytokintiter zeigen eine hohe intra- und interindividuelle Variabilität und unterliegen einer circadianen Fluktuation. Die Verteilung der absoluten Titer der Zytokine unterscheidet sich kaum in den Erkrankungsgruppen. Die Titer von IL-2 bewegen sich zu allen Visits nahe der unteren Bestimmungsgrenze. Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede werden im Folgenden für die einzelnen Zytokine diskutiert.

#### IFN- $\gamma$

Als Th1-Zytokin wird IFN- $\gamma$  nicht nur als Initiator der Entzündung angesehen, sondern auch als starkes Stimulans für die Fibrose [108]. Kinder mit atopischer Dermatitis haben verglichen mit gesunden Kindern bereits in unstimulierten Proben von PBMCs niedrigere IFN- $\gamma$ -Titer [109]. Auch zeigen Neugeborene mit geringerer Anzahl IFN- $\gamma$  produzierender CD4<sup>+</sup>-T-Zellen im Nabelschnurblut in den ersten beiden Lebensjahren eine höhere AD-Prävalenz [110]. Eine andere Studie weist auf den Zusammenhang zwischen Schweregrad der Atopie, gemessen anhand des IgE, und den Zytokinprofilen hin. Hoch atopische Kinder (IgE > 600 U/ml) zeigen im Vergleich mit Kontrollen signifikant erhöhte IL-4- und erniedrigte IFN- $\gamma$ -Konzentrationen auf, während für Kinder mit milder Atopie (IgE < 600 U/ml) kein Unterschied mehr zwischen den Erkrankungsgruppen nachzuweisen ist [111]. Dieselbe Forschungsgruppe beschreibt für Kinder mit AD auch eine verminderte IFN- $\gamma$ -Sekretion trotz vermehrter IFN $\gamma$ -mRNA-Expression und diskutiert in diesem Zusammenhang einen posttranskriptionellen Defekt [112].

PBMCs erwachsener AD-Patienten zeigen dagegen in unstimulierten Proben eine höhere IFN- $\gamma$ -Produktion als gesunde Probanden, nach LPS-Stimulation steigen die Titer in beiden Gruppen signifikant an, unterscheiden sich aber nicht mehr zwischen den Erkrankungsgruppen [101].

Für die nachgewiesenen Titerunterschiede nach OVA-Stimulation sind weiterführende Analysen, auch unter Einbeziehung von Daten zur allergischen Sensibilisierung gegen Nahrungsmittelallergene anzustreben, da andere Untersuchungen für Kinder mit AD erhöhte IFN- $\gamma$ -Titer nach OVA-Stimulation zeigen [109].

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

TNF- $\alpha$  als weiterer Vertreter der Th1-Zytokine zeigt ausgehend von der Theorie der Th1/Th2-Dysbalance in einigen Studien eine inverse Korrelation mit atopischer Dermatitis. Kinder mit atopischer Dermatitis haben verglichen mit gesunden Kindern bereits in unstimulierten Proben neben geringer IL-10- und IFN- $\gamma$ -Produktion auch niedrigere TNF- $\alpha$ -Titer [109]. In derselben Studie fallen die TNF- $\alpha$ -Konzentration unter OVA niedriger und unter HSM ähnlich hoch aus im Vergleich zur Kontrollgruppe.

PBMCs erwachsener AD-Patienten zeigen analog zu IFN- $\gamma$  in unstimulierten Proben und unter LPS eine höhere TNF- $\alpha$ -Produktion als gesunde Probanden, nach LPS-Stimulation steigen die Titer in beiden Gruppen um ein Vielfaches signifikant an, wobei die AD-Patienten für TNF- $\alpha$  weiterhin höhere Titer als die Kontrollgruppe haben [101].

## **IL-2**

Interleukin-2 ist ein weiterer Vertreter der Th1-Zytokine und gilt als ein potenter immunmodulatorischer Mediator, dessen wichtigste Eigenschaft in der rezeptorvermittelten Aktivierung von T-Helfer Zellen, zytotoxischen T-Zellen, B-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen und Makrophagen liegt [113].

Es ist jedoch schwierig, nachweisbare Konzentration von IL-2 zu detektieren [114]. Eine Stimulation von Vollblut mit Mitogen kann zu erhöhten Titern führen, jedoch nicht die Verwendung von Allergenen wie OVA oder Der p1 [99]. In einer Studie, die Zytokintiter aus unstimulierten Proben atopischer Probanden untersucht, zeigen sowohl Kinder (0 – 2 Jahre) als auch Erwachsene sehr geringe Konzentrationen von IL-2. Der Vergleich atopischer Erwachsenen mit einer gesunden Kontrollgruppe erbrachte keinen Unterschied [107]. Die dort gemessenen Titer liegen im Mittel alle unter der in dieser Arbeit verwendeten Nachweisgrenze.

## **IL-10**

IL-10 ist ein anti-entzündliches Zytokin, das hauptsächlich von regulatorischen T-Zellen gebildet wird. Es unterdrückt das Immunsystem während der Entzündung, um den Gewebeschaden zu minimieren [115]. Allerdings ist die Studienlage nicht eindeutig. Titer von IL-10 korrelieren invers mit dem Schweregrad [116] und eine geringere Anzahl IL-10-produzierender CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wird für Probanden mit schwerer AD verglichen mit milder AD und gesunden Kontrollen beschrieben [117]. Dagegen zeigen Untersuchungen an PBMCs sowohl unstimuliert als auch nach LPS-Stimulation erhöhte Konzentrationen von IL-10 bei Probanden mit atopischer Dermatitis im

Vergleich zur Kontrollgruppe. Innerhalb der AD-Gruppe sind die Titer unter LPS um ein Vielfaches höher als unstimulierte Proben [101]. Die Unterschiede könnten jedoch zumindest teilweise auf unterschiedlichen Bestimmungsmethoden und verschiedene klinische Bedingungen zurückzuführen sein [31]. Einen Einfluss haben auch Polymorphismen des IL-10-Gens, die bereits als genetische Marker für eine AD im Kindesalter diskutiert werden [118].

#### **IL-4**

IL-4 gilt neben IL-5 und IL-13 als Hauptvertreter der Th2-Zytokine. Das Übergewicht von Th2-Zellen und die konsekutive Überexpression von IL-4 und IL-13 im peripheren Blut werden als wichtiger Faktor in der Pathogenese der AD angesehen. Eine Erhöhung von IL-4 korreliert eng mit atopischer Dermatitis und Eosinophilie [16]. Die Analyse von PBMCs atopischer Probanden zeigt konsistent eine Assoziation von hoher Konzentration von IL-4 mit AD [119], [120], [111]. Nach LPS-Stimulation wird jedoch eine verringerte IL-4-Sekretion im Vergleich zu unstimulierten Proben erwachsener atopischer Probanden nachgewiesen, die sich dann auch nicht mehr von den Titern der Kontrollgruppe unterscheidet, was als Interventionseffekt von LPS (Endotoxin) interpretiert wird [101]. Eine tschechische Arbeitsgruppe zeigt für Säuglinge atopischer Mütter im Alter von 3 Tagen als auch 3 Lebensmonaten signifikant erhöhte IL-4-Titer im Vergleich zu Säuglingen gesunder Mütter; für die Intervention mit *E. coli* ist allerdings kein Einfluss auf das Zytokinprofil nachweisbar [89].

#### **IL-5**

IL-5 als weiterer Vertreter der Th2-Zytokine zeigt ausgehend von der Theorie der Th1/Th2-Dysbalance in einigen Studien eine positive Korrelation mit atopischer Dermatitis. Es ist neben der Differenzierung von Eosinophilen auch für deren verlängerte Überlebenszeit durch die Aktivierung des IL-5-Rezeptors (IL-5R) verantwortlich. Eine erhöhte Konzentration ist demnach vor allem mit extrinsischer AD verbunden [121]. Nach mitogener Stimulation von PBMCs mit ConcanavalinA haben Kinder mit atopischer Dermatitis im Alter von drei und zwölf Monaten erhöhte Konzentrationen von IL-5 [122]. Für erwachsene AD-Patienten werden ebenfalls erhöhte, wenn auch im Vergleich mit IL-4 niedrigere Titer in unstimulierten Proben nachgewiesen. Nach 24 Stunden Inkubation mit LPS zeigt sich eine geringere IL-5-Konzentration, die aber noch signifikant höher ist als die Titer der Kontrollgruppe [101]. Andere Arbeiten können dagegen keine Unterschiede für IL-5 zwischen AD-Probanden und gesunden Kontrollen zeigen [109].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich trotz der Vielzahl der vorhandenen Studien ebenso wie in der vorliegenden Arbeit kein einheitliches und konsistentes Bild der absoluten Titer und ihrer zeitlichen Verläufe darstellen lässt. Abgesehen von methodischen Fragen spielt dabei sicher auch die Vielzahl der möglichen Einflussfaktoren auf die Zytokine als Botenstoffe des Immunsystems eine große Rolle.

#### **5.4 Unterschiede in der Varianz – geringere Plastizität des Immunsystems durch genetische Polymorphismen?**

Für IL-4 zeigt sich, dass sich die Varianzen der Titer und damit auch der Titerdifferenzen in der AD-Gruppe im Vergleich zu gesunden Kindern sowohl im Alter von 7 Monaten als auch 2 Jahren unterscheiden. Die kranken Kinder zeigen konsistent für alle Stimulantien eine geringere Varianz als die Kontrollgruppe.

