

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare
Diagnostik, Standort Marburg

Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität in Marburg

Direktor: Prof. Dr. med. H. Renz

Die Rolle von Fettsäuren aus der Kuhmilch in der Entwicklung von allergischen Erkrankungen und Asthma bronchiale

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaft

(Dr. rer. nat.)



dem Fachbereich der Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Christian Böcking

aus Gießen

Marburg, 2011

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am:

30.09.2011

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. H. Renz

Koreferent: Prof. Dr. M. Schnare

„OHNE SPEKULATION GIBT ES KEINE NEUE BEOBACHTUNG“

CHARLES DARWIN (1809-1882)

FÜR MEINE MUTTER

1	Einleitung.....	1
1.1	Allergie & Asthma bronchiale	1
1.1.1	Allergie	1
1.1.2	Asthma bronchiale	1
1.1.3	Die Pathophysiologie von Asthma bronchiale	2
1.2	Die Epidemiologie von Asthma bronchiale	6
1.2.1	Genetische und exogene Risikofaktoren.....	7
1.2.2	Die „Hygiene-Hypothese“ und der „Bauernhof-Effekt“	8
1.2.3	Protektive Wirkung von Kuhmilch auf allergische Erkrankungen und Asthma..	11
1.3	Fettsäuren	16
1.3.1	Konjugierte Linolsäuren (CLA).....	17
1.3.2	Immunmodulation durch CLA	18
1.3.3	Fettsäureanalytik.....	19
1.4	Hypothesen und Aufgabenstellung der Arbeit.....	20
2	Materialien und Methoden.....	22
2.1	Methodenentwicklung	22
2.1.1	Lipidextraktion	22
2.1.2	Methylierungsreaktionen.....	24
2.1.3	Kapillargaschromatographie-Flammenionisationsdetektion (GC-FID)	26
2.1.4	Dünnschichtchromatographie (DC).....	27
2.1.5	Validierungsparameter.....	27
2.2	Geburtskohortenstudie PASTURE/Efrain	32
2.2.1	Studiendesign	32
2.2.2	Probensammlung	34
2.2.3	Datensätze für epidemiologische Studien	34
2.2.4	Statistische Auswertung.....	34
2.3	Experimentelle <i>in-vivo</i> Studien	35
2.3.1	Versuchstiere und Versuchshaltung.....	35
2.3.2	Induktion einer allergischen Atemwegsentszündung	35
2.3.3	Modellierung der allergischen Atemwegsentszündung durch die Verabreichung von Kuhmilch.....	36
2.3.4	Head-out-Body-Plethysmographie.....	37
2.3.5	Probengewinnung	38
2.3.6	Differenzierung und Zellzählung der Leukozyten in der BAL	39

2.3.7	Lungenhistologie	40
2.3.8	Zytokinbestimmung aus der BAL und restimulierten Lymphozytenkulturen mittels Cytometric Bead Array (CBA)	42
2.3.9	Immunglobulin-Bestimmung mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay	43
2.3.10	Bestimmung der Fettsäuremuster in Serum und Erythrozytenmembranen	45
2.3.11	Eicosanoidanalytik	45
2.3.12	Herstellung der Mausdiäten	45
2.3.13	Statistische Auswertung	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Methodenentwicklung zur gaschromatischen Fettsäurebestimmung in Serum, Erythrozyten und Kuhmilch	48
3.1.1	Validierung des Agilent A7890 System	48
3.1.2	Methodenvalidierung	53
3.2	Epidemiologische Analysen zur Rolle von Fettsäuren aus der Kuhmilch in der Entwicklung von Allergie und Asthma bronchiale	71
3.2.1	Charakterisierung der Fall-Kontroll-Studie	71
3.2.2	Assoziation zwischen dem Auftreten von Asthmasymptomen und dem Verzehr von Bauernhofmilch	73
3.2.3	Unterschiede in den Fettsäuremustern von Bauernhof- und Molkereimilch	73
3.2.4	Einflussfaktoren auf die CLA-Verteilung in der Bauernhofmilch	75
3.2.5	Unterschiede in Fettsäureverteilung im Serum von Bauern und Nicht-Bauern	77
3.2.6	Keine Unterschiede in der Zusammensetzung der Fettsäuren in Erythrozyten von Bauern und Nicht-Bauern	80
3.2.7	Der Konsum von CLA-reicher Milch führt zur erhöhten CLA-Serumspiegeln	81
3.2.8	Die Exposition bzw. der Konsum von CLA-reicher Milch ist invers mit der Entwicklung von Asthmasymptomen assoziiert	81
3.3	Die Rolle von Milch-CLA auf den asthmatischen Phänotyp im Tiermodell der akuten Atemwegsentzündung	83
3.3.1	Unterschiede in der Fettsäurekomposition in bayerischen Alpenbauernhofmilch und hessischer Bauernhofmilch	83
3.3.2	Die Milch-Fütterung von Mäusen führt nicht zu Unverträglichkeiten	85
3.3.3	Die biologische Verfügbarkeit der CLAs nach Verabreichung ist gewährleistet	89
3.3.4	Charakterisierung des asthmatischen Phänotyps nach Fütterung verschiedener Milchdiäten bzw. Milchfette	92
4	Diskussion	102
4.1	Etablierung und Validierung der Fettsäureanalytik	103

4.1.1	Praktikabilität, Selektivität und Sensitivität der Analysemethode sind gewährleistet.....	105
4.1.2	Extraktion nach Hara & Radin führt ermöglicht die vollständige und quantitative Extraktion der Fettsäuren	108
4.1.3	Die Kombination von basen- und säure-katalysierten Methylierungsreagenzien führt zur erfolgreichen Derivatisierung der Fettsäuren.....	109
4.1.4	Die Überprüfung der Mess- und Methodenpräzision bestätigt die Reproduzierbarkeit der Analyseergebnisse	110
4.1.5	Fazit	111
4.2	CLA-reiche Bauernhofmilch beeinflusst die Entwicklung von frühen Asthmasymptomen	112
4.2.1	Assoziation zwischen Konsum von Bauernhofmilch und frühen Asthmasymptomen	113
4.2.2	Die Fettsäureprofile von Bauernhof- und Molkereimilch unterscheiden sich hauptsächlich im CLA-Gehalt	115
4.2.3	CLAs aus Bauernhofhofmilch sind biologisch verfügbar und wirksam.....	118
4.2.4	CLA-reiche Bauernhofmilch beeinflusst die Entwicklung von frühen Asthmasymptomen bei Kindern aus der PASTURE/Efrain-Kohorte.....	119
4.2.5	Fazit	120
4.3	Die Rolle von Milch-CLA auf den asthmatischen Phänotyp im Tiermodell der akuten Atemwegsentszündung	122
4.3.1	Translation der epidemiologischen Ergebnisse in ein murines <i>in vivo</i> -Modell der akuten Atemwegsentszündung	123
4.3.2	Die Verabreichung von pasteurisierter Milch ruft keine Veränderung des asthmatischen Phänotyps hervor	125
4.3.3	Fazit	126
5.	Zusammenfassung.....	129
5.1.	Zusammenfassung.....	129
5.2.	Summary	130
6.	Literaturverzeichnis.....	132
8.	Verzeichnis der akademischer Lehrer	146
9.	Publikationen	147
10.	Danksagung	148
	Anhang	I
	I. Abkürzungsverzeichnis.....	I
	II. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	IV
	II.I Abbildungsverzeichnis.....	IV

II.II	Tabellenverzeichnis	V
III.	Gaschromatographische Bedingungen	VI
IV.	Theoretische Responsefaktoren (TRF) nach Craske und Bannon (1998)	VII
V.	Variationskoeffizienten V_k (Intra-Assay) aller gemessenen Fettsäuren	VIII
VI.	Variationskoeffizienten V_k (Inter-Assay) aller gemessenen Fettsäuren	IX
VII.	Zusammensetzung und Vergleich der Fettsäuren in Plasma und Erythrozytenmembranen	X
VIII.	Fragebögen zur Milchsammlung	XI
IX.	Fragenbogenauszüge zum Still- und Ernährungsverhalten der Kinder	XVI
X.	Fragenbogenauszüge zur Definition der Variable „Asthmasymptome“ (4,5 Jahre) ...	XXII

1 Einleitung

1.1 Allergie & Asthma bronchiale

1.1.1 Allergie

Der Begriff Allergie wurde 1906 erstmals von dem Wiener Kinderarzt Clemens von Pirquet geprägt, um zwischen gesundheitsschädlichen und physiologisch protektiven Immunantworten zu unterscheiden. Er definierte Allergie im weitesten Sinne als „veränderte Fähigkeit des Körpers, auf eine fremde Substanz zu reagieren“ (Von Pirquet C, 1946). Die am weitesten verbreitete Form der Allergie ist die Atopie. Der Begriff Atopie wird als IgE-vermittelte Hypersensitivität nach Kontakt mit ansonsten harmlosen Umweltsubstanzen definiert. Geschätzt ein Viertel der Bevölkerung in der industrialisierten Welt ist von dieser Form der Allergie betroffen (Floistrup H et al., 2006). Die allergische Antwort ist gegen verschiedene aus der Umwelt bekannte Allergene, wie z.B. Inhalations-, Nahrungsmittel-, Pollen oder Hausstauballergene gerichtet. Allergische Entzündungen und Reaktionen können sowohl lokal an Schleimhäuten, an den Atemwegen und an der Haut als auch systemisch in Form einer Anaphylaxie auftreten (Larche M et al., 2006). Die Ätiologie der allergischen Immunantwort ist sehr komplex und kann durch vielfältige Faktoren wie genetische Anfälligkeit, Route der Exposition, struktureller Charakteristika und Dosis des Allergens beeinflusst werden (Valenta R et al., 2004). Klinisch manifestieren sich Allergien häufig in Form von allergischer Rhinitis, Nahrungsmittelallergie, atopischer Dermatitis oder allergischem Asthma bronchiale.

1.1.2 Asthma bronchiale

Nach der heutigen Auffassung lässt sich das Asthma bronchiale grundsätzlich als eine chronische entzündliche Atemwegserkrankung unterschiedlicher Ursachen definieren. Die Hauptcharakteristika von Asthma beinhalten Atemwegshyperreagibilität, -obstruktion und erhöhte Mukussekretion (Busse WW and Lemanske RF Jr, 2001; Holgate ST, 2008). Das Krankheitsbild des Asthmas bronchiale variiert je nach Schweregrad und Form der Erkrankung stark. Eine allgemeine Definition für Asthma bronchiale existiert nicht, da es sich um eine stark heterogene Erkrankung handelt (Wenzel SE, 2006). Obwohl die Mehrheit aller Asthmaerkrankungen mit einer bereits existierenden Atopie assoziiert wird, gibt es Formen von Asthma, die unabhängig vom Atopiestatus des Individuums sind (Humbert M, 2000). Im Allgemeinen unterscheidet man das extrinsische (atopische) und das intrinsische (nicht atopische) Asthma. Beide Asthmaformen lassen sich durch die Infiltration von eosinophilen Granulozyten und T-Helfer Zellen des Typs 2 (Th2) ins Lungengewebe charakterisieren (Kay

AB, 2005). Diese Zellen setzen Zytokine, Chemokine, aber auch proinflammatorische Lipidmediatoren wie z.B. Leukotriene und Prostaglandine frei. Diese Lipidmediatoren sind maßgeblich an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt. Des Weiteren können sie im Verlauf des Chronifizierungsprozesses zum Umbau des Atemwegsepithels, der Basalmembran und der glatten Muskulatur, auch *Remodeling* genannt, führen (Holgate ST, 2004; Molina et al., 2007).