Generell ist bei gesunden Probanden eine hohe Varianz der Konzentrationen zu erwarten und wird in vielen anderen Studien ebenfalls gefunden [123], [124], [125]. Auch existieren bereits Fallbeschreibungen für Varianzunterschiede zwischen Erkrankungsgruppen. Für erwachsene Patienten mit Herzinsuffizienz beispielsweise wird eine Zunahme der Varianz von TNF- $\alpha$  und IL-6 im Vergleich mit gesunden Kontrollen beschrieben [126].

Ein möglicher Erklärungsansatz für die Varianz- und auch Titerunterschiede – abgesehen von der Bestimmungsmethode [127] - liegt in SNPs (single nucleotide polymorphism – Einzelnukleotid-Polymorphismen). Dies sind Variationen einzelner Basenpaare in einem DNA-Strang, die beispielsweise auch für eine unterschiedliche Affinität von Liganden an spezifischen Rezeptoren, so auch für Hormonrezeptoren an der Oberfläche von Immunzellen, verantwortlich gemacht werden. So zeigen gesunde Probanden mit verschiedenen SNPs von Glucocorticoid- und  $\beta_2$ -Adrenalinrezeptoren auf Leukozyten unterschiedliche Werte für Th1, Th2, Tregs, Tr1 Zellen sowie Th1/Th2 ratio [125]. Ein Stresstest führt bei ebenfalls gesunden Kontrollen zu erhöhten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen mit konsekutiver Hochregulation des dazugehörigen Rezeptors (IFN- $\gamma$ R, bestimmt per mRNA) und erniedrigten IL-10-Werten, während der IL-4-Rezeptor IL-4R in dieser Studie keine Unterschiede zeigt [128]. Andere Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass sowohl Polymorphismen des IFN- $\gamma$ -Rezeptors als auch des IL4-Rezeptors einen Einfluss auf Immunregulationsprofile haben. Für den Polymorphismus Q576R des IL4R zeigt der homozygote SNP (Arg/Arg) einen signifikant niedrigere Th1/Th2 ratio als der Wildtyp (Gln/Gln) [129].

Eine Untersuchung an Probanden mit atopischer Dermatitis zeigt eine Korrelation eines homozygoten Genotyps des IL-1-Rezeptors mit der Erkrankung verglichen mit gesunden Kontrollen [130]. An einer Beteiligung von SNPs des IL-4-Rezeptors und IL-13 an einer genetischen Empfänglichkeit für eine atopische Dermatitis besteht aufgrund konsistenter Studienergebnisse kaum noch Zweifel. Kandidatengene für Polymorphismen sind neben den beschriebenen für IL-4 und IFN- $\gamma$  auch für IL-5, IL-10 und TNF- $\alpha$  bekannt [131]. Eine koreanische Studie zeigt beispielsweise einen Zusammenhang von SNPs für IL-5 mit atopischer Dermatitis und erhöhtem Serum-IL-5 bei den erkrankten Probanden [121]. Für verschiedene Polymorphismen gleichen Ziels werden sowohl protektive als auch für AD disponierende SNPs beschrieben [132]. Eine Studie an einer chinesischen AD-Population konnte bereits nachgewiesene Polymorphismen von einer Vielzahl von Zytokinen nicht replizieren, möglicherweise haben chinesische Probanden aber aufgrund der unterschiedlichen Ethnizität und damit verbundenen genetischen Unterschieden auch andere zugrundeliegende SNPs für eine atopische Dermatitis [133].

Um eine Assoziation zwischen bekannten Polymorphismen im Zusammenhang mit atopischer Dermatitis und der vorliegenden Studienpopulation nachzuweisen, sind entsprechende weiterführende Analysen notwendig und wären aufgrund der Besonderheit dieser Hochrisiko-Population vielversprechend.

## **5.5 Zytokine und die Intervention mit Bakterienlysate**

Analog zu den bisherigen Ergebnissen der PAPS-Studie findet sich in der Analyse der Zytokindaten kein Zusammenhang mit der Intervention durch das Bakterienlysate Pro-Symbioflor®. Auch in der Subgruppe der Probanden mit einfacher Heredität kann keine Assoziation zwischen Zytokintitern und Interventionsgruppen nachgewiesen werden. Allerdings finden sich auch hier die schon bei den Erkrankungsgruppen beschriebenen Unterschiede in den Varianzen von IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-5.

Die orale Applikation des verwendeten Bakterienlysates führt im Tiermodell zu erhöhter Produktion von IL-10, geringerer allergischer Sensibilisierung (reduzierte spezifische IgE- und IgG-Titer) und verringerter intestinaler Permeabilität [63]. Das Bakterienlysate zeigt in vitro eine mit LPS vergleichbare Wirkung auf das Genexpressionsprofil immunologischer Parameter, enthält neben LPS auch Muramyldipeptide, Lipoteichoic acid und bakterielle DNA, die jeder für sich bereits das Immunsystem beeinflussen können [64]. In der untersuchten Population kann der Einfluss des

Präparats auf die Zytokinexpression nicht nachgewiesen werden; andere Untersuchungen am Menschen existieren bisher nicht.

## **5.6 Atopische Dermatitis und Rauchverhalten der Mutter**

Bereits in der Sensitivitätsanalyse zwischen den Erkrankungsgruppen finden sich Unterschiede im Rauchverhalten der Mütter kranker und gesunder Kinder. Der Anteil der Nichtraucherinnen unter den Müttern ist in der AD-Gruppe höher und auch bei den Raucherinnen ist der Anteil der Mütter mit später kranken Kindern sowohl vor, in als auch nach der Schwangerschaft deutlich niedriger. Dennoch zeigt die Regressionsanalyse eine positive Assoziation von atopischer Dermatitis im Alter von 7 Monaten mit Rauchen nach der Schwangerschaft (OR 0,43; CI 0,19 - 0,95). Im Alter von 2 Jahren ist dies deutlich schwächer ausgeprägt und nicht mehr signifikant (OR 0,53; CI 0,24 – 1,15). Demnach hat Rauchen nach der Geburt einen protektiven Effekt auf die Entwicklung einer atopischen Dermatitis.

Die meisten Studien zeigen zwar einen deutlichen Effekt von Passivrauchen auf ein Asthma bronchiale, aber nur wenige einen Einfluss auf die Entwicklung einer atopischen Dermatitis [39]. Einige weisen keine Assoziation nach [134], [135]. Allerdings kann für Jugendliche sogar ein dosisabhängiger Einfluss von Rauchen auf eine AD erwiesen werden, für Passivrauchen jedoch nicht [40]. In einer dänischen Zwillingsstudie [136] findet sich auch eine schützende Assoziation von Rauchen während der Schwangerschaft und AD (OR 0,8; CI 0,67 – 0,97). In einer prospektiven Studie mit Kindern bis zum Alter von 6 Jahren wird ein Zusammenhang von Rauchen und Zytokintitern gefunden. Kinder von Nichtraucherinnen haben höhere Titer von IL-4 und IFN- $\gamma$  im Nabelschnurblut als Kinder rauchender Mütter. Interessanterweise sind auch die Titer bei den Kindern noch erhöht, deren Mütter in der Schwangerschaft mit dem Rauchen aufgehört hatten [4].

Mögliche Erklärungen und Zusammenhänge können im Bereich der Epigenetik [137] gefunden werden: MicroRNAs (miRNAs) sind empfindlich für Umwelteinflüsse, z.B. Zigarettenrauch, und beeinflussen die Immunregulation i. S. einer Differenzierung von regulatorischen T-Zellen. Es kann gezeigt werden, dass Rauchen (und damit verbundene erhöhte Konzentration des Nikotin-Abbauprodukts Cotinin im Urin) positiv mit einer Expression von miR-223 sowohl im mütterlichen als auch im Nabelschnurblut verknüpft ist, welches wiederum zu einer geringeren

Anzahl regulatorischer T-Zellen in beiden führt. Kinder mit niedrigerer Anzahl von Tregs haben ein höheres Risiko für atopische Dermatitis in den ersten drei Lebensjahren [138].

Neben veränderter miRNA-Expression [139] führt Tabakrauch auch zu anderen epigenetischen Phänomenen wie DNA-Methylierung [140], [141], [142] und Histon-Modifikation [143], welche einen nachhaltigen Einfluss auf die Epithelzellendifferenzierung, die Immunzellendifferenzierung oder beide [144] haben. So haben beispielsweise Kinder rauchender Eltern im Alter von einem Jahr höhere Konzentrationen von IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  [122].

## **5.7 Atopische Dermatitis und Geburtsgewicht**

In der Sensitivitätsanalyse zwischen den Erkrankungsgruppen findet sich eine Assoziation von höherem Geburtsgewicht bei Kindern, die mit 7 Monaten eine AD entwickelt haben, im Vergleich zu gesunden Kindern. Gleichwohl wird dies in der Regressionsanalyse nicht bestätigt.

Dieser mögliche Zusammenhang ist bisher nur wenig untersucht, wird aber auch in einer prospektiven Studie in Italien [135] und einer schwedischen Zwillingsstudie [145] nachgewiesen, wobei letztere auch untergewichtige und frühgeborene Säuglinge einbezogen hat. Andere Untersuchungen finden keinen Zusammenhang zwischen Geburtsgewicht und AD-Risiko [146], [147]. Studien mit älteren Kindern über 1 Jahr beschreiben eine Assoziation von atopischer Dermatitis und Übergewicht [148], [149]. Als Erklärung wird eine gestörte Immuntoleranz durch im weißen Fettgewebe aktivierte Adipokine und bioaktive Moleküle angeführt [150]. Zudem ist Übergewicht mit erhöhten Konzentrationen von IL-6, Leptin und TNF- $\alpha$  verbunden, welche wiederum mit erhöhtem AD-Risiko verknüpft werden [151], [152], [153]. Nicht zuletzt ist ein höheres Geburtsgewicht mit später höherem Risiko für Übergewicht assoziiert [154].