Das allergische Asthma manifestiert sich meist schon im Kindes- und Jugendalter, wobei die Erkrankten häufig noch andere atopiebedingte Komorbiditäten wie chronische Rhinitis, Sinusitis, Atopische Dermatitis und Nahrungsmittelallergie aufweisen (Kay AB, 2001). Es ist jedoch erstaunlich, dass bis zu 40 % der westlichen Bevölkerung erhöhte Gesamt-IgE-Spiegel gegen gewöhnliche Umweltallergene aufweisen, aber nur sieben Prozent der Atopiker an Asthma bronchiale erkrankt sind (Beasley R et al., 2001).

1.1.3 Die Pathophysiologie von Asthma bronchiale

Die Grundvoraussetzung der immunologischen Antwort im allergischen Asthma, ist die Sensibilisierung gegenüber einem inhalativen gewöhnlichen Umweltallergen. Der Sensibilisierungsphase folgt die Effektorphase bzw. Entzündungsphase. Diese lässt sich ferner in die Sofort- und Spätreaktion unterteilen.

Sensibilisierung

Unter physiologischen Bedingungen dient das Epithelium als hoch regulierte und weitestgehend unüberwindbare Barriere. Die Lungenepithelzellen wirken wie ein molekulares Sieb, welches die Lunge vor dem Eindringen von inhalativen Antigenen und Pathogenen in die Atemwege schützt. Dennoch kommt es immer wieder dazu, dass vereinzelt einige Antigene diese Barriere durchdringen und dadurch in der Lage sind eine Immunreaktion hervorzurufen. Im Laufe dieser allergischen Sensibilisierung wird nun eine antigenspezifische T-Zellantwort gegen das jeweilige Antigen generiert. Dafür wird das Antigen von Antigenpräsentierenden Zellen (APC), primär von mukosalen Dendritischen Zellen (DC), am Atemwegsepithel aufgenommen und prozessiert (Galli SJ et al., 2008). Die stimulierten DC migrieren daraufhin in die drainierenden Lymphknoten der Lungen und präsentieren dort das prozessierte Antigen über ihren Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II), den antigenspezifischen T-Zellrezeptor (TCR) der naiven T-Zellen (Romagnani S, 2004). Die naiven CD4⁺-T-Zellen werden so aktiviert und differenzieren sich selektiv zu reifen Th2-Zellen oder Th1-Zellen. Die Differenzierung ist von der Bindung des Antigens am TCR und dem lokalen Zytokinmilieu abhängig (Romagnani S, 2004; Lohoff M and Mak TW, 2005; Galli SJ et al., 2008; Lloyd CM and Hessel EM, 2010). Das Vorhandensein von Interleukin 4 (IL-4) begünstigt die Differenzierung zu

Th2-Zellen und deren Proliferation. Aktivierte Th2-Zellen setzen die Th2-charakteristischen Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 und TNF- α (Tumornekrosefaktor α) frei (Hammad H and Lambrecht BN, 2008).

Insbesondere die Ausschüttung von IL-4, IL-13 und die Ligation verschiedener co-stimulatorischer Moleküle, wie z. B. CD 40, induziert den Isotypwechsel in aktivierten B-Zellen zu IgE. Der dadurch resultierende Anstieg der IgE-Produktion führt zur systemischen Anreicherung von IgE und der Bindung an hochaffinen IgE-Rezeptoren (Fc ϵ RI) auf der Oberfläche von alveolären Mastzellen, wodurch diese sensibilisiert werden (Galli SJ et al., 2008) (Abbildung 1). Die Sensibilisierung eines Individuums gegen ein bestimmtes Antigen selbst führt jedoch nicht zur Ausprägung allergischer Symptome.

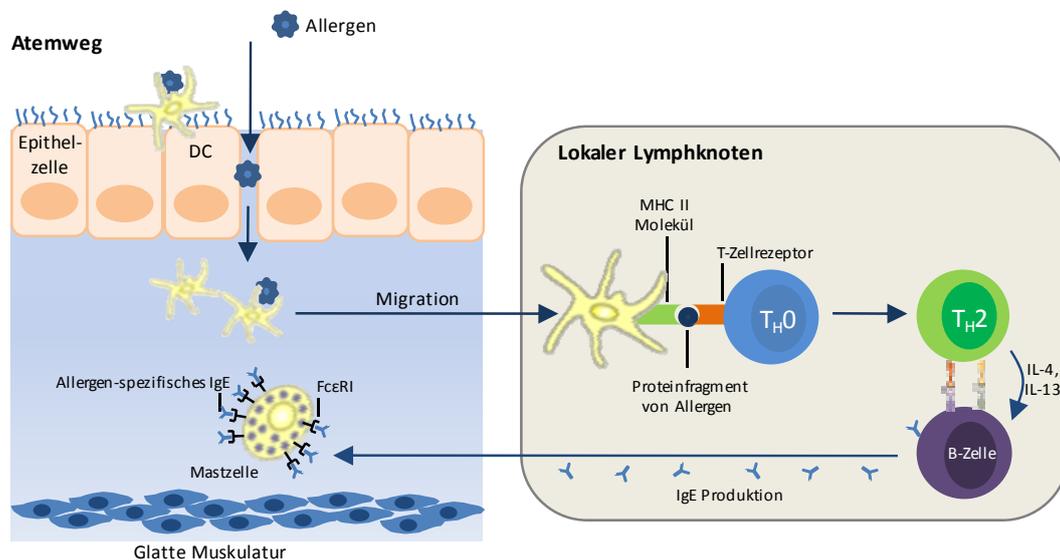


Abbildung 1: Allergische Sensibilisierung (modifiziert nach Galli SJ et al., 2008)

Allergene werden von dendritischen Zellen (DC) aufgenommen und prozessiert. Die aktivierten DCs migrieren daraufhin zu den regionalen Lymphknoten, wo sie die Allergenpeptide naiven T-Zellen (Th0) präsentieren. Diese naiven T-Zellen werden aktiviert und differenzieren zu Th2-Zellen, deren Zytokinausschüttung einen Isotypwechsel zu IgE in B-Zellen auslöst. Das IgE wird systemisch verteilt und bindet an hochaffine IgE-Rezeptoren (Fc ϵ RI) auf Mastzellen und sensibilisieren diese somit.

Sofortreaktion

Der wiederholte Antigenkontakt führt in bereits sensibilisierten Individuen zur Ausprägung einer allergischen Typ I-Reaktion in den Atemwegen und zu Interaktionen zwischen Allergen und dem IgE-Fc ϵ RI-Komplex auf Mastzellen. Das Resultat dieser Interaktionen ist die Kreuzvernetzung der IgE-Moleküle auf bereits sensibilisierten Mastzellen (Galli SJ et al., 2008). Im Folgenden kommt es innerhalb weniger Minuten zur Ausschüttung verschiedener pro-inflammatorischer Mediatoren wie Prostaglandinen, Leukotrienen, Histamin und reaktiven

Sauerstoffderivaten (Bradding P et al., 1995; Marshall JS, 2004; Rivera J and Gilfillan AM, 2006; Kraft S and Kinet JP, 2007). Diese ausgeschütteten Mediatoren bewirken die typischen Symptome der Sofortreaktion wie akute Bronchokonstriktion, Vasodilatation der Blutgefäße, erhöhte Mukusekretion und vaskuläre Permeabilität (Hamid Q and Tulic M, 2009) (Abbildung 2).

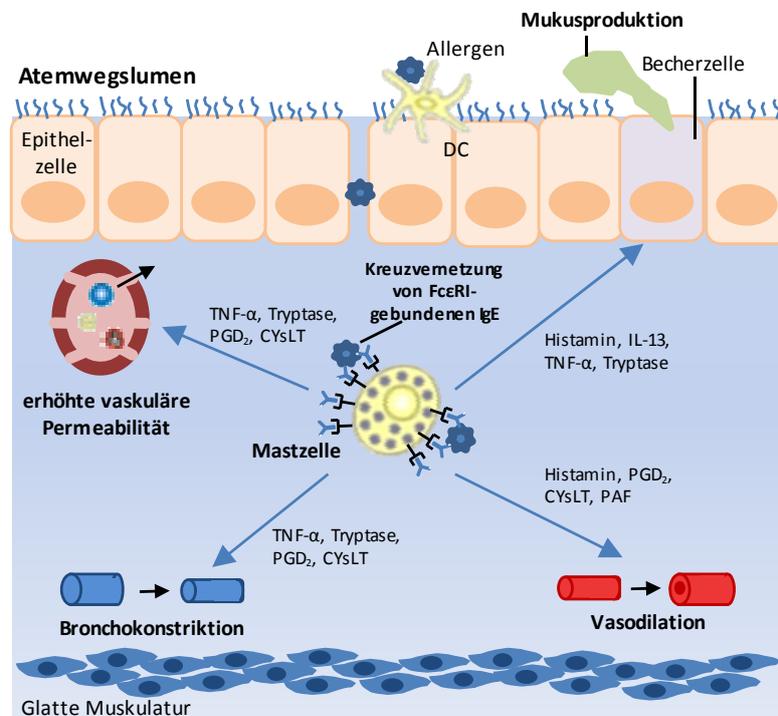


Abbildung 2: Sofortreaktion (modifiziert nach Galli SJ et al., 2008)

Während der Sofortreaktion kommt es zur Kreuzvernetzung der am FcεRI-gebundenen IgE durch die Bindung der Allergene. Die Vernetzung führt zur Aktivierung der Mastzellen und der Freisetzung vorgebildeter inflammatorischer Mediatoren durch Degranulation. Diese Mediatoren verursachen Bronchokonstriktion, Vasodilatation, erhöhte vaskuläre Permeabilität und Mukusproduktion.

Spätreaktion

Die Spätreaktion schließt sich in der Regel an die Sofortreaktion an und setzt in etwa sechs bis neun Stunden nach der Allergenprovokation ein. Die Spätreaktion der allergischen Atemwegsentzündung ist von Rekrutierung und Aktivierung eosinophiler Granulozyten (De Monchy JG et al., 1985) und CD4⁺-Th2-Zellen (Robinson D et al., 1993) geprägt. Weiterhin kommt es zur Infiltration der Atemwege durch basophile und neutrophile Granulozyten sowie Makrophagen (Abbildung 3).

Eine besondere Rolle in der Atemwegsentzündung wird den eosinophilen Granulozyten zugeschrieben. Klinische Untersuchungen bei Asthmapatienten zeigten, dass es signifikante Assoziationen zwischen der Aktivierung von Eosinophilen (Eosinophilie) und der Ausprägung

der Erkrankung sowie der Hyperreagibilität der Atemwege gibt (Bousquet J et al., 1990). Die aktivierten eosinophilen Granulozyten sind für eine Vielzahl der im Asthma ausgeschütteten Mediatoren wie freie Sauerstoffradikale und Eicosanoide (Busse WW and Sedgwick JB, 1994), aber auch Th2-Zytokine wie IL-4, IL-5 und GM-CSF (Ying S et al., 1995) und einige Wachstumsfaktoren (Gleich GJ et al., 1993) verantwortlich. Als Folge der Ausschüttung der zuvor genannten pro-inflammatorischen Mediatoren treten verstärkt Kontraktionen der glatten Atemwegsmuskulatur (Rabe KF et al., 1994), erhöhte vaskuläre Permeabilität (Collins DS et al., 1993), Bildung von mikrovaskulärer Lecks (Greiff L et al., 1993) und eine verstärkte Hyperreagibilität der Atemwege (Leff AR, 1994) auf.