## **5.8 Atopische Dermatitis und Darmflora**

Die beiden Erkrankungsgruppen unterscheiden sich schon vor Beginn der Intervention und vor Ausbruch einer atopischen Dermatitis in der Zusammensetzung der Darmflora. Eine Kolonisation mit Clostridium cluster I findet sich in deutlich mehr Probanden der AD-Gruppe, eine Kolonisation mit Bacteroides fragilis scheint einen protektiven Effekt zu haben.

Die Assoziation von Clostridium cluster I und atopischer Dermatitis wird als indirekter Effekt via Geburtsmodus (Sectio führt zu höherer Kolonisation als vaginale Entbindung) und

Geschwisterreihenfolge (1 oder  $\geq 2$  ältere Geschwister ist mit niedrigerer Kolonisation assoziiert) bereits in den bisherigen Ergebnissen der PAPS-Studie beschrieben [68]. Für die Unterschiede in den Analysen sind methodische Unterschiede in der statistischen Analyse und die Wahl der einbezogenen Adjustierungsvariablen (Anwendung von *directed acyclic graphs*) anzunehmen, weshalb dieser Zusammenhang in der Regressionsanalyse nicht mehr nachzuweisen ist. Auch der Effekt von *Bacteroides fragilis* beruht möglicherweise auch auf indirektem Weg auf der Geschwisterreihenfolge. Zwei oder mehr ältere Geschwister sind mit einer signifikant häufigeren Kolonisation mit *Bacteroides* assoziiert.

Die Darmflora als mögliche Quelle von Risikofaktoren für atopische Erkrankungen wird von einer Vielzahl von Autoren untersucht. Eine Studie zeigt eine geringere Diversität der Darmflora in der ersten Lebenswoche von Neugeborenen, die bis zum Alter von 18 Monaten eine atopische Dermatitis entwickeln [155]. Eine weitere Arbeit zeigt für eine Population von Kindern mit atopischer Dermatitis und/oder positivem Haut-Prick-Test im Laufe des ersten Lebensjahres eine Assoziation der Atopie mit erhöhter intestinaler Kolonisation durch Clostridien und *Staphylococcus aureus* sowie geringerer Prävalenz von Enterokokken, Bifidobakterien und *Bacteroides*, verglichen mit gesunden Kindern [156]. Eine norwegische Arbeitsgruppe fand eine transiente Korrelation von AD mit niedrigerer Kolonisation von *E. coli* und *Bacteroides fragilis* bzw. höherer Besiedlung durch *Bifidobacterium longum* [157]. Eine Untersuchung älterer Kinder (4 – 14 Jahre) weist eine Assoziation der AD mit geringerer Prävalenz von *Clostridium cluster IV*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila* und damit verbundenem Anstieg des relativen Übergewichts von Enterobacteriaceae nach [44].

Eine mögliche Erklärung des (patho-)physiologischen Hintergrundes bietet die Interaktion der Darmflora mit Toll-Like-Rezeptoren (TLR), deren Expression sich möglicherweise für gesunde und erkrankte Probanden unterscheidet. TLR sind Mustererkennungsrezeptoren, die von verschiedenen Zellen im Gastrointestinaltrakt, beispielsweise von intestinalen Epithelzellen oder örtlichen Immunzellen in der Lamina propria, exprimiert werden. TLR-Signale spielen eine Rolle in der Erhaltung der intestinalen Homöostase bzw. der Induktion einer entzündlichen Reaktion [158].

## **5.9 Atopische Dermatitis und Eosinophilie**

Bereits im Alter von 5 Wochen haben Kinder, die bis zum 7. Lebensmonat eine atopische Dermatitis entwickeln, einen höheren Eosinophilenanteil an Leukozyten im Blut. In der Regressionsanalyse bestätigt sich dieser Befund – Kinder mit initialem Eosinophilenanteil von mindestens 5% haben sowohl im Alter von 7 Monaten als auch 2 Jahren eine signifikant höhere AD-Prävalenz. Dies bestätigt die in der Literatur beschriebene Assoziation von Eosinophilie und atopischer Dermatitis [159], [160], [161]. Auch die Konzentrationen von IL-4 und IL-13 sind mit einer Eosinophilie bei AD-Patienten verknüpft [16]. Für eine mögliche Verwendung der Eosinophilie als prädiktiven Parameter müssten allerdings weitere Untersuchungen, insbesondere auch an Populationen mit normalem Risiko, durchgeführt werden [162].

## **5.10 Zusammenfassung**

In dieser Arbeit werden das Th2-Zytokin IL-4, IL-10 als Zytokin regulatorischer T-Zellen sowie eine Eosinophilie und die intestinale Flora als Einflussfaktoren auf die Entwicklung einer AD in einer Hoch-Risiko-Population gefunden. Sie stellen demnach mögliche Zielparameter für eine präventive Modulation der adaptiven Immunantwort in den ersten Lebensmonaten dar.

Als zugrundeliegende Mechanismen können genetische Variationen wie SNPs (single nucleotide polymorphisms – Einzelnukleotid-Polymorphismen) und epigenetische Phänomene angenommen werden, die weiterer Untersuchungen bedürfen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Holländer GA, B.M., Keller MP, Krenger W, Piali L, *Das natürliche Immunsystem*, in *Pädiatrische Allergologie und Immunologie*, S.R. Wahn U, Wahn V, Holländer GA, Editor. 2005, Elsevier München. p. 3-38 (985 S.).
2. Janeway CA, T.P., Walport M, Shlomchik M, *Immunologie*. Vol. 5. Auflage. 2002: Spektrum Akademischer Verlag. 800.
3. Jones, C.A., J.A. Holloway, J.O. Warner, *Fetal immune responsiveness and routes of allergic sensitization*. *Pediatr Allergy Immunol*, 2002. **13 Suppl 15**: p. 19-22.
4. Macaubas, C., N.H. de Klerk, B.J. Holt, C. Wee, G. Kendall, M. Firth, P.D. Sly, P.G. Holt, *Association between antenatal cytokine production and the development of atopy and asthma at age 6 years*. *Lancet*, 2003. **362**(9391): p. 1192-7.
5. Yaqoob, P., E.A. Newsholme, P.C. Calder, *Comparison of cytokine production in cultures of whole human blood and purified mononuclear cells*. *Cytokine*, 1999. **11**(8): p. 600-5.
6. Coyle, A.J., J.C. Gutierrez-Ramos, *The role of ICOS and other costimulatory molecules in allergy and asthma*. *Springer Semin Immunopathol*, 2004. **25**(3-4): p. 349-59.
7. Mosmann, T.R., H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin, R.L. Coffman, *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. *J Immunol*, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
8. Renz, H., U. Herz, *The bidirectional capacity of bacterial antigens to modulate allergy and asthma*. *Eur Respir J*, 2002. **19**(1): p. 158-71.
9. Maggi, E., P. Parronchi, R. Manetti, C. Simonelli, M.P. Piccinni, F.S. Ruggi, M. De Carli, M. Ricci, S. Romagnani, *Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones*. *J Immunol*, 1992. **148**(7): p. 2142-7.
10. Romagnani, S., *Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance*. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. **113**(3): p. 395-400.
11. Hamelmann, E., Wahn, U., Wahn, V., *Immunmodulation in der Allergie- und Asthmatherapie* Vol. 1. Auflage. 2006: UNI-MED. 88.
12. Umetsu, D.T., R.H. DeKruyff, *The regulation of allergy and asthma*. *Immunol Rev*, 2006. **212**: p. 238-55.
13. Yamanaka, K., H. Mizutani, *The role of cytokines/chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis*. *Curr Probl Dermatol*, 2011. **41**: p. 80-92.
14. Eyerich, K., N. Novak, *Immunology of atopic eczema: overcoming the Th1/Th2 paradigm*. *Allergy*, 2013. **68**(8): p. 974-82.
15. Prescott, S.L., C. Macaubas, B.J. Holt, T.B. Smallacombe, R. Loh, P.D. Sly, P.G. Holt, *Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile*. *J Immunol*, 1998. **160**(10): p. 4730-7.
16. Kaminishi, K., Y. Soma, Y. Kawa, M. Mizoguchi, *Flow cytometric analysis of IL-4, IL-13 and IFN-gamma expression in peripheral blood mononuclear cells and detection of circulating IL-13 in patients with atopic dermatitis provide evidence for the involvement of type 2 cytokines in the disease*. *J Dermatol Sci*, 2002. **29**(1): p. 19-25.

17. Ramsey, C.D., J.C. Celedon, *The hygiene hypothesis and asthma*. *Curr Opin Pulm Med*, 2005. **11**(1): p. 14-20.
18. Bieber, T., *Atopic dermatitis*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(14): p. 1483-94.
19. Peters, A.S., J. Kellberger, C. Vogelberg, H. Dressel, D. Windstetter, G. Weinmayr, J. Genuneit, D. Nowak, E. von Mutius, K. Radon, *Prediction of the incidence, recurrence, and persistence of atopic dermatitis in adolescence: a prospective cohort study*. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. **126**(3): p. 590-5.e1-3.
20. Bergmann, R.L., K.E. Bergmann, S. Lau-Schadensdorf, W. Luck, A. Dannemann, C.P. Bauer, W. Dorsch, J. Forster, E. Schmidt, J. Schulz, et al., *Atopic diseases in infancy. The German multicenter atopy study (MAS-90)*. *Pediatr Allergy Immunol*, 1994. **5**(6 Suppl): p. 19-25.
21. Wahn U, G.J., *Atopisches Ekzem*, in *Pädiatrische Allergologie und Immunologie*. Urban & Fischer: München. p. 413-19.
22. Hanifin JM, R.G., *Diagnostic features of atopic dermatitis*. . *Acta Derm Venereol Suppl* (Stockh), 1980. **Suppl 72**: p. 44-47.
23. Dermatitis, E.T.F.o.A., *Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis*. *Dermatology*, 1993. **186**(1): p. 23-31.
24. Wuthrich, B., P. Schmid-Grendelmeier, *The atopic eczema/dermatitis syndrome. Epidemiology, natural course, and immunology of the IgE-associated ('extrinsic') and the nonallergic ('intrinsic') AEDS*. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2003. **13**(1): p. 1-5.
25. Steinhoff, M., J. Bienenstock, M. Schmelz, M. Maurer, E. Wei, T. Biro, *Neurophysiological, neuroimmunological, and neuroendocrine basis of pruritus*. *J Invest Dermatol*, 2006. **126**(8): p. 1705-18.
26. Leung, D.Y., T. Bieber, *Atopic dermatitis*. *Lancet*, 2003. **361**(9352): p. 151-60.
27. Gilliet, M., V. Soumelis, N. Watanabe, S. Hanabuchi, S. Antonenko, R. de Waal-Malefyt, Y.J. Liu, *Human dendritic cells activated by TSLP and CD40L induce proallergic cytotoxic T cells*. *J Exp Med*, 2003. **197**(8): p. 1059-63.
28. Homey, B., M. Steinhoff, T. Ruzicka, D.Y. Leung, *Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation*. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **118**(1): p. 178-89.
29. Lou, H., Y. Fu, C. Wang, Y. Wang, L. Zhang, *[Imbalance between Th1 and Th2 cells in cord blood is influenced by maternal allergic rhinitis and associated with atopic dermatitis during the first two years of life]*. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2014. **49**(5): p. 390-4.
30. Ozdemir, C., M. Akdis, C.A. Akdis, *T regulatory cells and their counterparts: masters of immune regulation*. *Clin Exp Allergy*, 2009. **39**(5): p. 626-39.
31. Auriemma, M., G. Vianale, P. Amerio, M. Reale, *Cytokines and T cells in atopic dermatitis*. *Eur Cytokine Netw*, 2013. **24**(1): p. 37-44.
32. Marenholz, I., R. Nickel, F. Ruschendorf, F. Schulz, J. Esparza-Gordillo, T. Kerscher, C. Gruber, S. Lau, M. Worm, T. Keil, M. Kurek, E. Zaluga, U. Wahn, Y.A. Lee, *Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march*. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **118**(4): p. 866-71.

33. Marenholz, I., T. Kerscher, A. Bauerfeind, J. Esparza-Gordillo, R. Nickel, T. Keil, S. Lau, K. Rohde, U. Wahn, Y.A. Lee, *An interaction between filaggrin mutations and early food sensitization improves the prediction of childhood asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(4): p. 911-6.
34. Strachan, D.P., *Hay fever, hygiene, and household size*. Bmj, 1989. **299**(6710): p. 1259-60.
35. Schaub, B., R. Lauener, E. von Mutius, *The many faces of the hygiene hypothesis*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(5): p. 969-77; quiz 978.
36. von Mutius, E., C. Braun-Fahrlander, R. Schierl, J. Riedler, S. Ehlermann, S. Maisch, M. Waser, D. Nowak, *Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(9): p. 1230-4.
37. Wlasiuk, G., D. Vercelli, *The farm effect, or: when, what and how a farming environment protects from asthma and allergic disease*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2012. **12**(5): p. 461-6.
38. Hamelmann, E., U. Wahn, *Immune responses to allergens early in life: when and why do allergies arise?* Clin Exp Allergy, 2002. **32**(12): p. 1679-81.
39. Yi, O., H.J. Kwon, H. Kim, M. Ha, S.J. Hong, Y.C. Hong, J.H. Leem, J. Sakong, C.G. Lee, S.Y. Kim, D. Kang, *Effect of environmental tobacco smoke on atopic dermatitis among children in Korea*. Environ Res, 2012. **113**: p. 40-5.
40. Graif, Y., L. German, A. Ifrah, I. Livne, T. Shohat, *Dose-response association between smoking and atopic eczema: results from a large cross-sectional study in adolescents*. Dermatology, 2013. **226**(3): p. 195-9.
41. Genuneit, J., D.P. Strachan, G. Buchele, J. Weber, G. Loss, B. Sozanska, A. Boznanski, E. Horak, D. Heederik, C. Braun-Fahrlander, E. von Mutius, *The combined effects of family size and farm exposure on childhood hay fever and atopy*. Pediatr Allergy Immunol, 2013. **24**(3): p. 293-8.
42. Baek, J.O., S. Hong, D.K. Son, J.R. Lee, J.Y. Roh, H.J. Kwon, *Analysis of the prevalence of and risk factors for atopic dermatitis using an ISAAC questionnaire in 8,750 Korean children*. Int Arch Allergy Immunol, 2013. **162**(1): p. 79-85.
43. Wahn, U., E. von Mutius, S. Lau, R. Nickel, *The development of atopic phenotypes: genetic and environmental determinants*. Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program, 2007. **59**: p. 1-11; discussion 11-15.
44. Candela, M., S. Rampelli, S. Turroni, M. Severgnini, C. Consolandi, G. De Bellis, R. Masetti, G. Ricci, A. Pession, P. Brigidi, *Unbalance of intestinal microbiota in atopic children*. BMC Microbiol, 2012. **12**: p. 95.
45. van Nimwegen, F.A., J. Penders, E.E. Stobberingh, D.S. Postma, G.H. Koppelman, M. Kerkhof, N.E. Reijmerink, E. Dompeling, P.A. van den Brandt, I. Ferreira, M. Mommers, C. Thijs, *Mode and place of delivery, gastrointestinal microbiota, and their influence on asthma and atopy*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **128**(5): p. 948-55.e1-3.
46. Shao, J., J. Sheng, W. Dong, Y.Z. Li, S.C. Yu, *[Effects of feeding intervention on development of eczema in atopy high-risk infants: an 18-month follow-up study]*. Zhonghua Er Ke Za Zhi, 2006. **44**(9): p. 684-7.
47. Samochocki, Z., J. Bogaczewicz, R. Jeziorkowska, A. Sysa-Jedrzejska, O. Glinska, E. Karczarewicz, D.P. McCauliffe, A. Wozniacka, *Vitamin D effects in atopic dermatitis*. J Am Acad Dermatol, 2013. **69**(2): p. 238-44.

48. Gruber, C., M. van Stuijvenberg, F. Mosca, G. Moro, G. Chirico, C.P. Braegger, J. Riedler, G. Boehm, U. Wahn, *Reduced occurrence of early atopic dermatitis because of immunoactive prebiotics among low-atopy-risk infants*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **126**(4): p. 791-7.
49. Meneghin, F., V. Fabiano, C. Mameli, G.V. Zuccotti, *Probiotics and atopic dermatitis in children*. Pharmaceuticals (Basel), 2012. **5**(7): p. 727-44.
50. Osborn, D.A., J.K. Sinn, *Probiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity*. Cochrane Database Syst Rev, 2007(4): p. Cd006475.
51. Osborn, D.A., J.K. Sinn, *Prebiotics in infants for prevention of allergy*. Cochrane Database Syst Rev, 2013. **3**: p. Cd006474.
52. Arslanoglu, S., G.E. Moro, J. Schmitt, L. Tandoi, S. Rizzardi, G. Boehm, *Early dietary intervention with a mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of allergic manifestations and infections during the first two years of life*. J Nutr, 2008. **138**(6): p. 1091-5.
53. Shafiei, A., M. Moin, Z. Pourpak, M. Gharagozlou, A. Aghamohammadi, V. Sajedi, H. soheili, S. Sotoodeh, M. Movahedi, *Synbiotics could not reduce the scoring of childhood atopic dermatitis (SCORAD): a randomized double blind placebo-controlled trial*. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2011. **10**(1): p. 21-8.
54. Wu, K.G., T.H. Li, H.J. Peng, *Lactobacillus salivarius plus fructo-oligosaccharide is superior to fructo-oligosaccharide alone for treating children with moderate to severe atopic dermatitis: a double-blind, randomized, clinical trial of efficacy and safety*. Br J Dermatol, 2012. **166**(1): p. 129-36.
55. Braun-Fahrlander, C., E. von Mutius, *Can farm milk consumption prevent allergic diseases?* Clin Exp Allergy, 2011. **41**(1): p. 29-35.
56. Gerhold, K., K. Blumchen, A. Bock, A. Franke, A. Avagjan, E. Hamelmann, *Endotoxins and allergy: lessons from the murine model*. Pathobiology, 2002. **70**(5): p. 255-9.
57. Liu, A.H., J.R. Murphy, *Hygiene hypothesis: fact or fiction?* J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(3): p. 471-8.
58. Gerhold, K., A. Avagyan, C. Seib, R. Frei, J. Steinle, B. Ahrens, A.M. Dittrich, K. Blumchen, R. Lauener, E. Hamelmann, *Prenatal initiation of endotoxin airway exposure prevents subsequent allergen-induced sensitization and airway inflammation in mice*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(3): p. 666-73.
59. Cochran, J.R., A.M. Khan, O. Elidemir, H. Xue, B. Cua, J. Fullmer, G.L. Larsen, G.N. Colasurdo, *Influence of lipopolysaccharide exposure on airway function and allergic responses in developing mice*. Pediatr Pulmonol, 2002. **34**(4): p. 267-77.
60. Fageras Bottcher, M., M. Hmani-Aifa, A. Lindstrom, M.C. Jenmalm, X.M. Mai, L. Nilsson, H.A. Zdzienicka, B. Bjorksten, P. Soderkvist, O. Vaarala, *A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(3): p. 561-7.
61. Baldini, M., I.C. Lohman, M. Halonen, R.P. Erickson, P.G. Holt, F.D. Martinez, *A Polymorphism\* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **20**(5): p. 976-83.
62. Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda, S. Akira, *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. Immunity, 1999. **11**(1): p. 115-22.