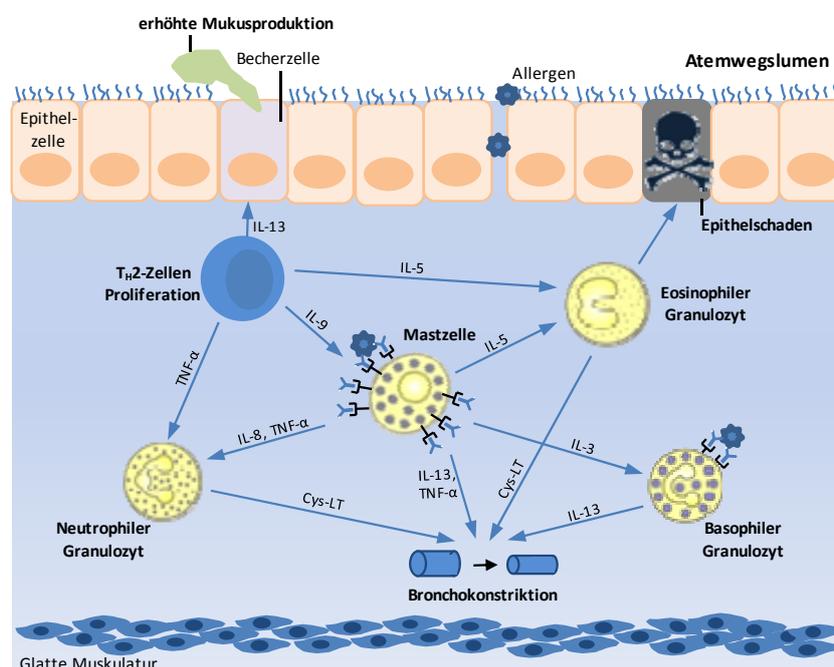


Abbildung 3: Spätreaktion (modifiziert nach Galli SJ et al., 2008)

Die Spätreaktion tritt typischerweise erst 6-9 Stunden nach Allergenkontakt auf. Dabei werden Zellen des angeborenen (neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten) und adaptiven Immunsystems (Th2-Zellen) in die Atemwege rekrutiert. Diese produzieren wiederum eine Vielzahl von Mediatoren, die zu Bronchokonstriktion, erhöhter Mukussekrektion und Schäden im mukosalen Epithel führen.

Infolge von anhaltender (chronischer) Entzündung können strukturelle Veränderungen der Atemwege auftreten, welche bei der Reparatur der durch die Entzündung geschädigten Atemwege entstehen. Diese Prozesse werden im Allgemeinen als Atemwegsremodulierung bezeichnet (Halwani R et al., 2010). Zu den strukturellen Veränderungen der Remodulierung gehören u.a. die Verdickung der Atemwegswand aufgrund von Hypertrophie der glatten Atemwegsmuskulatur sowie Mukusdrüsen- und Gobletzellhyperplasie (Vignola AM et al., 2003; Sumi Y and Hamid Q, 2007).

Neben den eosinophilen Granulozyten nehmen die Th2-Zellen eine zentrale Rolle in der Pathogenese des Asthmas bronchiale ein. Die Aktivierung von Th2-Zellen trägt zur Initiation und Aufrechterhaltung der allergischen Atemwegsentzündung durch Ausschüttung von Th2-Zytokinen bei. Insbesondere die erhöhte Produktion von IL-5 unterstützt die Rekrutierung und das Überleben von eosinophilen Granulozyten. Des Weiteren fördern die beiden Zytokine IL-9 und IL-13 die bronchiale Hyperreagibilität, indem sie die Reizbarkeit der glatten Atemwegsmuskulatur erhöhen und somit Bronchokonstriktion aufgrund nicht spezifischer Stimuli auslösen (Hammad H and Lambrecht BN, 2008).

1.2 Die Epidemiologie von Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist eine der weltweit häufigsten multifaktoriellen chronisch verlaufenden Erkrankungen. In 2009 meldete die „Globale Initiative für Asthma (GINA)“, dass ca. 300 Millionen Menschen auf der ganzen Welt von Asthma betroffen sind (Masoli M et al., 2004). Epidemiologische Studien, wie z.B. die ISAAC-Studie (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) und die ECRHS-Erhebung (European Community Respiratory Health Survey) zeigten, dass die Prävalenz und Inzidenz von Asthma und Allergien in der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts entscheidend anstieg (Abbildung 4), wobei sich dieser epidemische Anstieg vor allem in den Gesundheitssystemen der westlichen und industrialisierten Staaten der Welt stark bemerkbar macht. Durch den stetigen Anstieg wird Asthma somit auch zu einem volkswirtschaftlichen Problem. Jährlich steigen die Kosten zur Prävention und Behandlung beträchtlich. Alleine in den Vereinigten Staaten von Amerika liegen die jährlichen Behandlungskosten bei etwa sechs Milliarden Dollar (Anandan C et al., 2010).

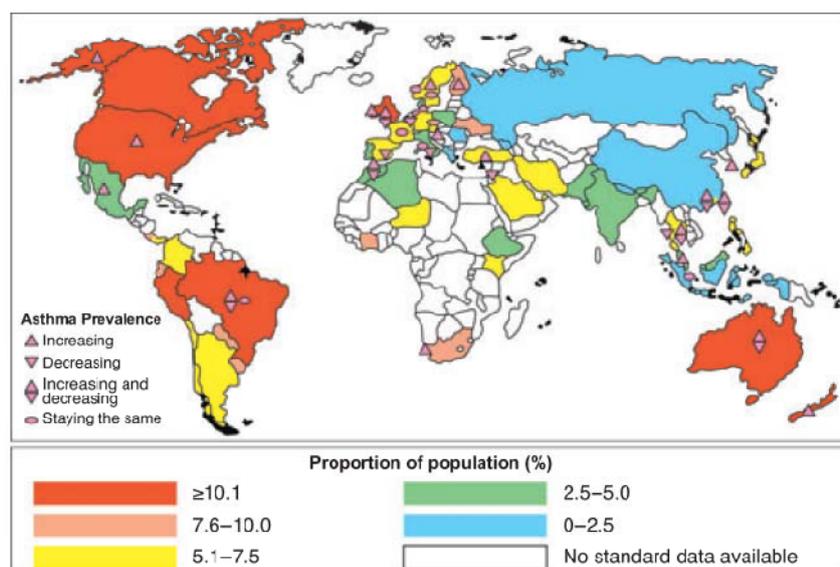


Abbildung 4: Asthma-Prävalenz und Trendentwicklung zwischen 1990-2008 (Anandan C et al., 2010)

1.2.1 Genetische und exogene Risikofaktoren

In Familien- und Zwillingsstudien konnte mehrfach unterstrichen werden, dass die Familiengeschichte bzw. die genetische Prädisposition eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von allergischem Asthma bronchiale spielt (Skadhauge LR et al., 1999; Kuiper S et al., 2007; Wu T et al., 2010). Neuere Studien zeigten ein um 60 Prozent erhöhtes Risiko des Kindes eine Atopie zu entwickeln, wenn beide Elternteile Atopiker sind (Aberg N, 1993). Litonjua et al. (Litonjua AA et al., 1998) konnten zeigen, dass die Chancen an Asthma bronchiale zu erkranken vom Dreifachen auf das Sechsfache steigen, wenn statt nur einem Elternteil beide erkrankt sind. Wenngleich Assoziationen zwischen mütterlicher als auch väterlicher Krankheitsanamnese und der Entwicklung von kindlichem Asthma bronchiale bekannt sind, gibt es doch Unterschiede im mütterlichen und väterlichen Beitrag zur Entwicklung von Asthma bronchiale bei den Nachkommen. Während der mütterliche Effekt auf genetischen und/oder exogenen Faktoren *in utero* und dem Zeitraum kurz nach der Geburt beruht, sind die Einflüsse des Vaters ausschließlich genetischen Ursprungs (Litonjua AA et al., 1998; Ly NP and Celedon JC, 2007).

Eine Vielzahl von genetischen Assoziationsstudien zum allergischen Asthma bronchiale in verschiedenen Bevölkerungsgruppen haben eine Reihe von Kandidatengenen identifiziert, die möglicherweise Assoziationen mit dem Auftreten von genetisch beeinflussten Krankheiten aufweisen. Die Identifizierung dieser Kandidatengene ermöglicht die Entwicklung neuer Instrumente für Diagnose und Therapie von allergischen Erkrankungen. Gegenwertig sind *single nucleotid polymorphisms* (SNP) von 64 verschiedenen Genloci beschrieben, die mit der Pathogenese der allergischen Immunantwort assoziiert werden konnten (Hoffjan S et al., 2003). Eine wichtige Rolle scheint dementsprechend eine Genregion auf dem Chromosom 5p einzunehmen. Diese Region beinhaltet mehrere Gene, welche zur der atopischen Reaktion beitragen. Diese Gene kodieren u.a. für die Zytokine Interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-13 und IL-5 (Rosenwasser LJ et al., 1995; van der Pouw Kraan TC et al., 1999; Heinzmann A et al., 2000; Cookson WO, 2002), die in der Asthmapathogenese und der damit verbundenen Th2-Antwort und Atopie eine bedeutende Rolle spielen. Des Weiteren konnten genetische Variationen auf dem Chromosom 6p (MHC II-Region, *major histocompatibility complex class II*) (Ober C and Moffatt MF, 2000) und der α -Kette des T-Zellrezeptors (TCR) (Moffatt MF et al., 2007) identifiziert werden, welche bei der Antigenpräsentation von zentraler Bedeutung sind. Aber auch SNPs in Genen, die nicht direkt mit der Asthmapathogenese in Verbindung gebracht werden, können von besonderer Bedeutung sein. Mofatt et al. (2007) konnten in Patienten, die schon in ihrer Kindheit an Asthma erkrankten, ein SNP im ORMDL3-Gen nachweisen.

ORMDL3 kodiert für Transmembranproteine, die im Endoplasmatischen Retikulum verankert sind (Moffatt MF et al., 2007).

Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass eine Veränderung in der genetischen Prädisposition für den drastischen Anstieg von allergischen Erkrankungen und im speziellen des Asthma bronchiale in den Industrieländern innerhalb der letzten Jahrzehnte verantwortlich ist. Eine solche grundlegende genetische Veränderung kann sich erst nach mehreren Generationen in einer Population durchsetzen. Aus diesem Grund wurden weitere denkbare Einflussfaktoren, wie z.B. Umweltveränderungen (D'Amato G et al., 2000), das sozioökonomische Umfeld (von Mutius E et al., 1994), erhöhte häusliche Allergenexposition (Wahn U et al., 1997) und die abnehmende Häufigkeit von bakteriellen Infektionen im Kindesalter (Strachan DP, 1989) in zahlreichen epidemiologischen Studien untersucht. Weitere mögliche Faktoren könnten die ansteigende Luftverschmutzung durch Schadstoffe, sowie viralen Infektionen mit dem Respiratorischen Synzytial-Virus (RSV) oder dem Rhinovirus (RV) sein (Lemanske RF, 2004).

1.2.2 Die „Hygiene-Hypothese“ und der „Bauernhof-Effekt“

Die „Hygiene-Hypothese“ wurde erstmals im Jahr 1989 von David Strachan postuliert. Er postulierte, dass der Anstieg allergischer Erkrankungen und Asthma in industrialisierten Ländern in den letzten Jahrzehnten, die Folge von steigenden Hygienebedingungen im Alltag und der Trend in Kleinfamilien zu leben sei (Strachan DP, 1989). Insbesondere der westliche Lebensstil und damit einhergehend die verbesserte Körperhygiene und Lebensbedingungen führen zur verminderten Bakterienexposition und demzufolge zur Abnahme von bakteriellen Infektionen (Strachan DP, 2000). Diese Veränderungen sind besonders im Kindesalter relevant, da sich das Immunsystem erst entwickelt und demnach die Kinder verstärkt unter keimarmen Bedingungen aufwachsen. Hinweise aus der Immunologie deuten daraufhin, dass für den Schutz vor Allergie und Asthma ein ausgeglichenes Verhältnis der Th2- und Th1-Antwort eine bedeutende Rolle spielt. Es konnte gezeigt werden, dass bei Atopikern und Asthmatikern das Th2/Th1-Gleichgewicht zu Gunsten der Th2-Differenzierung verschoben ist (Wills-Karp et al., 2001). Durch das Fehlen der exogenen bakteriellen Stimuli bleibt die Th1-Differenzierung nach der Geburt aus und führt tendenziell zu einem höheren Risiko an Allergie und Asthma zu erkranken (Sheikh A and Strachan DP, 2004).