63. Ahrens, B., D. Quarcoo, S. Buhner, P.M. Matricardi, E. Hamelmann, *Oral administration of bacterial lysates attenuates experimental food allergy*. Int Arch Allergy Immunol, 2011. **156**(2): p. 196-204.
64. Giese, T., K. Zimmermann, S.C. Meuer, *Functional characterization of pro-biotic pharmaceuticals by quantitative analysis of gene expression*. Arzneimittelforschung, 2003. **53**(5): p. 385-91.
65. Enck, P., K. Zimmermann, G. Menke, S. Muller-Lissner, U. Martens, S. Klosterhalfen, *A mixture of Escherichia coli (DSM 17252) and Enterococcus faecalis (DSM 16440) for treatment of the irritable bowel syndrome--a randomized controlled trial with primary care physicians*. Neurogastroenterol Motil, 2008. **20**(10): p. 1103-9.
66. Lau, S., K. Gerhold, K. Zimmermann, C.W. Ockeloen, S. Rossberg, P. Wagner, C. Sulser, R. Bunikowski, I. Witt, J. Wauer, J. Beschorner, G. Menke, E. Hamelmann, U. Wahn, *Oral application of bacterial lysate in infancy decreases the risk of atopic dermatitis in children with 1 atopic parent in a randomized, placebo-controlled trial*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(4): p. 1040-7.
67. Kiencke, P., K. Viehmann, R. Rychlik, *Cost-effectiveness analysis, prevention of atopic dermatitis by oral application of bacterial lysate in newborns/small children*. Eur J Health Econ, 2013. **14**(6): p. 995-1002.
68. Penders, J., K. Gerhold, E.E. Stobberingh, C. Thijs, K. Zimmermann, S. Lau, E. Hamelmann, *Establishment of the intestinal microbiota and its role for atopic dermatitis in early childhood*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **132**(3): p. 601-607.e8.
69. Menke, G., *Pro-Symbioflor® Prophylaxe atopischer und allergischer Manifestationen und Aktivierung bzw. Modulation körpereigener Abwehrkräfte durch Pro-Symbioflor® bei Säuglingen mit atopisch vorbelastetem Elternpaar*. . Integrierter Klinischer Studienbericht, 2013. **Version 2.5** (SY 2001/1 PAPS).
70. Greenland, S., J. Pearl, J.M. Robins, *Causal diagrams for epidemiologic research*. Epidemiology, 1999. **10**(1): p. 37-48.
71. Thoemmes, F., *Comparison of selected causality theories*. Gesundheitswesen, 2011. **73**(12): p. 880-3.
72. Schipf, S., S. Knuppel, J. Hardt, A. Stang, *Directed acyclic graphs (DAGs) - the application of causal diagrams in epidemiology*. Gesundheitswesen, 2011. **73**(12): p. 888-92.
73. Pearl, J., *Models, Reasoning and Interference*., in *Causality*, C.U. Press, Editor. 2000: New York. p. 331-358.
74. Becton, D.a.C., *BDM Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit Instruction Manual*. 2005, BD Diagnostische Systeme, Tullastr. 8-12, 69126 Heidelberg.
75. Textor, J., J. Hardt, S. Knuppel, *DAGitty: a graphical tool for analyzing causal diagrams*. Epidemiology, 2011. **22**(5): p. 745.
76. von Berg, A., S. Koletzko, A. Grubl, B. Filipiak-Pittroff, H.E. Wichmann, C.P. Bauer, D. Reinhardt, D. Berdel, *The effect of hydrolyzed cow's milk formula for allergy prevention in the first year of life: the German Infant Nutritional Intervention Study, a randomized double-blind trial*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(3): p. 533-40.
77. Bergmann, R.L., J. Forster, J. Schulz, K.E. Bergmann, C.P. Bauer, U. Wahn, *Atopic family history. Validation of instruments in a multicenter cohort study*. Pediatr Allergy Immunol, 1993. **4**(3): p. 130-5.

78. Schlaud, M., K. Atzpodien, W. Thierfelder, [*Allergic diseases. Results from the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS)*]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2007. **50**(5-6): p. 701-10.
79. Soh, S.E., M. Aw, I. Gerez, Y.S. Chong, M. Rauff, Y.P. Ng, H.B. Wong, N. Pai, B.W. Lee, L.P. Shek, *Probiotic supplementation in the first 6 months of life in at risk Asian infants--effects on eczema and atopic sensitization at the age of 1 year*. Clin Exp Allergy, 2009. **39**(4): p. 571-8.
80. Kim, J.Y., J.H. Kwon, S.H. Ahn, S.I. Lee, Y.S. Han, Y.O. Choi, S.Y. Lee, K.M. Ahn, G.E. Ji, *Effect of probiotic mix (Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium lactis, Lactobacillus acidophilus) in the primary prevention of eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial*. Pediatr Allergy Immunol, 2010. **21**(2 Pt 2): p. e386-93.
81. Betsi, G.I., E. Papadavid, M.E. Falagas, *Probiotics for the treatment or prevention of atopic dermatitis: a review of the evidence from randomized controlled trials*. Am J Clin Dermatol, 2008. **9**(2): p. 93-103.
82. Feinstein, A.R., *The problem of cogent subgroups: a clinicostatistical tragedy*. J Clin Epidemiol, 1998. **51**(4): p. 297-9.
83. Kleist, P., *Vorsicht bei Subgruppenanalysen*. Schweiz Med Forum, 2007. **7**: p. 794-799.
84. Schaad, U.B., *OM-85 BV, an immunostimulant in pediatric recurrent respiratory tract infections: a systematic review*. World J Pediatr, 2010. **6**(1): p. 5-12.
85. Rozy, A., J. Chorostowska-Wynimko, *Bacterial immunostimulants--mechanism of action and clinical application in respiratory diseases*. Pneumonol Alergol Pol, 2008. **76**(5): p. 353-9.
86. Kalliomaki, M., S. Salminen, H. Arvilommi, P. Kero, P. Koskinen, E. Isolauri, *Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial*. Lancet, 2001. **357**(9262): p. 1076-9.
87. Foolad, N., A.W. Armstrong, *Prebiotics and probiotics: the prevention and reduction in severity of atopic dermatitis in children*. Benef Microbes, 2014. **5**(2): p. 151-60.
88. Kuitunen, M., K. Kukkonen, K. Juntunen-Backman, R. Korpela, T. Poussa, T. Tuure, T. Haahtela, E. Savilahti, *Probiotics prevent IgE-associated allergy until age 5 years in cesarean-delivered children but not in the total cohort*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(2): p. 335-41.
89. Lodinova-Zadnikova, R., L. Prokesova, I. Kocourkova, J. Hrdy, J. Zizka, *Prevention of allergy in infants of allergic mothers by probiotic Escherichia coli*. Int Arch Allergy Immunol, 2010. **153**(2): p. 201-6.
90. Schmolz, M., *Immunpharmakologie IMÖ 01-C*. 2001, Fa. EDI (Experimentelle & Diagnostische Immunologie) GmbH.
91. Illi, S., E. von Mutius, S. Lau, R. Nickel, C. Gruber, B. Niggemann, U. Wahn, *The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(5): p. 925-31.
92. Enomoto, T., M. Sowa, K. Nishimori, S. Shimazu, A. Yoshida, K. Yamada, F. Furukawa, T. Nakagawa, N. Yanagisawa, N. Iwabuchi, T. Odamaki, F. Abe, J. Nakayama, J.Z. Xiao, *Effects of Bifidobacterial Supplementation to Pregnant Women and Infants in the Prevention of Allergy Development in Infants and on Fecal Microbiota*. Allergol Int, 2014.

93. Panduru, M., N.M. Panduru, C.M. Salavastru, G.S. Tiplica, *Probiotics and primary prevention of atopic dermatitis: a meta-analysis of randomized controlled studies*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2014.
94. Morgan, E., R. Varro, H. Sepulveda, J.A. Ember, J. Apgar, J. Wilson, L. Lowe, R. Chen, L. Shivraj, A. Agadir, R. Campos, D. Ernst, A. Gaur, *Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology*. Clin Immunol, 2004. **110**(3): p. 252-66.
95. Prescott, S.L., C. Macaubes, A. Yabuhara, T.J. Venaille, B.J. Holt, W. Habre, R. Loh, P.D. Sly, P.G. Holt, *Developing patterns of T cell memory to environmental allergens in the first two years of life*. Int Arch Allergy Immunol, 1997. **113**(1-3): p. 75-9.
96. Watanabe, J., Y. Miyazaki, G.A. Zimmerman, K.H. Albertine, T.M. McIntyre, *Endotoxin contamination of ovalbumin suppresses murine immunologic responses and development of airway hyper-reactivity*. J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 42361-8.
97. De Groote, D., P.F. Zangerle, Y. Gevaert, M.F. Fassotte, Y. Beguin, F. Noizat-Pirenne, J. Pirenne, R. Gathy, M. Lopez, I. Dehart, et al., *Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation*. Cytokine, 1992. **4**(3): p. 239-48.
98. Lagrelius, M., P. Jones, K. Franck, H. Gaines, *Cytokine detection by multiplex technology useful for assessing antigen specific cytokine profiles and kinetics in whole blood cultured up to seven days*. Cytokine, 2006. **33**(3): p. 156-65.
99. Miles, E.A., L. Bakewell, P.C. Calder, *Production of lymphocyte-derived cytokines by whole umbilical cord blood cultures stimulated with mitogens and allergens*. Cytokine, 2003. **21**(2): p. 74-83.
100. Eisenbarth, S.C., D.A. Piggott, J.W. Huleatt, I. Visintin, C.A. Herrick, K. Bottomly, *Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen*. J Exp Med, 2002. **196**(12): p. 1645-51.
101. Simon, D., L.R. Braathen, H.U. Simon, *Increased lipopolysaccharide-induced tumour necrosis factor-alpha, interferon-gamma and interleukin-10 production in atopic dermatitis*. Br J Dermatol, 2007. **157**(3): p. 583-6.
102. Aulock, S.V., S. Deininger, C. Draing, K. Gueinzus, O. Dehus, C. Hermann, *Gender difference in cytokine secretion on immune stimulation with LPS and LTA*. J Interferon Cytokine Res, 2006. **26**(12): p. 887-92.
103. Petrovsky, N., L.C. Harrison, *Diurnal rhythmicity of human cytokine production: a dynamic disequilibrium in T helper cell type 1/T helper cell type 2 balance?* J Immunol, 1997. **158**(11): p. 5163-8.
104. Petrovsky, N., L.C. Harrison, *The chronobiology of human cytokine production*. Int Rev Immunol, 1998. **16**(5-6): p. 635-49.
105. Young, M.R., J.P. Matthews, E.L. Kanabrocki, R.B. Sothorn, B. Roitman-Johnson, L.E. Scheving, *Circadian rhythmometry of serum interleukin-2, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in men*. Chronobiol Int, 1995. **12**(1): p. 19-27.
106. Myrianthefs, P., S. Karatzas, K. Venetsanou, E. Grouzi, P. Evagelopoulou, E. Boutzouka, G. Fildissis, I. Spiliotopoulou, G. Baltopoulos, *Seasonal variation in whole blood cytokine production after LPS stimulation in normal individuals*. Cytokine, 2003. **24**(6): p. 286-92.

107. Vakirlis, E., E. Lazaridou, T.G. Tzellos, S. Gerou, D. Chatzidimitriou, D. Ioannides, *Investigation of cytokine levels and their association with SCORAD index in adults with acute atopic dermatitis*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2011. **25**(4): p. 409-16.
108. Kosaka, H., T. Yoshimoto, T. Yoshimoto, J. Fujimoto, K. Nakanishi, *Interferon-gamma is a therapeutic target molecule for prevention of postoperative adhesion formation*. Nat Med, 2008. **14**(4): p. 437-41.
109. Dunstan, J.A., J. Hale, L. Breckler, H. Lehmann, S. Weston, P. Richmond, S.L. Prescott, *Atopic dermatitis in young children is associated with impaired interleukin-10 and interferon-gamma responses to allergens, vaccines and colonizing skin and gut bacteria*. Clin Exp Allergy, 2005. **35**(10): p. 1309-17.
110. Herberth, G., J. Heinrich, S. Roder, A. Figl, M. Weiss, U. Diez, M. Borte, O. Herbarth, I. Lehmann, *Reduced IFN-gamma- and enhanced IL-4-producing CD4+ cord blood T cells are associated with a higher risk for atopic dermatitis during the first 2 yr of life*. Pediatr Allergy Immunol, 2010. **21**(1 Pt 1): p. 5-13.
111. Tang, M., A. Kemp, G. Varigos, *IL-4 and interferon-gamma production in children with atopic disease*. Clin Exp Immunol, 1993. **92**(1): p. 120-4.
112. Tang, M.L., G. Varigos, A.S. Kemp, *Reduced interferon-gamma (IFN-gamma) secretion with increased IFN-gamma mRNA expression in atopic dermatitis: evidence for a post-transcriptional defect*. Clin Exp Immunol, 1994. **97**(3): p. 483-90.
113. Kirchner H, K.A., Neustock P, Rink L, *Cytokine und Interferone*. 1994, Heidelberg Berlin Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.
114. Martin, K., K. Viera, C. Petr, N. Marie, T. Eva, *Simultaneous analysis of cytokines and co-stimulatory molecules concentrations by ELISA technique and of probabilities of measurable concentrations of interleukins IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, CXCL8 (IL-8), IL-10, IL-13 occurring in plasma of healthy blood donors*. Mediators Inflamm, 2006. **2006**(5): p. 65237.
115. Sabat, R., G. Grutz, K. Warszawska, S. Kirsch, E. Witte, K. Wolk, J. Geginat, *Biology of interleukin-10*. Cytokine Growth Factor Rev, 2010. **21**(5): p. 331-44.
116. Niwa, Y., *Elevated RANTES levels in plasma or skin and decreased plasma IL-10 levels in subsets of patients with severe atopic dermatitis*. Arch Dermatol, 2000. **136**(1): p. 125-6.
117. Seneviratne, S.L., L. Jones, A.S. Bailey, A.P. Black, G.S. Ogg, *Severe atopic dermatitis is associated with a reduced frequency of IL-10 producing allergen-specific CD4+ T cells*. Clin Exp Dermatol, 2006. **31**(5): p. 689-94.
118. Sohn, M.H., J.S. Song, K.W. Kim, E.S. Kim, K.E. Kim, J.M. Lee, *Association of interleukin-10 gene promoter polymorphism in children with atopic dermatitis*. J Pediatr, 2007. **150**(1): p. 106-8.
119. Jujo, K., H. Renz, J. Abe, E.W. Gelfand, D.Y. Leung, *Decreased interferon gamma and increased interleukin-4 production in atopic dermatitis promotes IgE synthesis*. J Allergy Clin Immunol, 1992. **90**(3 Pt 1): p. 323-31.
120. Renz, H., K. Jujo, K.L. Bradley, J. Domenico, E.W. Gelfand, D.Y. Leung, *Enhanced IL-4 production and IL-4 receptor expression in atopic dermatitis and their modulation by interferon-gamma*. J Invest Dermatol, 1992. **99**(4): p. 403-8.
121. Namkung, J.H., J.E. Lee, E. Kim, H.J. Cho, S. Kim, E.S. Shin, E.Y. Cho, J.M. Yang, *IL-5 and IL-5 receptor alpha polymorphisms are associated with atopic dermatitis in Koreans*. Allergy, 2007. **62**(8): p. 934-42.

122. Linnamaa, P., K. Nieminen, L. Koulu, S. Tuomasjukka, H. Kallio, B. Yang, R. Tahvonen, J. Savolainen, *Pro-inflammatory and Th2-type cytokine responses in PBMC in infants are associated with parental smoking*. Clin Exp Allergy, 2012. **42**(10): p. 1472-8.
123. Cartwright, N., A. Demaine, M. Jahromi, H. Sanders, E.R. Kaminski, *A study of cytokine protein secretion, frequencies of cytokine expressing cells and IFN-G gene polymorphisms in normal individuals*. Transplantation, 1999. **68**(10): p. 1546-52.
124. Ju, C., T. Satoh, J. Kagawa, S. Kaneko, *[The public health significance of the measurement of cytokines in serum]*. Nihon Eiseigaku Zasshi, 2000. **54**(4): p. 615-21.
125. Rehm, K.E., L. Xiang, O.U. Elci, M. Griswold, G.D. Marshall, Jr., *Variability in laboratory immune parameters is associated with stress hormone receptor polymorphisms*. Neuroimmunomodulation, 2012. **19**(4): p. 220-8.
126. Dibbs, Z., J. Thornby, B.G. White, D.L. Mann, *Natural variability of circulating levels of cytokines and cytokine receptors in patients with heart failure: implications for clinical trials*. J Am Coll Cardiol, 1999. **33**(7): p. 1935-42.
127. Wattedegera, S., K. Sills, C.J. Howard, J.C. Hope, C.J. McInnes, G. Entrican, *Variability in cytokine production and cell proliferation by mitogen-activated ovine peripheral blood mononuclear cells: modulation by interleukin (IL)-10 and IL-12*. Vet Immunol Immunopathol, 2004. **102**(1-2): p. 67-76.
128. Xiang, L., K.S. Del Ben, K.E. Rehm, G.D. Marshall, Jr., *Effects of acute stress-induced immunomodulation on TH1/TH2 cytokine and catecholamine receptor expression in human peripheral blood cells*. Neuropsychobiology, 2012. **65**(1): p. 12-9.
129. Xiang, L., O.U. Elci, K.E. Rehm, G.D. Marshall, Jr., *Associations between cytokine receptor polymorphisms and variability in laboratory immune parameters in normal humans*. Hum Immunol, 2014. **75**(1): p. 91-7.
130. Behniafard, N., M. Gharagozlou, S. Sotoudeh, E. Farhadi, M. Khaledi, Z.G. Moghaddam, M. Mahmoudi, S.M. Fathi, B. Darabi, A. Aghamohammadi, A.A. Amirzargar, N. Rezaei, *Association of single nucleotide polymorphisms of interleukin-1 family with atopic dermatitis*. Allergol Immunopathol (Madr), 2014. **42**(3): p. 212-5.
131. Kiyohara, C., K. Tanaka, Y. Miyake, *Genetic susceptibility to atopic dermatitis*. Allergol Int, 2008. **57**(1): p. 39-56.
132. Stavric, K., S. Peova, D. Trajkov, M. Spiroski, *Gene polymorphisms of 22 cytokines in Macedonian children with atopic dermatitis*. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2012. **11**(1): p. 37-50.
133. Chang, Y.T., W.R. Lee, C.W. Yu, H.N. Liu, M.W. Lin, C.H. Huang, C.C. Chen, D.D. Lee, W.J. Wang, C.H. Hu, S.F. Tsai, *No association of cytokine gene polymorphisms in Chinese patients with atopic dermatitis*. Clin Exp Dermatol, 2006. **31**(3): p. 419-23.
134. Tanaka, K., Y. Miyake, S. Sasaki, Y. Ohya, Y. Hirota, *Maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure and the risk of allergic diseases in Japanese infants: the Osaka Maternal and Child Health Study*. J Asthma, 2008. **45**(9): p. 833-8.
135. Parazzini, F., S. Cipriani, C. Zinetti, L. Chatenoud, L. Frigerio, G. Amuso, M. Ciammella, A. Di Landro, L. Naldi, *Perinatal factors and the risk of atopic dermatitis: a cohort study*. Pediatr Allergy Immunol, 2014. **25**(1): p. 43-50.
136. Kahr, N., V. Naeser, L.G. Stensballe, K.O. Kyvik, A. Skytthe, V. Backer, K. Bonnelykke, S.F. Thomsen, *Gene-environment interaction in atopic diseases: a population-based twin study of early-life exposures*. Clin Respir J, 2014.