In den letzten Jahren konnte die Hypothese von David Strachan durch eine Vielzahl von epidemiologischen Studien bekräftigt werden. Diese Studien offenbarten eine Reihe von allergeo-protektiven sowie asthma-protektiven Faktoren. Erste Studien wiesen auf einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der miteinander aufwachsenden Geschwister und dem

Risiko an Heuschnupfen zu erkranken hin (Strachan DP, 1989). Ebenso konnte der Besuch einer Kindertagesstätte mit einer verminderten Prävalenz von Asthma assoziiert werden (Lemanske RF Jr, 2002; Celedon JC et al., 2003).

Ferner gab es vermehrt Anzeichen dafür, dass Veränderungen des Lebensstils oder der Lebensbedingungen maßgeblich an der erhöhten Prävalenz von allergischen Erkrankungen und Asthma teilhaben. Darauf deuten Studien hin, die die Prävalenz von Allergien in West- und Ostdeutschland vor und nach der Wiedervereinigung untersuchten (von Mutius E et al., 1994; Nowak D et al., 1996; Heinrich et al., 2002). Obwohl beide Bevölkerungsgruppen einen identischen ethnisch-genetischen Hintergrund haben, konnten Unterschiede in der Häufigkeit an Allergie und Asthma zu erkranken, dargelegt werden. Entgegen der a priori Hypothese, einer aufgrund höherer Umweltverschmutzung erhöhten Prävalenz in Ostdeutschland wiesen die Ostdeutschen eine geringere Allergieprävalenz auf als die Westdeutschen. Die Ursache schien in der 40 Jahre andauernde Trennung der beiden Gesellschaften und die damit verbundenen verschiedenen Lebensbedingungen zu liegen (Nowak D et al., 1996). Bemerkenswerterweise beobachteten Heinrich et. al (2002) einen Anstieg allergischer Erkrankungen bei Kindern in Ostdeutschland, die nach der Wiedervereinigung geboren wurden. Diese Beobachtungen lieferten ein weiteres Indiz dafür, dass Veränderungen der Lebensbedingungen ein entscheidender Faktor für die Zunahme von Allergien sind. Zwei weitere Studien, durchgeführt in verschiedenen europäischen Bevölkerungsgruppen, die durch einen alternativen Lebensstil charakterisiert sind, konnten die Annahmen der Hygiene-Hypothese gleichermaßen stützen. So war auffällig, dass Familien, die sich streng an einen anthroposophischen Lebensstil hielten, geringere Erkrankungsraten für Allergie und Asthma aufwiesen (Alm JS et al., 1999; Floistrup H et al., 2006).

Diese Studien deuteten darauf hin, dass der Verlust von traditionellen und ländlichen Lebensweisen mit einer erhöhten Prävalenz für allergische Erkrankungen verbunden ist. In vielen Entwicklungsländern spiegelt sich dies insbesondere in der verstärkten Urbanisierung wieder (von Mutius E and Vercelli, 2010). In Europa wurden in den letzten Jahren zahlreiche Studien durchgeführt, um diese Ergebnisse weitergehend zu untersuchen und protektive Faktoren näher zu charakterisieren. Die in der Schweiz durchgeführte SCARPOL-Studie (*Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution, Climate and Pollen*) konnte zeigen, dass Kinder von Eltern die auf dem Bauernhof tätig sind ein geringeres Risiko besitzen an Atopie zu erkranken (Braun-Fahrlander C et al., 1999). Der Vergleich von Kindern, die in zwei verschiedenen ländlichen Gegenden in Bayern aufwuchsen,

zeigte weiterhin, dass der allerge-protektive Effekt maßgeblich auf Bauernhöfen mit Viehbestand und Tierställen gegeben ist (Aberg N, 1993). Die Querschnittsstudie ALEX (*Allergy and Endotoxin*) untersuchte 1999 mehr als 900 Schulkinder von Bauernhöfen in traditionellen alpinen Regionen in Deutschland, Österreich und der Schweiz. Im Rahmen dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass der Kontakt zu Ställen und der Konsum von unbehandelter Kuhmilch im frühen Kindesalter stark protektiv auf die Entwicklung von Atopie und Asthma wirkt (Riedler J et al., 2001). Die Ergebnisse konnten im Folgenden durch die PARSIFAL-Studie (*Prevention of Allergy- Risk Factors for Sensitization Related to Farming and Anthroposophic lifestyle*) bestätigt werden. Hierbei handelte es sich um eine Querschnittsstudie, die Bauernhofkinder, Steiner-Schulkinder und ihre Referenzgruppen bzgl. ihrer prä- und postnatalen sozioökonomisch-spezifischen Exposition vergleicht (Alfven et al., 2006). Neben dem protektiven *in utero*-Effekt durch das Arbeiten der Schwangeren im Tierstall, konnte ebenfalls ein protektiver Einfluss von Bauernhofmilchkonsum während des ersten Lebensjahres bestätigt werden (Waser M et al., 2007). In Rahmen einer Studie von Ege et. al konnte in zwei Querschnittsstudien (PARSIFAL und GABRIEL) gezeigt werden, dass Kinder, die auf Bauernhöfen aufwachsen, im Vergleich zu Kindern, die nicht auf dem Bauernhof aufgewachsen sind, ein geringeres Risiko besitzen an Asthma zu erkranken und einer größeren Vielfalt an Mikroben ausgesetzt sind (Ege MJ et al., 2011). Der protektive Effekt mikrobieller Bauernhofexposition konnte tierexperimentell im Modell der murinen allergischen Atemwegsinflammation bestätigt werden (Conrad et al., 2009b).

Alle diese Studien zeigten, dass das bäuerliche Umfeld als Modell zur Überprüfung der Hygiene-Hypothese optimal geeignet ist. Außereuropäische Studien konnten mehrfach bestätigen, dass Kinder die in ländlichen Gegenden auf Bauernhöfen, in anderen Regionen der Welt aufwachsen ebenfalls weniger häufig an Allergie oder Asthma erkranken. Man spricht zusammenfassend von einem protektiven „Bauernhof-Effekt“. Es konnten bisher speziell zwei für den Bauernhofeffekt verantwortliche Faktoren identifiziert werden. Obwohl die genauen Mechanismen dieser Schutzvermittlung mit Hilfe von epidemiologischen Studien nicht untersucht werden können, gibt es dennoch erste Hinweise, dass die Route der Exposition durch Inhalation oder durch Aufnahme über den Gastrointestinaltrakt (von Mutius E and Vercelli, 2010) sowie der Zeitpunkt der Bauernhofexposition (Riedler J et al., 2001; Ege MJ et al., 2006) von zentraler Bedeutung sein könnten. Um diese Expositionen genauer charakterisieren zu können, wurde die Geburtskohortenstudie PASTURE (*Protection against Allergy – Study in Rural Enviroments*) in ländlichen Regionen in Deutschland, Österreich,

Frankreich, Finnland und der Schweiz initiiert. Für diese Studie wurden mehr als 500 schwangere Bauernfrauen und 500 Nichtbauernfrauen rekrutiert. Die Kinder dieser Mütter werden seit 2002 prospektiv bis zum sechsten Lebensjahr begleitet (von Mutius E and Schmid S, 2006).

Eine besondere Rolle wird dem Konsum von bauernhofeigener, unbehandelter Kuhmilch zugeschrieben. Fünf epidemiologische Studien konnten unabhängig voneinander einen protektiven Effekt des Milchkonsums auf die Entwicklung von Asthma, Heuschnupfen, allergischen Sensibilisierung und Atopischer Dermatitis nachweisen (Riedler J et al., 2001; Wickens K et al., 2002; Perkin MR and Strachan DP, 2006b; Ege MJ et al., 2007; Waser M et al., 2007; Pfefferle PI et al., 2010).

1.2.3 Protektive Wirkung von Kuhmilch auf allergische Erkrankungen und Asthma

Bereits seit sechs Jahrhunderten sind Milch und -produkte verschiedener Spezies ein wichtiger Bestandteil der täglichen Ernährung. Heute versteht man unter der Handelsware Milch nahezu ausschließlich Kuhmilch (Gerbault et al., 2011). Die Bezeichnung Milch bezieht sich daher in den folgenden Abschnitten stets auf Kuhmilch. Im Vergleich zu vorherigen Generationen werden Milch und die daraus entstehenden Produkte heutzutage nur noch selten frisch und direkt nach der Milchsammlung verzehrt. Die Milchproduktion findet verstärkt im industriellen Maßstab statt. Die dabei durchgeführten Prozessierungsschritte dienen der Verlängerung der Haltbarkeit, sodass der Konsum frischer Milchprodukte nicht mehr zwingend notwendig ist. Der Verzehr von frischer, unbehandelter Milch beschränkt sich daher in der heutigen Zeit meist auf extensiv betriebene Landwirtschaftsbetriebe. Zusätzlich dürfen in Deutschland nur rund 50 streng kontrollierte Höfe Vorzugsmilch bzw. unbehandelte Rohmilch direkt an den Endverbraucher abgeben (Quelle: BVDM; Bundesverband der Vorzugsmilcherzeuger und Direktvermarkter für Milch und Milchprodukte). Dieses Ernährungsverhalten spiegelt sich auch im Verzehr anderer Produkte wie frischem Gemüse wieder (Seaton et al., 1994; Devereux G, 2006).

Die Zusammensetzung der Milch ist nicht konstant und schwankt sowohl innerhalb der Tierart als auch während der Laktation. Die Komposition der Milchbestandteile wird ebenfalls durch die Haltung der Milchkühe beeinflusst. Diese ist wiederum abhängig von der Bewirtschaftung der Milhhöfe bzw. Bauernhöfe (Töpel, 2004). Prinzipiell unterscheidet man zwischen der extensiven und intensiven Landwirtschaft: Während es sich bei der extensiven Landwirtschaft

um die traditionelle, bioorganische und ökologische Bewirtschaftung der Höfe mit Weidenhaltung und Fütterung mit frischen Gras oder Heu handelt, spricht man bei der intensiven Bewirtschaftung von Massentierhaltung ohne Landnutzung und überwiegenden Fütterung der Tiere mit Silage oder Kraftfutter. Daher ist es üblich, die Schwankungsbreite der einzelnen Milchbestandteile anzugeben (Tabelle 1). Der Hauptanteil der Milch besteht aus Wasser, dieser fungiert maßgeblich als Lösungs- bzw. Dispersionsmittel. Weitere bedeutende Makrobestandteile sind die Fette, Proteine und Kohlenhydrate. Die Milchfette umfassen jegliche in der Milch vorhanden Lipide. Der Massenanteil der Fette schwankt stark je nach Rinderrasse und Fütterungsbedingungen (Kraft et al., 2003). Den größten Anteil der Milchproteine bilden die Caseine (82 %), während sich der restliche Teil aus Molkeproteinen wie β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin, BSA, Immunglobulinen und Lactoferrin zusammensetzt (Morr and Ha, 1993). Laktose stellt das charakteristische Kohlenhydrat der Milch dar, andere Kohlenhydrate wie Glukose und Galaktose treten in sehr geringen Mengen auf. Die Mikrobestandteile der Milch sind niedermolekulare Substanzen wie Diacetyl, Aminosäuren sowie Ketone und Spurenelemente wie Eisen, Mangan und Enzyme. Diese Bestandteile beeinflussen Geschmack, ernährungsphysiologischen Wert und die Stabilität der Milch.

Tabelle 1: Milchbestandteile modifiziert nach (Jensen, 1995)

Bestandteile	Anteil [%]
Wasser	86,0-88,0
Lipide	3,0-6,0
Proteine	3,2-3,6
Kohlenhydrate	4,8-5,0
niedermolekulare Substanzen	1,0-1,5
Spurenelemente	0,3-0,7
Vitamine	0,2-0,5

Milch und ihre Inhaltstoffe sind vom Melken bis zum fertigen Produkt im Supermarkt diversen mechanischen und thermischen Einflüssen sowie biochemischen Reaktionen ausgesetzt, die sowohl den Charakter der Milchinhaltstoffe als auch der Rohmilch selbst verändern können. Zusätzlich enthält die Milch eine charakteristische Begleitflora, die durch mikrobielle Stoffwechselforgänge die Milch ebenfalls verändern kann. Um diese für den Menschen meist schädlichen mikrobiellen Veränderungen zu unterbinden wird die Milch industriell verarbeitet, um die Haltbarkeit und damit die Verträglichkeit zu verlängern. Diese Verarbeitung großer Mengen von Milch bringt insbesondere, durch die beim Einstellen des Fettgehalts und der Homogenisierung entstehende, unvermeidliche mechanische Belastung für die einzelnen

Milchbestandteile mit, die eine Veränderung der Milchbestandteile wie Casein- oder Fettmizellen nach sich ziehen können. Weitaus stärkere Veränderungen der Rohmilch bewirken thermische Energieeinwirkungen. Die leicht verderbliche und mikrobiologisch anfällige Milch ist einer gesetzlichen vorgeschriebenen Temperaturbehandlung (Pasteurisierung) zu unterziehen. Die Pasteurisierung dient der Abtötung aller pathogenen Keime und die anschließende Kühlung zur Verlängerung der Haltbarkeit. Am Ende des Verarbeitungsprozess entsteht im Vergleich zum Ausgangsprodukt der frischen Rohmilch ein stark verändertes Endprodukt, welches den gesetzlichen Sicherheitsbestimmungen entsprechen muss.

Vom Konsum von Rohmilch, speziell im frühen Kindesalter, wird aufgrund einer möglichen Belastung mit humanpathogenen Keimen, wie z.B. enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), *Salmonella enteritidis*, *Salmonella thyphimurium* und *Listeria monocytogenes* weitgehend abgeraten (Allerberger et al., 2003; Oliver et al., 2009). Dennoch konsumieren gerade Milchbäuerinnen von extensiv bewirtschafteten Höfen auch während der Schwangerschaft sowie deren Kleinkinder nach wie vor nicht abgekochte Rohmilch. Im Rahmen der ALEX- und der PARSIFAL-Studie konnte erstmalig gezeigt werden, dass der Konsum von bauernhofeigener nicht abgekochter Milch, während des ersten Lebensjahres einen protektiven Effekt auf die Entwicklung von Asthma, Heuschnupfen und atopischer Sensibilisierung hat (Riedler J et al., 2001; Waser M et al., 2007). Weitere epidemiologische Studien in ländlichen Regionen auf Kreta (Barnes et al., 2001), in England (Perkin MR and Strachan DP, 2006b) sowie in Neuseeland (Wickens K et al., 2002) konnten die inversen Assoziationen zwischen dem Konsum von Bauernhofmilch oder -produkten und Allergie, Asthma oder atopischen Ekzem außerhalb alpiner Regionen bestätigten. In der momentan laufend prospektiven Geburtskohortenstudie PASTURE zeigten Pfefferle et al. (Pfefferle PI et al., 2010), dass der Konsum von bauernhofeigener Butter und Milch während der Schwangerschaft die Produktion von IFN- γ und TNF- α im Nabelschnurblut der Neugeborenen erhöht. Diese frühe Prägung des Neugeborenen durch das Th1-Milieu wird häufig als Ursache für das verminderte Risiko, an Atopie oder Asthma zu erkranken, diskutiert (Macaubas et al., 2003). Die Gesamtheit aller Studien zeigte, dass der protektive Effekt des Konsums nicht abgekochter Bauernhofmilch unabhängig von anderen Bauernhofexpositionen ist. Auf der Basis dieser Erkenntnisse gilt es nun, die möglichen protektiven Fraktionen der Milch und den Einfluss der industriellen Prozessierung der Milch auf diesen Schutz zu untersuchen.

Einer der Hauptunterschiede zwischen Rohmilch und Molkereimilch¹ ist die Anzahl der lebenden Mikroorganismen (Perkin MR and Strachan DP, 2006a). Daher liegt es nahe, die mikrobiellen Komponenten der unbehandelten Milch als mögliche Quelle der allergeoprotektiven Schutzvermittlung anzunehmen. Die unterschiedliche mikrobielle Zusammensetzung und die erhöhten Keimzahlen in der Rohmilch gegenüber pasteurisierter Milch konnten bereits nachgewiesen werden. Suhren et al. zeigten, dass der Anteil von Lipopolysacchariden (LPS) in Rohmilch deutlich höher ist als in pasteurisierter Milch (Suhren G, 1986). Die Beobachtung konnte jedoch nicht durch die in der PASTURE-Studie durchgeführte Endotoxin-Bestimmung in Bauernhofmilch und industriell hergestellter Milch nicht bestätigt werden, sondern lieferte entgegengesetzte Ergebnisse (Gehring et al., 2008).

Die Milchproteine stellen eine weitere Fraktion der Milch dar, die für die allergeoprotektive Wirkung verantwortlich sein könnte. Bis heute sind jedoch noch keine Studien über präventive Supplementation von Molkeproteinen und deren Auswirkungen auf allergische Erkrankungen wie Asthma bekannt. Im Rahmen einer experimentellen *in vivo*-Studie in Ratten konnte allerdings die Bedeutung von Molkeproteinen in chronisch-entzündlichen Darmentzündung (CED) bestätigt werden. Dabei wurden die Ratten durch die Supplementation mit Molkeproteinen aus Käseherstellung vor der Entwicklung einer Darmentzündung geschützt (Sprong et al., 2010). Zusätzlich konnte in einer humanen Studie ein Benefit für Patienten mit zystischer Fibrose beobachtet werden. In dieser Studie führte die Supplementation von Molkeproteinen zur Reduzierung der lokalen Entzündung (Lands et al., 2010).

Weiteren Milchbestandteilen wie den Kohlenhydraten, Vitaminen und niedermolekularen Substanzen wird nach dem heutigen Wissenstand keine allergeoprotektive Rolle zugesprochen, da bisher noch keine Studien zur Überprüfung des präventiven Effekt durch deren Supplementation durchgeführt wurden.

Die letzte potenzielle allergeoprotektive Milchfraktion sind Milchfette. Milchfette werden mit einem reduzierten Risiko, an Allergie und Asthma zu erkranken, in Verbindung gebracht (Wijga et al., 2003; Waser M et al., 2007). Im Jahr 1997 postulierten Black und Sharpe, dass der Anstieg der Asthma- und Allergieprävalenz die Konsequenz einer erhöhten Omega-6-Fettsäureaufnahme sowie des zurückgegangenen Konsums von Omega-3-Fettsäuren sei (Black

¹ In der vorliegenden Arbeit ist die Bezeichnung „Molkereimilch“ als industriell hergestellte und prozessierte Milch definiert.

and Sharpe, 1997; Simopoulos, 2009). Das daraus resultierende erhöhte Verhältnis der diätetischen Omega-6-Fettsäuren und Omega-3-Fettsäuren könnte möglicherweise Einfluss auf die Zusammensetzung der Zellenmembranen proinflammatorischer und anderer Zellen nehmen und diese verändern. Black und Sharpe argumentierten, dass Omega-3-Fettsäuren die Prostaglandinsynthese durch kompetitive Hemmung der Cyclooxygenase-2 (COX-2) regulieren und damit die allergische Sensibilisierung verhindern. Allerdings zeigten die sich widersprechenden Ergebnisse verschiedener Studien zu Lipiden und Asthma, dass die zugrunde liegenden Mechanismen offenbar viel komplexer sind, als von Black und Sharpe angenommen wurde (Woods et al., 2004; Bolte et al., 2006; Almqvist et al., 2007). Jüngste Beobachtungen deuten daraufhin, dass gerade in extensiv erzeugter Milch und -produkten deutlich mehr Omega-3-Fettsäuren als in Molkereimilch vorhanden sind (Hauswirth et al., 2004; Collomb MB et al., 2008; Prandini et al., 2009). Diese Veränderungen führen gleichzeitig zu einem geringeren Omega-6/3-Verhältniss in der Milch von extensiv betriebenen Bauernhöfen. Hervorzuheben sind zusätzlich unterschiedliche Mengen von konjugierten Linolsäuren (CLA) in Milch von extensiv betriebenen Höfen, deren Kühe hauptsächlich auf der Weide gehalten werden und mit frischem Gras anstelle von Silage gefüttert werden (Collomb et al., 2001; Kraft et al., 2003). Des Weiteren ist allgemein bekannt, dass der CLA-Gehalt in der Milch auch von der geographischen Höhe (Altitude) abhängt, da bestimmte Pflanzen die als Quellen spezifischen Fettsäuren und deren Vorläufern bekannt sind, erst vermehrt in höheren alpinen Regionen vorkommen (Collomb et al., 2001; Kraft et al., 2003; Leiber et al., 2005). Gleichermäßen sind auch saisonale Unterschiede der CLA-Konzentrationen in Milch (De La Fuente LF et al., 2009) und Käse (Abilleira et al., 2009) sowie der Einfluss verschiedener Spezies und Rassen auf CLA-Produktion belegt (Jahreis, 1999).

Zahlreiche Hinweise aus *in vivo* Studien veranschaulichten die Eigenschaft von CLA die Immunantwort durch Veränderungen der Synthese von Mediatoren wie Eicosanoiden, Zytokinen und Immunglobulinen zu modulieren (O'Shea et al., 2004; Bhattacharya et al., 2006). Sowohl im Mausmodell der atopischen Dermatitis, als auch im Modell der entzündlichen Atemwegserkrankungen führte die CLA-Supplementation der Diät im Vergleich zur Kontrolldiät zur signifikanten Verbesserung der Symptome (Jaudszus et al., 2008; Sun et al., 2011). Folglich könnte die Fettsäurezusammensetzung von Bauernhofmilch von zentraler Bedeutung für den protektiven Effekt des Milchkonsums sein. Wie bereits zuvor erwähnt, wird das Fettsäuremuster der Milch durch die Art des Bauernhofmanagements, wie z.B. durch die Tierhaltung und Fütterungsstrategien beeinflusst. Demzufolge stellen diese Fettsäureprofile im

Hinblick auf die Allergie- und Asthmaprvention einen vielversprechenden Forschungsansatz dar.

1.3 Fettsäuren

Fette, auch Lipide genannt, sind neben Kohlenhydraten und Proteinen ein Hauptbestandteil der täglichen Ernährung. Nahrungsfette enthalten als Hauptkomponenten Fettsäuren, die in der Regel in Form von Triglyceriden (TG), Phospholipiden (PL) oder Cholesterolestern (CE) gebunden sind. Lipide können aus etwa 50 verschiedenen Fettsäuren zusammengesetzt sein, deren Kohlenstoffatomanzahl (C-Atome) zwischen vier und 36 variiert. Die häufigsten Nahrungsfettsäuren haben eine Kettenlänge zwischen acht und 22 C-Atomen. Alle in der Natur vorkommenden Fettsäuren enthalten eine gerade Anzahl an Kohlenstoffatomen. Diese Besonderheit ist durch die Biosynthese aus C₂-Einheiten bedingt. Fettsäuren werden nach ihrer Kettenlänge in verschiedene Gruppen eingeteilt: kurzkettig < 6 C-, mittelkettig 6-10 C- und langkettig > 10 C-Atome. Des Weiteren variieren Fettsäuren auch im Grad ihrer Wasserstoffsättigung (gesättigt, einfach bzw. mehrfach ungesättigt). Ungesättigte Fettsäuren kommen in der Natur fast ausschließlich in der cis-Form vor. Diese Molekülform ist im Gegensatz zu der starren trans-Form deutlich flexibler. Gemeinsames Strukturmerkmal aller Fettsäuren ist eine Carboxylgruppe und eine Methylgruppe an den jeweiligen Enden der Kohlenstoffatomkette. Zur Kennzeichnung dient die chemische Bezeichnung, meist ein Trivialname oder eine Kurzform, die auch Doppelbindungen bzw. den Ungesättigtheitsgrad berücksichtigt (Ratnayake and Galli, 2009).