137. Tezza, G., F. Mazzei, A. Boner, *Epigenetics of allergy*. Early Hum Dev, 2013. **89 Suppl 1**: p. S20-1.
138. Herberth, G., M. Bauer, M. Gasch, D. Hinz, S. Roder, S. Olek, T. Kohajda, U. Rolle-Kampczyk, M. von Bergen, U. Sack, M. Borte, I. Lehmann, *Maternal and cord blood miR-223 expression associates with prenatal tobacco smoke exposure and low regulatory T-cell numbers*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **133**(2): p. 543-50.
139. Maccani, M.A., V.S. Knopik, *Cigarette smoke exposure-associated alterations to non-coding RNA*. Front Genet, 2012. **3**: p. 53.
140. Joubert, B.R., S.E. Haberg, R.M. Nilsen, X. Wang, S.E. Vollset, S.K. Murphy, Z. Huang, C. Hoyo, O. Midttun, L.A. Cupul-Uicab, P.M. Ueland, M.C. Wu, W. Nystad, D.A. Bell, S.D. Peddada, S.J. London, *450K epigenome-wide scan identifies differential DNA methylation in newborns related to maternal smoking during pregnancy*. Environ Health Perspect, 2012. **120**(10): p. 1425-31.
141. Wan, E.S., W. Qiu, A. Baccarelli, V.J. Carey, H. Bacherman, S.I. Rennard, A. Agusti, W. Anderson, D.A. Lomas, D.L. Demeo, *Cigarette smoking behaviors and time since quitting are associated with differential DNA methylation across the human genome*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(13): p. 3073-82.
142. Wang, I.J., S.L. Chen, T.P. Lu, E.Y. Chuang, P.C. Chen, *Prenatal smoke exposure, DNA methylation, and childhood atopic dermatitis*. Clin Exp Allergy, 2013. **43**(5): p. 535-43.
143. Chung, S., I.K. Sundar, J.W. Hwang, F.E. Yull, T.S. Blackwell, V.L. Kinnula, M. Bulger, H. Yao, I. Rahman, *NF-kappaB inducing kinase, NIK mediates cigarette smoke/TNFalpha-induced histone acetylation and inflammation through differential activation of IKKs*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23488.
144. Yang, I.V., D.A. Schwartz, *Epigenetic mechanisms and the development of asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **130**(6): p. 1243-55.
145. Lundholm, C., A.K. Ortqvist, P. Lichtenstein, S. Cnattingius, C. Almqvist, *Impaired fetal growth decreases the risk of childhood atopic eczema: a Swedish twin study*. Clin Exp Allergy, 2010. **40**(7): p. 1044-53.
146. Moore, M.M., S.L. Rifas-Shiman, J.W. Rich-Edwards, K.P. Kleinman, C.A. Camargo, Jr., D.R. Gold, S.T. Weiss, M.W. Gillman, *Perinatal predictors of atopic dermatitis occurring in the first six months of life*. Pediatrics, 2004. **113**(3 Pt 1): p. 468-74.
147. Sevelsted, A., H. Bisgaard, *Neonatal size in term children is associated with asthma at age 7, but not with atopic dermatitis or allergic sensitization*. Allergy, 2012. **67**(5): p. 670-5.
148. Suarez-Varela, M.M., L.G. Alvarez, M.D. Kogan, J.C. Ferreira, A. Martinez Gimeno, I. Aguinaga Ontoso, C. Gonzalez Diaz, A. Arnedo Pena, B. Dominguez Aurrecochea, R.M. Busquets Monge, A. Blanco Quiros, J. Batlles Garrido, N. Garcia de Andoain, A.L. Varela, A. Garcia Merino, N. Gimeno Clemente, A. Llopis Gonzalez, *Diet and prevalence of atopic eczema in 6 to 7-year-old schoolchildren in Spain: ISAAC phase III*. J Investig Allergol Clin Immunol, 2010. **20**(6): p. 469-75.
149. Silverberg, J.I., E. Kleiman, H. Lev-Tov, N.B. Silverberg, H.G. Durkin, R. Joks, T.A. Smith-Norowitz, *Association between obesity and atopic dermatitis in childhood: a case-control study*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(5): p. 1180-6.e1.
150. Hersoug, L.G., A. Linneberg, *The link between the epidemics of obesity and allergic diseases: does obesity induce decreased immune tolerance?* Allergy, 2007. **62**(10): p. 1205-13.

151. Paulson, Q.X., J. Hong, V.B. Holcomb, N.P. Nunez, *Effects of body weight and alcohol consumption on insulin sensitivity*. Nutr J, 2010. **9**: p. 14.
152. Nair, S., A. Al-Hendy, *Adipocytes enhance the proliferation of human leiomyoma cells via TNF-alpha proinflammatory cytokine*. Reprod Sci, 2011. **18**(12): p. 1186-92.
153. Li, M.D., *Leptin and beyond: an odyssey to the central control of body weight*. Yale J Biol Med, 2011. **84**(1): p. 1-7.
154. Ong, K.K., *Size at birth, postnatal growth and risk of obesity*. Horm Res, 2006. **65 Suppl 3**: p. 65-9.
155. Wang, M., C. Karlsson, C. Olsson, I. Adlerberth, A.E. Wold, D.P. Strachan, P.M. Martricardi, N. Aberg, M.R. Perkin, S. Tripodi, A.R. Coates, B. Hesselmar, R. Saalman, G. Molin, S. Ahrne, *Reduced diversity in the early fecal microbiota of infants with atopic eczema*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(1): p. 129-34.
156. Bjorksten, B., E. Sepp, K. Julge, T. Voor, M. Mikelsaar, *Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(4): p. 516-20.
157. Storro, O., T. Oien, O. Langsrud, K. Rudi, C. Dotterud, R. Johnsen, *Temporal variations in early gut microbial colonization are associated with allergen-specific immunoglobulin E but not atopic eczema at 2 years of age*. Clin Exp Allergy, 2011. **41**(11): p. 1545-54.
158. de Kivit, S., M.C. Tobin, C.B. Forsyth, A. Keshavarzian, A.L. Landay, *Regulation of Intestinal Immune Responses through TLR Activation: Implications for Pro- and Prebiotics*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 60.
159. Hayashida, S., H. Uchi, Y. Moroi, M. Furue, *Decrease in circulating Th17 cells correlates with increased levels of CCL17, IgE and eosinophils in atopic dermatitis*. J Dermatol Sci, 2011. **61**(3): p. 180-6.
160. Akan, A., D. Azkur, E. Civelek, M. Erkocoglu, Z. Yilmaz-Oztorun, A. Kaya, C. Ozcan, E. Vezir, M. Toyran, E. Dibek-Misirlioglu, C.N. Kocabas, *Risk factors of severe atopic dermatitis in childhood: single-center experience*. Turk J Pediatr, 2014. **56**(2): p. 121-6.
161. Magnarin, M., A. Knowles, A. Ventura, F. Vita, L. Fanti, G. Zabucchi, *A role for eosinophils in the pathogenesis of skin lesions in patients with food-sensitive atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 1995. **96**(2): p. 200-8.
162. Rossberg, S., K. Gerhold, G. Menke, K. Zimmermann, T. Geske, S. Philippe, S. Lau, *PD06 - Early elevated blood eosinophils are predictive for the development of atopic dermatitis in an atopic birth cohort*. Clin Transl Allergy, 2014. **4**(Suppl 1 3rd Pediatric Allergy and Asthma Meeting (PAAM)Publi): p. P6.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