Insbesondere in der biomedizinischen Literatur hat sich eine weitere Klassifizierung für die ungesättigten Fettsäuren durchgesetzt, die sich an den biochemischen und strukturellen Eigenschaften orientiert. In diesem Zusammenhang werden vorwiegend die Gruppen der Omega-3 und -6 Fettsäuren aufgeführt. Dabei wird vom Methylende (Omega-(ω)-Ende) ausgehend gezählt und es wird nur die Stellung der ersten Doppelbindung im Bezug auf das ω -Ende angegeben. Zur Vereinfachung wird heutzutage häufig anstelle von „ ω “ die Bezeichnung „n“ verwendet. Die essentiellen Vorläufer (*engl.: presursor*) der Omega-6 und -3 Fettsäuren sind Linolsäuren (C18:2 n6, LA) bzw. α -Linolensäuren (C18:3 n3, α -LA). Diese biologischen Vorstufen müssen vom Menschen über die Ernährung aufgenommen werden, da diese nicht *de novo* gebildet werden können (Calder and Grimble, 2002). Heute ist bekannt, dass für den Menschen die n-3 und n-6 Fettsäuren für Wachstum und Entwicklung essentiell sind. Insbesondere die n-3 Fettsäuren spielen eine wichtige Rolle in der Prävention und Therapie verschiedener Erkrankungen, wie z.B. des kardiovaskulären Systems (Calder, 2004b;

Simopoulos, 2008), Arteriosklerose (Das, 2005), allergische Erkrankungen (Anandan et al., 2009; Galli and Calder, 2009) und Entzündungen (Dooper et al., 2003; Chen et al., 2005).

1.3.1 Konjugierte Linolsäuren (CLA)

Konjugierte Linolsäuren (CLA) sind geometrische und Positionsisomere der Linolsäure (C18:2 n6, LA), die durch konjugierte Doppelbindungen in cis/cis-, trans/trans-, cis/trans- und trans/cis-Konfiguration charakterisiert sind. Inzwischen sind 28 in der Natur vorkommende CLA-Isomere bekannt. Die zwei häufigsten und bedeutendsten Isomere sind die Rumensäure (C18:2 c9, t11, RA) und C18:2 t10, c12-CLA (Abbildung 5) (Eder and Ringseis, 2010).

Mikroorganismen im Pansen von Wiederkäuern sind in der Lage CLAs aus den ungesättigten Fettsäuren des Futters zu bilden. Während der mikrobiellen Biohydrierung (*Butyrivibrio fibrisolvens*) entstehen CLAs aus LA und α -LA durch Isomerisierung, Hydrogenierung und Desaturierung. Ebenfalls können CLAs im Milchdrüsen Gewebe durch Δ^9 -Desaturierung der trans-Vaccensäure (C18:1 t11, t-VA) gebildet werden (Kepler and Tove, 1967; Griinari et al., 2000).

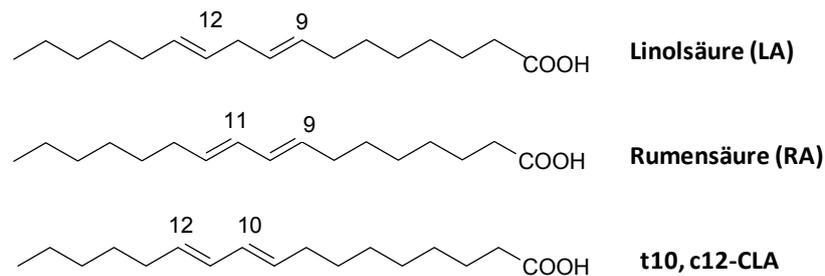


Abbildung 5: Strukturformel von Linolsäure (LA), Rumensäure (RA) und t10, c12-CLA

Zahlreiche Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene sowie in verschiedenen Tiermodellen (Maus, Geflügel und Schwein) haben das wissenschaftliche Interesse durch überwiegend positive physiologische Wirkungen von CLAs geweckt. Neueste Forschungen ergaben vermehrt Anzeichen für anti-karzinogene und immun-modulatorische Eigenschaften der CLAs (Ip et al., 1991; Belury, 2002; O'Shea et al., 2004). Darüber hinaus spielen CLAs möglicherweise ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Prävention unterschiedlicher Erkrankungen wie z.B. die des kardiovaskulären Systems (Nicolosi et al., 1997; Kritchevsky et al., 2000).

Natürliche Quellen für CLAs sind Produkte von Wiederkäuern, vor allem Milch und Milchprodukte. Bekanntermaßen stammen über die Hälfte der durch die Ernährung zugeführten CLAs aus Produkten wie Milch, Butter, Käse oder Joghurt. Es ist jedoch zu beachten, dass der CLA-Gehalt der Milch, wie bereits in Kapitel 1.2.4 erwähnt, einer beträchtlichen

Variation in Abhängigkeit verschiedener Faktoren unterliegt. Fleisch von Wiederkäuern ist demnach analog zum Milchfett ebenfalls reich an CLAs. Schweine- und Geflügelfleisch enthalten hingegen deutlich geringere Mengen an CLAs (Fritsche and Steinhart, 1998).

1.3.2 Immunmodulation durch CLA

Epidemiologische Studien der letzten Jahrzehnte lieferten eine deutliche Evidenz für die protektive Rolle von Bauernmilch und damit assoziiert das reduzierte Risiko für allergische Erkrankungen (Riedler J et al., 2001; Alfven et al., 2006; Waser M et al., 2007). Möglicherweise beruht dieser Effekt auf der Tatsache, dass Milch die Hauptquelle für CLAs darstellt. Um die molekular-biologischen Hintergründe der immun-modulatorischen Eigenschaften von CLAs besser zu verstehen, wurden zahlreiche *in vitro*- sowie *in vivo*-Studien durchgeführt.

In vivo-Studien in verschiedenen Tiermodellen konnten den Einfluss von CLAs auf die Produktion von Eicosanoiden nachweisen (Sugano et al., 1998; Whigham et al., 2001; Whigham et al., 2002). Bekanntlich dienen mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) als Vorläufer der Synthese von Eicosanoiden. Die Fettsäuren werden dafür durch das Enzym Phospholipase A₂ (PLA₂) aus den Phospholipiden der Zellmembranen freigesetzt und in Prostaglandine, Leukotriene, Thromboxane umgewandelt (Harizi et al., 2008). Ein möglicher Ansatz der Effekte von CLAs könnte die Inhibition der Enzymaktivität von Cyclooxygenase (COX) oder Lipoxygenase (LOX) sein (Whigham et al., 2002). Die Inhibition dieser Schlüsselenzyme führt daher zur verminderten Synthese von Eicosanoiden. Ferner konkurrieren CLAs mit anderen ungesättigten Fettsäuren um Phospholipase-, Cyclooxygenase- und Lipase-Enzymfamilien und werden in Phospholipide eingebaut (Belury and Kempa-Steczko, 1997; Banni et al., 1999). Folglich ist es naheliegend, dass auch CLAs als Vorläufer für Eicosanoidprodukte in Frage kommen oder anderweitig die Eicosanoidsynthese modifizieren.

Ein weiterer potentieller Mechanismus der CLAs ist die Regulation der Genexpression durch direkte Interaktionen mit Kernrezeptoren oder indirekt durch Regulation der Signaltransduktionswege (Jump, 2002). Nach heutigem Wissensstand kann die Aktivierung von Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) (Isoformen α , β und γ) anti-inflammatorische Mechanismen hervorrufen (Vanden Berghe et al., 2003). Moya-Camarena et al. zeigten, dass CLA-Isomere, allen voran C18:2 c9, t11 hochaffine Liganden und Agonisten von PPAR- γ sind und auf diese Weise zur Regulation der lokalen Immunantwort beitragen (Moya-Camarena et al., 1999).

Anhand von weiteren *in vitro* Studien mit Bronchialepithelzellen und *in vivo Studien* im murinen Model der akuten Atemwegsentszündung konnte eine anti-inflammatorische Wirkung der Rumensäure (C18:2 c9, t11) nachgewiesen werden (Jaudszus et al., 2008). Diese Studie bestätigte ebenfalls, dass die Rumensäure ein hochaffiner Ligand des PPAR- γ ist und dadurch die Gentranskription sowie die Immunantwort in den Atemwegen regulieren kann. Ebenso konnten Turpeinen et al. die Supprimierung der allergischen Antwort durch CLAs in Pollenallergikern nachweisen (Turpeinen et al., 2008).

Die Fettkomposition der Zellmembranen bestimmt die Stabilität, Fluidität und Struktur der Zellmembranen sowie die Mobilität und Funktion von Membran-gebundenen Rezeptoren, Transportproteinen und Enzymen (Stubbs and Smith, 1984; Calder, 2003; Russo, 2009). Der Einbau von CLAs in die Phospholipide der Zellmembranen unterschiedlicher Zellen kann diese Eigenschaften wesentlich verändern und damit ggf. auch die Immunantwort modulieren. Von Interesse könnten in diesem Zusammenhang ebenfalls bestimmte Mikrodomänen der Plasmamembranen sein. Diese Domänen werden als *Lipid rafts* bezeichnet und sind durch erhöhte Menge an Sphingolipiden und Cholesterol charakterisiert. Erste Studien zeigen, dass die Fettsäureverteilung in diesen Domänen Einfluss auf die immunologische Signaltransduktion hat (Stulnig and Zeyda, 2004).

Zur Aufklärung der immun-modulatorischen Eigenschaften der CLAs und deren zu Grunde liegenden Mechanismen wird häufig die Analyse der Fettsäureprofile der Zellmembranen unterschiedlicher Immunzellen und anderem Gewebe durchgeführt. Im Großteil der oben genannten sowie weiteren Studien wird dabei auf instrumentelle analytische Verfahren wie die Gaschromatographie (GC) oder die Silberionen-HPLC (Ag-HPLC) zugegriffen.

1.3.3 Fettsäureanalytik

Die am weitesten verbreitete Methode zur Analyse von Fettsäuren in Nahrungsmitteln und biologischen Proben ist die mit einem Flammenionisationsdetektor (GC-FID) gekoppelte Gaschromatographie. Daneben kommt auch die mit einem Massenspektrometer (MS) gekoppelte GC zum Einsatz. Diese Methodik wird jedoch hauptsächlich zur qualitativen Charakterisierung von Fettsäuremethylestern (FAME) und seltener zur Quantifizierung von Fettsäuren (Dodds et al., 2005) verwendet. Für die Analyse von bestimmten Fettsäureisomeren wie z. B. die CLAs wird oftmals zur genaueren Charakterisierung auf spezielle Methoden von die Ag-HPLC zurückgegriffen (Kramer et al., 2004).

Der komplette Analysengang beinhaltet mehrere Schritte der Probenaufbereitung und der anschließenden Messung mittels GC-FID. Die Probenaufbereitung umfasst die Isolation der Lipide mit anschließender Derivatisierung zu Fettsäuremethylestern (Eder, 1995). Die GC-FID ist bestens für die qualitative und die quantitative Bestimmung von PUFAs und CLAs geeignet. Zur Trennung von PUFAs, insbesondere von CLAs, wird die Verwendung langer hochpolarer Cyanopropyl-Siloxan-Kapillarsäulen (CP Sil-88, BPX70, SP2560) empfohlen. Diese Säulen eignen sich aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften und hohen Selektivität für die Separation der verschiedenen Isomere besonders gut (Kramer JK et al., 2002).

Für die Quantifizierung der FAME werden meistens interne Standards (ISTD) und theoretische Korrekturfaktoren (TRF, *theoretical response factors*) (Schreiner M and Hulan HW, 2004) verwendet. Ein geeigneter ISTD sollte folgende Anforderungen erfüllen. Die verwendete Substanz sollte nicht in der zu analysierenden Proben vorhanden sein und sollte ähnliche Eigenschaften wie die zu bestimmenden Analyten besitzen (Palmquist and Jenkins, 2003).

1.4 Hypothesen und Aufgabenstellung der Arbeit

Allergien im Allgemeinen und Asthma bronchiale im Speziellen, haben sich zu einem weltweiten Gesundheitsproblem entwickelt (Masoli M et al., 2004). Die Symptome der allergischen Erkrankungen können heutzutage zwar medikamentös stark gelindert, jedoch nicht geheilt werden. Die Entstehung von allergischen Erkrankungen erfolgt bereits im frühen Lebensalter. Es gibt zunehmende Hinweise, dass exogene Faktoren, die das Auftreten dieser Erkrankungen beeinflussen, ihren Effekt auf die Krankheiten bereits im frühen und vorgeburtlichen Lebensstadium ausüben (Alfven et al., 2006). Das interdisziplinäre EU-geförderte Efraim-Projekt (Mechanisms of Early Protective Exposures on Allergy Development) untersucht die im frühen Lebensalter auf die Entwicklung der Allergien protektiv-wirkenden Faktoren in einer Kohortenstudie, in traditionell wirtschaftenden Bauern- und in Nichtbauernfamilien, die im ländlichen Umfeld leben.

Ein Teilprojekt der Studie hat die Charakterisierung von n3-/n6- mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) mit immun-modulatorischer Wirkung zum Ziel. In vorangegangenen Studien konnten starke Assoziationen zwischen Bauernmilchkonsum und allergie-protektiven Effekten gezeigt werden (Riedler J et al., 2001; Wickens K et al., 2002; Perkin MR and Strachan DP, 2006b; Ege MJ et al., 2007; Waser M et al., 2007; Pfefferle PI et al., 2010). Weiterhin konnte in Studien gezeigt werden, dass alpine Bauernhofmilch einen hohen Gehalt an CLAs aufweist und damit einen Großteil der täglichen CLA-Aufnahme liefert (Kraft et al., 2003; Collomb et al.,

2008). Auf diesen Daten aufbauend wurde folgende Hypothese aufgestellt, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte:

„Konjugierte Linolsäuren (CLA) aus der Bauernhofkuhmilch besitzen immunmodulatorische Eigenschaften und deren Konsum kann daher die Entwicklung von allergischen Erkrankungen bzw. die atopische Sensibilisierung beeinflussen.“

Aus dieser Hypothese leiteten sich folgende Fragestellungen für diese Arbeit ab:

- 1.) Hat der Konsum von Bauernhofmilch einen protektiven Einfluss auf die Entwicklung von allergischen Erkrankungen?
- 2.) Unterscheiden sich die Fettsäureprofile der Bauernhofmilch von der in industriell hergestellter Milch?
- 3.) Welche Faktoren bestimmen den CLA-Gehalt von Kuhmilch?
- 4.) Unterscheiden sich die Fettsäuren bzw. der CLA-Gehalt im Serum und in den Erythrozytenmembranen von Kindern aus Bauernfamilien und von Nicht-Bauernfamilien?
- 5.) Korreliert die Menge der durch die Milch konsumierten CLAs mit der in den im Serum vorhanden CLAs?
- 6.) Können erhöhte Serum- bzw. Milch-CLAs mit der verminderten Häufigkeit atopischer Sensibilisierung oder verschiedener allergischer Erkrankungen wie Asthma bronchiale, Atopische Dermatitis oder Heuschnupfen assoziiert werden?
- 7.) Kann der protektive Effekt des Konsums von Bauernhofmilch im murinen Modell der akuten allergischen Atemwegsentzündung nachgewiesen werden?

Zur Beantwortung dieser Forschungsfragen sollte im Rahmen dieser Arbeit eine geeignete Methode zur Bestimmung der Fettsäuremuster in Serum, Erythrozytenmembranen und Kuhmilch etabliert werden und die in der PASTURE-Studie gesammelten Proben analysiert und statistisch ausgewertet werden. Des Weiteren sollen die Ergebnisse aus den epidemiologischen Untersuchungen im Rahmen der PASTURE/EFRAIM-Studie in geeignetes *in vivo*-Modell translatiert werden und in einem „*Proof of concept*“-Versuch der Einfluss der Milchfettsäuren und des Milchkonsums auf Sensibilisierung und Ausprägung des allergischen Phänotyps des experimentellen Asthmas im Mausmodell untersucht werden.

2 Materialien und Methoden

Im folgenden Teil werden die für die Überprüfung der Arbeitshypothese und die Beantwortung der daraus abgeleiteten Fragestellungen notwendigen Methoden und verwendeten Materialien aufgeführt. Zu Beginn der Arbeit sollte eine neue gaschromatographische Analyseverfahren zur Bestimmung der Fettsäuremuster in verschiedenen humanen und biologischen Proben etabliert und evaluiert werden. Die für Methodenentwicklung und -validierung verwendeten Methoden werden im ersten Abschnitt dieses Kapitels beschrieben.

Im zweiten Teil des Material- und Methodenteils wird das Design der PASTURE/Efraim-Studie und die für den epidemiologischen Teil dieser Arbeit benötigten Analyseverfahren und Methoden vorgestellt.

Im dritten Abschnitt dieser Arbeit sollten die Ergebnisse der epidemiologischen Untersuchungen im Rahmen eines „*Proof of concepts*“ im *in vivo*-Modell der akuten allergischen murinen Atemwegsentzündung untersucht werden. Die dafür benötigten molekularbiologischen und biomedizinischen Analysemethoden werden im dritten Teil dieses Kapitels aufgeführt.

2.1 Methodenentwicklung

2.1.1 Lipidextraktion

Die ausgewählten Extraktionsmethoden sollen neben den freien auch die Lipide erfassen, die an Proteine gebunden sind. Eine schonende Extraktion bei Raumtemperatur ist von zentraler Bedeutung, da langkettige mehrfache ungesättigte Fettsäuren (z.B. CLA und PUFA) konjugierte Doppelbindungssysteme besitzen, die durch starke Temperaturerhöhung zur Autooxidation neigen (Iverson JL and Sheppard AJ, 1975; Christie and Han, 2010). Zur weiteren Stabilisierung gegen oxidative Prozesse wurde das Antioxidans tert-Butylhydroxytoluol (BHT) zugesetzt.

Chemikalien:

2-Propanol (HPLC grade)	Fischer Scientific, Schwerte, D
C18:0 iso-Standard	Larodan, Malmö, SWE
Chloroform (HPLC grade)	Fischer Scientific, Schwerte, D
Methanol (HPLC grade)	Fischer Scientific, Schwerte, D
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Natriumsulfat (NaSO ₄)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

n-Hexan (HPLC grade)	Fischer Scientific, Schwerte, D
Tert-Butylhydroxytoluol (BHT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

Materialien:

15 ml-Pyrexröhrchen mit Schraubverschluss	Corning, Amsterdam, NL
Glaspasteurpipetten	Kobe, Marburg, D
IKA Genius 3, Vortex	IKA, Staufen, D
Deckel mit Teflondichtungen	Corning, Amsterdam, NL
Zentrifuge Megafuge 3.0R	Heraeus, Osterode, D

Humanes und murines Serum

Die Fettextraktion aus humanen und murinen Serum erfolgte nach der Methode von Hara und Radin (Hara A and Radin NS, 1978). Hierbei wurden 100 µl aufgetautes Serum in ein 15 ml-Pyrex-Glasröhrchen mit Schraubverschluss und Teflondichtung mit 5 ml einer Hexan/Isopropanol-Mischung (3:2 v/v, 2% BHT) versetzt. Dieses Extraktionsreagenz enthält zusätzlich einen internen Standard C18:0 iso (5 µg/ml). Der Ansatz wurde für zwei Minuten auf dem Vortex durchmischt. Nach Zugabe von 3 ml 6,7 % NaSO₄-Lösung wurde dieser erneut geschüttelt. Anschließend wurde er bei 3000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert, die obere Phase mit einer Pasteurpipette abgenommen und durch Zugabe von 1 g NaSO₄ getrocknet. Nach 30 min wurde die obere Phase in ein neues Glasgefäß überführt.

Erythrozyten

Die Extraktion der Fette aus Erythrozytenmembranen erfolgte ebenfalls nach der Methode von Hara & Radin. Dafür wurde 1 ml EDTA-Blut bei 2100 rpm für zehn Minuten zentrifugiert, das Serum verworfen und die Erythrozyten mit 10 ml 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Aqua dest. versetzt und im Ultraschallbad für zehn Minuten aufgeschlossen. Die weitere Extraktion erfolgte analog zur Extraktion der Serumfettsäuren.

Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit Lipide aus tiefgefroren Serumclots extrahiert. Diese Extraktion erfolgte ebenfalls analog zur Extraktion der Serumfettsäuren.

Kuhmilch

Die Probenaufarbeitung der Milchproben erfolgte nach der Methode von Bligh & Dyer (Bligh EG and Dyer WJ, 1959). Die aufgetauten Milchproben wurden zwei Minuten lang Ultraschallwellen ausgesetzt, um die Homogenisierung der Fettmizellen sicherzustellen. Die Extraktion erfolgte in einem 15 ml-Pyrex Glasröhrchen. Im ersten Schritt wurden dafür 2,5 ml

Milch mit 1 ml ISTD C18:0 iso (250 µg/ml) versetzt und 5 ml Methanol und 2,5 ml Chloroform zugegeben. Die daraus resultierende einphasige Lösung wurde für zwei Minuten auf dem Vortex geschüttelt.

Im zweiten Schritt der Extraktion erfolgte durch Zugabe von je 2,5 ml Chloroform und 0,9 % NaCl-Lösung sowie zwei Minuten schütteln auf dem Vortex die Phasentrennung. Zur Ausbildung der vollständigen Phasentrennung wurde der Ansatz bei Raumtemperatur und 3000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die untere Phase, die Chloroformphase, wurde mit einer Pasteurpipette, entnommen.

2.1.2 Methylierungsreaktionen

Die Methylierung ist das am häufigsten angewandte Derivatisierungsverfahren in der Fettsäureanalytik. In der Literatur werden zahlreiche basen- und säurekatalysierte Methylierungsverfahren beschrieben. Mehrere Untersuchungen ergaben, dass säure- wie auch basen-katalysierte Methylierungsverfahren zur Intraisomerisierung von ungesättigten Fettsäuren zugunsten von t,t-konfigurierten Isomeren sowie zu einem Verlust an Dienen durch verstärkte Methoxyartefaktbildung führen können. Diese Problematik spielt insbesondere bei der Methylierung von CLA eine wichtige Rolle (Park SJ et al., 2002; Chen J et al., 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Methylierungsverfahren in verschiedenen biologischen Matrices geprüft und evaluiert. Die nachstehenden beschriebenen Verfahren resultierten aus diesen Untersuchungen.

Die jeweiligen Extrakte wurden im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingeeengt. Die verwendeten Methylierungsmethoden wurden mit Rücksicht auf das verwendete Ausgangsmaterial optimiert.