AD	atopische Dermatitis
APC	Antigen präsentierende Zelle
Balb/c	Laborstamm von Albinomäusen
CBA	cytometric bead array
CCL1	Chemokin (C-C motif) ligand 1
CD	cluster of differentiation (spezifischer Oberflächenrezeptor)
CI	confidence interval (Konfidenzintervall)
CSF	colony-stimulating factor (koloniestimulierender Faktor)
DAG	directed acyclic graphs
DC	dendritic cell (dendritische Zelle)
Der p1	Dermatophagoides pteronyssinus
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (Leibniz-Institut)
E. coli	Escherichia coli
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid (Ethyldiamintetraessigsäure)
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Foxp3	Transkriptionsfaktor forkhead box protein 3
GM-CSF	Granulozyt/Makrophage-koloniestimulierender Faktor
HSM	Hausstaubmilbe
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4

IL-4R	Interleukin 4 Rezeptor
IL-5	Interleukin 5
IL-10	Interleukin 10
ITT	intention-to-treat
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Plasmaprotein
LPS	Lipopolysaccharide
MED	Medium
MHC II	major histocompatibility complex II (Histokompatibilitätskomplex der Klasse II)
mRNA	messenger ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
miRNA	micro ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OR	Odds ratio
OVA	Ovalbumin
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
SCORAD	Scoring atopic dermatitis
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SNP	single nucleotide polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$ (Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ )
Th1	T-Helferzellen 1
Th2	T-Helferzellen 2
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Treg	regulatorische T-Zellen
nTreg	natürliche regulatorische T-Zellen
aTreg	antigenspezifische regulatorische T-Zellen
V	Visit

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

		Seite
Abbildung 1	Modell der Th1-/Th2-Polarisierung	11
Abbildung 2	4-Wege-Balance-System	13
Abbildung 3	Circulus vitiosus der Entzündung bei atopischer Dermatitis	16
Abbildung 4	Heterogenität der atopischen Dermatitis	20
Abbildung 5	Studiendesign	28
Abbildung 6	Fluoreszenzschema der Zytokin-spezifischen Capture-Beads	31
Abbildung 7	Schema des Cytometric Bead Array	32
Abbildung 8	Vereinfachtes Beispiel eines DAG für den Einfluss der Zytokine auf das Outcome AD	33
Abbildung 9	Histogramme der absoluten Titer am Beispiel TNF- $\alpha$ zu Visit 2 für die Stimulationen LPS, Der p1 und OVA	37
Abbildung 10	Histogramme der Titerdifferenzen am Beispiel TNF- $\alpha$ (V5 – V2) für die Stimulationen LPS, Der p1 und OVA	38
Abbildung 11	Boxplots der Titerdifferenzen von IL-4 zu V5 (links) und V7 (rechts) nach Stimulation des Vollblutes mit LPS, Der p1 und OVA, stratifiziert nach Erkrankungsgruppen	56
Abbildung 12	DAG mit dem Zytokinprofil zu Visit 2 als Expositionsvariable und der atopischen Dermatitis als Outcome zu Visit 7	60

### 7.3 Tabellenverzeichnis

		Seite
Tabelle 1	Merkmale des angeborenen und erworbenen Immunsystems	8
Tabelle 2	Herkunft und Funktion ausgewählter Zytokine	9
Tabelle 3	Einteilung von T-Zellen nach ihrem Zytokinprofil	11
Tabelle 4	Elterliche Atopie-Anamnese	23
Tabelle 5	Stimulanzien für die Zellkultur	30
Tabelle 6	Eingesetzte statistische Testverfahren	35
Tabelle 7	Fallzahlen der Population mit Zytokinbestimmungen, stratifiziert nach Erkrankungsgruppen	41
Tabelle 8	Vergleich der Erkrankungszahlen zwischen Gesamtstudienpopulation und der Population mit Zytokinbestimmungen, stratifiziert nach Intervention	41
Tabelle 9	Basalcharakteristika der Population mit Zytokinbestimmungen und der Gesamtstudienpopulation, stratifiziert nach Intervention	43
Tabelle 10	Zytokintiter nach Stimulation des Vollblutes mit LPS, stratifiziert nach Intervention und Visit	44
Tabelle 11	Zytokintiter nach Stimulation des Vollblutes mit dem Hausstaub- allergen Der p1, stratifiziert nach Intervention und Visit	45
Tabelle 12	Zytokintiter nach Stimulation des Vollblutes mit dem Hühnerei- allergen OVA, stratifiziert nach Intervention und Visit	46
Tabelle 13	Sensitivitätsanalyse der Population mit Zytokinbestimmungen, stratifiziert nach Erkrankungsgruppen	47
Tabelle 14	Zytokintiter nach Stimulation des Vollblutes mit LPS, stratifiziert nach Erkrankung und Visit	50
Tabelle 15	Zytokintiter nach Stimulation des Vollblutes mit dem Hausstaub- allergen Der p1, stratifiziert nach Erkrankung und Visit	51

Tabelle 16	Zytokintiter nach Stimulation des Vollblutes mit dem Hühnerei-allergen OVA, stratifiziert nach Erkrankung und Visit	52
Tabelle 17	Zytokintiterdifferenzen (V5-V2 bzw. V7-V2) nach Stimulation des Vollblutes mit LPS, stratifiziert nach Erkrankung und Visit	53
Tabelle 18	Zytokintiterdifferenzen (V5-V2 bzw. V7-V2) nach Stimulation des Vollblutes mit dem Hausstauballergen Der p1, stratifiziert nach Erkrankung und Visit	54
Tabelle 19	Zytokintiterdifferenzen (V5-V2 bzw. V7-V2) nach Stimulation des Vollblutes mit dem Hühnerei-allergen OVA, stratifiziert nach Erkrankung und Visit	55
Tabelle 20	Kategorisierte Zytokintiterdifferenzen (V5-V2), stratifiziert nach Erkrankung und Visit	57
Tabelle 21	Kategorisierte Zytokintiterdifferenzen (V7-V2), stratifiziert nach Erkrankung und Visit	58
Tabelle 22	Einflussfaktoren auf die Prävalenz der atopischen Dermatitis zu V5	62
Tabelle 23	Häufigkeitsverteilung zwischen den Kategorien von AD und dem IL-4 Shift zu V5	63
Tabelle 24	Häufigkeitsverteilung zwischen den Kategorien von AD und dem Rauchen nach der Schwangerschaft zu V5	63
Tabelle 25	Häufigkeitsverteilung zwischen den Kategorien von AD zu V5 und dem Eosinophilen-Score zu V2	64
Tabelle 26	Häufigkeitsverteilung zwischen den Kategorien von AD und dem IL-10 Shift zu V5	64
Tabelle 27	Häufigkeitsverteilung zwischen den Kategorien von AD und der Kolonisation mit Bifidobakterien zu V5	65
Tabelle 28	Einflussfaktoren auf die Prävalenz der atopischen Dermatitis zu V7	65
Tabelle 29	Häufigkeitsverteilung zwischen den Kategorien von AD und dem IL-4 Shift zu V7	66

Tabelle 30	Häufigkeitsverteilung zwischen den Kategorien von AD und dem TNF- $\alpha$ Shift zu V7	66
Tabelle 31	Häufigkeitsverteilung zwischen den Kategorien von AD zu V7 und dem Eosinophilen-Score zu V2	67
Tabelle 32	Häufigkeitsverteilung zwischen den Kategorien von AD und der Kolonisation mit <i>Bacteroides fragilis</i> zu V7	67

## 7.4 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Ulrike Förster, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss der frühkindlichen Zytokinproduktion auf die Entwicklung einer atopischen Dermatitis unter Berücksichtigung einer Intervention mit Pro-Symbioflor®“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

## **7.5 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## **7.6 Danksagung**

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Ulrich Wahn, Herrn Prof. Dr. Eckard Hamelmann und Frau PD Dr. Susanne Lau danken, die mir in ihrer Funktion als Leiter der Klinik und Initiatoren der PAPS-Studie das Promotionsthema überließen und mich stets freundlich berieten und begleiteten. Ganz besonders danken möchte ich meiner Betreuerin und Doktormutter Frau PD Dr. Kerstin Gerhold, für ihre außergewöhnliche, unermüdliche und motivierende Betreuung und Beratung sowie wissenschaftliche Begleitung – eine bessere Betreuung kann man sich nicht wünschen. Ein besonderer Dank gilt auch den MTAs Petra Ellensohn, in Gedenken, und Margret Oberreit-Menesis, die die Laboruntersuchungen durchführten und mich bei der Datenerhebung unterstützten, sowie Herrn Georg Menke und Herrn Dr. Thomas Geske für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung und Interpretation. Letztlich wäre diese Arbeit ohne die Finanzierung der PAPS-Studie und speziell auch der Substudie der Zytokine durch die DFG und die Symbiopharm GmbH, vertreten insbesondere durch Herrn Dr. Kurt Zimmermann, nicht möglich gewesen. Dank gebührt ebenso den an der Studie teilnehmenden Kindern und deren Eltern, ohne die diese Untersuchungen nicht zustande gekommen wären.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und insbesondere meinem Ehemann und meinen Kindern danken, die von unserer kostbaren gemeinsamen Zeit abgaben und mir den Rücken freihielten, damit ich diese Arbeit fertig stellen konnte.