Chemikalien:

1,1,3,3-Tetramethylguanidin (TMG)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Aqua dest.	
Ethanol (HPLC grade)	Fischer Scientific, Schwerte, D
Kaliumhydroxid (KOH)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Methanol (HPLC grade)	Fischer Scientific, Schwerte, D
n-Hexan (HPLC grade)	Fischer Scientific, Schwerte, D
Natriumhydrogensulfat-Monohydrat (NaHSO ₄ H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

Materialien:

15 ml-Pyrexröhrchen mit Schraubverschluss	Corning, Amsterdam, NL
Verdampfer (Pierce ReactiTherm III)	Thermo Scientific, Rockford, US
Wasserbad	Memmert, Schwabach, D
Zentrifuge Megafuge 3.0R	Heraeus, Osterode, D

Humanes und murines Serum

Serum enthält sowohl freie als auch veresterte Fettsäuren, deshalb erfolgte die Derivatisierung nach Park et al. (Park SJ et al., 2002). Diese Methode beinhaltet zwei aufeinanderfolgende Methylierungsschritte, eine basen-katalysierte Transmethylierung (20% TMG/MeOH) und eine säure-katalysierte Veresterung (1 N H₂SO₄). Die Methylierung der Fettsäuren erfolgte in einem Pyrex-Glasröhrchen mit Schraubverschluss unter H₂O-Ausschluss. Im ersten Schritt wurden die trockenen Extrakte mit 3 ml basischen Transmethylierungsreagenz versetzt und zehn Minuten bei 100°C inkubiert. Im zweiten Schritt wurden 3 ml des sauren Methylierungsreagenz hinzugegeben und der Ansatz für fünf Minuten bei 55°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben wurden die Fettsäuremethylester (FAME) dreimal mit je 3 ml n-Hexan extrahiert, in zwei weiteren Schritten mit 1 M NaOH in 50 % Ethanol (2 x 2 ml) und mit Aqua dest. (3 x 3 ml) gewaschen und anschließend auf ein Endvolumen von 250 µl eingeeengt. Das Konzentrat wurde in Probengefäße überführt, luftdicht verschlossen und bei -80°C bis zur Messung gelagert.

Erythrozyten

Die stickstoffgetrockneten Extrakte wurden mit 3 ml Transmethylierungsreagenz (20% TMG/MeOH) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für zehn Minuten auf 100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die entstandenen FAME mit 3 ml n-Hexan und 1 ml Aqua dest. versetzt, geschüttelt und bis zur Phasentrennung zentrifugiert. Die entstandene Hexanphase wurde abgenommen und auf ein Endvolumen von 250 µl eingeeengt.

Kuhmilch

Die extrahierten Milchfette wurden nach der Methode von Christophersen (Christophersen SW and Glass LR, 1969) transmethylert. Die getrockneten Extrakte wurden in 2 ml n-Hexan überführt und mit 0,3 ml von 2 N KOH/MeOH-Lösung versetzt. Nach fünf Minuten wurde das Gemisch mit 0,5 g NaHSO₄ H₂O neutralisiert und bei 1100 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Die FAME wurden in Probengefäße überführt und bei -80°C bis zur Messung gelagert.

2.1.3 Kapillargaschromatographie-Flammenionisationsdetektion (GC-FID)

Die häufigste verwendete Methode zur Analyse von Fettsäuren in verschiedenen biologischen Matrices ist die Gaschromatographie (GC) gekoppelt mit einem Flammenionisationsdetektor (FID). Zur Trennung von langkettigen Fettsäuren und ihren Isomeren werden lange (100m) hochpolare Cyanopropylsiloxan-Kapillarsäulen empfohlen (Kramer JK et al., 2001).

Die gaschromatographischen Analysen erfolgten am 7890A-System von Agilent gekoppelt an einen Flammenionisationsdetektor (FID), ein 5975C Massenspektrometer (MSD), ein 7683 Split/Splitless-Autosampler und die HP ChemStation Auswertungssoftware (Abbildung 6). Die Trennung der FAME wurde auf einer Kapillarsäule CP-Sil 88 (100 m x 0.25 mm i.d. x 0.2 µm Filmdicke) von Varian Inc. (Mississauga, Kanada) durchgeführt. Um die Analytensäulen vor möglichen Verunreinigungen zu schützen wurde eine Silica-Vorsäule (5m x 0.53 mm i.d.) installiert. Die verwendeten GC-Bedingungen sind im Anhang III dokumentiert.



Abbildung 6: Agilent 7980A-System

Die Identifizierung der FAME erfolgt durch den Vergleich mit Referenzsubstanzen. Die einzelnen Fettsäuren ließen sich anhand der Retentionszeiten oder anhand von Massenspektren zuordnen und damit eindeutig identifizieren. Die Quantifizierung der FAME wurde mit Hilfe eines internen Standards (ISTD), C18:0 iso von Larodan (Malmö, Schweden) und den theoretischen Responsefaktoren beschrieben von Ackman und Sipos (Ackman RG and Sipos JC, 1964) und Schreiner und Hulan (Schreiner M and Hulan HW, 2004) durchgeführt.

Chemikalien:

C18:0 iso Larodan, Malmö, SWE

Materialien:

CP-Sil 88 Säule Varian, Mississauga, C

GC/FID-System 7890A	Agilent, Waldbronn, D
Silica-Vorsäule	Varian, Mississauga, C

2.1.4 Dünnschichtchromatographie (DC)

Mit Hilfe der DC wurde die Effizienz verschiedener Methylierungsverfahren überprüft. Dafür wurde auf vorkonditionierten Kieselgelplatten 50 µl Probe punktförmig aufgetragen. Anschließend wurde die Platte in die Trennkammer gestellt, die als Laufmittel n-Hexan/Diethylether/Eisessig (140 ml/40 ml/6 ml) enthält. Die Laufstrecke beträgt 10 cm (Entwicklungsdauer: ca. 45 min). Nach der Entwicklung der Platten wurden diese getrocknet und mit einem Sprühreagenz (0,2 % 2,7-Dichlorfluorescein in Ethanol) besprüht. Diese bildet mit verschiedenen Lipidfraktionen gefärbte Komplexe, die unter UV-Licht bei 366 nm detektiert werden konnten.

Chemikalien:

2,7-Dichlorfluorescein	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Diethylether	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Eisessig	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ethanol (HPLC grade)	Fischer Scientific, Schwerte, D
n-Hexan (HPLC grade)	Fischer Scientific, Schwerte, D

Materialien:

DC-Platten (10 x 20 cm)	Merck, Darmstadt, D
UV-Lampe (366 nm)	Desaga, Heidelberg, D

2.1.5 Validierungsparameter

Eine fachgerechte Validierung dient dazu sicherzustellen, dass eine analytische Methode für ihre beabsichtigte Anwendung geeignet ist und die an sie gestellten Anforderungen erfüllt. Verschiedene Behörden wie z.B. die amerikanische FDA oder das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) schreiben Richtlinien für die Überprüfung analytischer Methoden vor (Kromidas, 1999). Diese umfassen u. a. die Bestimmung von Selektivität, Wiederfindungsraten, Präzision, Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode zur Bestimmung von Fettsäuremustern in verschiedenen biologischen Substanzen wurde gemäß diesen Richtlinien validiert.

Selektivität

„Selektivität ist die Fähigkeit einer Methode, verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Analyten ohne gegenseitige Störung zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren“ (Kromidas, 1999).

Um diese Eigenschaft der Methode zu überprüfen, wurden die gaschromatographische Parameter soweit optimiert bis die Basislinientrennung aller zu bestimmenden Fettsäuremethylester gewährleistet war.

Wiederfindung

Anhand der Wiederfindungsraten wurde überprüft, ob während der Probenaufarbeitung nennenswerte Substanzverluste auftreten. Damit kann die gesamte Methode auf Selektivität, Richtigkeit und Robustheit überprüft werden.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten im Serum wurde Proben wurden mit drei verschiedenen physiologischen Konzentrationen (35 bis 140 µg/ml) an Palmitinsäure (C16:0) als Vertreter der Neutrallipide sowie 15 bis 60 µg/ml an Arachidonsäure (C20:4 n6) als Vertreter der Phospholipide aufgestockt. Mit Hilfe von linearer Regression basierend auf einer 3-Punktkalibrierkurve konnte das Bestimmtheitsmaß R^2 berechnet werden.

Die Wiederfindung der Fettsäuren in den Kuhmilchproben wurde analog zu der Bestimmung in den Serumproben durchgeführt. Hierbei ist zu beachten, dass die Probe nicht mit Palmitinsäure aufgestockt wurde, sondern mit Stearinsäuren (C18:0) in Konzentrationen von 4 bis 16 mg/ml. Die Konzentrationen der Arachidonsäure (C20:4 n6) betragen 50 bis 200 µ/ml.

In Erythrozyten musste aufgrund des Fehlens einer Nullkontrolle auf die Bestimmung der Wiederfindungsraten verzichtet werden.

Chemikalien:

Arachidonsäuremethylester (C20:4)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Palmitinsäuremethylester (C16:0)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Stearinsäuremethylester (C18:0)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

Präzision

Die Präzision lässt sich in Systempräzision (Messpräzision) und Methodenpräzision unterscheiden. Die Messpräzision beschreibt die Schwankungen, die das Analysengerät selbst

verursacht. Sie wird durch Mehrfachbestimmungen eines Standards ermittelt. Die Methodenpräzision ist ein Maß für die zufällige Streuung der Analysenergebnisse. Sie wird durch eine mehrfache Durchführung der gesamten Analysenmethode, welche neben der Messung auch die Probenvorbereitung berücksichtigt, ermittelt. Die Methodenpräzision wird weiterhin in die Streuung in Serie (Intra-Assay) und die Streuung von Tag zu Tag (Inter-Assay) unterteilen.

Messpräzision

Die Messpräzision wurde mit Hilfe einer zehnfachen Injektion des Standards in den Gaschromatographen ermittelt. Anschließend wurde der Variationskoeffizient (V_k) der zehn Injektionen für zehn zufällig ausgewählte Fettsäuren berechnet.

Methodenpräzision

Die Streuung in Serie (Intra-Assay) wurde durch die Aufarbeitung von zehn Aliquots eines Probenpools unter den gleichen Bedingungen ermittelt. Dafür wurden die Ansätze parallel aufgearbeitet, nacheinander gemessen und der Variationskoeffizient für die 46 Analyten der Probe berechnet.

Die Streuung von Tag zu Tag (Inter-Assay) wurde durch die Aufbereitung und Messung von zehn Aliquots eines Probenpools der jeweiligen biologischen Probe (Serum, Erythrozyten und Milch) innerhalb eines Zeitraums von drei Wochen bestimmt und die Variationskoeffizienten der 46 Analyten berechnet.

Linearität

Linearität ist die Fähigkeit einer Methode innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereichs Ergebnisse zu liefern, die der Konzentration des Analyten direkt proportional sind. Diese Korrelation lässt sich durch eine Kalibrierfunktion, im optimalen Fall durch eine Gerade, beschreiben. Das mathematische Modell, mit dem der Zusammenhang zwischen Messwert und Konzentration am besten beschrieben kann, ist das Lineare Regressionsmodell. Als Methodenlinearität bezeichnet man die Korrelation zwischen Signal und Konzentration nach Durchführung sämtlicher methodischer Schritte. In dieser Arbeit wurde die Linearität des Messsystems und der Fettsäureextraktion aus verschiedenen biologischen Matrices (Serum, Erythrozyten und Kuhmilch) untersucht.

Messlinearität

Die Linearität des Agilent A7890 Systems wurde mit Hilfe einer 7-Punkt-Kalibrierfunktion bestimmt. Für die Bestimmung der Linearität wurde exemplarisch eine Stammlösung aus zwei gesättigten Fettsäuren, C14:0 und C22:0, angesetzt und entsprechend verdünnt (Tabelle 2). Die angesetzten Standardlösungen wurden anschließend im GC/FID-System gemessen und die Peakfläche der jeweiligen Analyten berechnet. Mit Hilfe des Linearen Regressionsmodells konnten die jeweiligen Kalibrierfunktionen und Bestimmtheitsmaße R^2 ermittelt werden.

Tabelle 2: Verdünnungsreihe der C14:0 und C22:0 Stocklösungen

	C14:0 $\mu\text{g/ml}$	C22:0 $\mu\text{g/ml}$
Stammlösung	1005.50	1001.90
Verdünnung 1	756.02	753.31
Verdünnung 2	502.75	500.95
Verdünnung 3	100.55	100.19
Verdünnung 4	50.28	50.10
Verdünnung 5	10.06	10.02
Verdünnung 6	5.03	5.01

Methodenlinearität

Die Linearität der Fettsäureextraktion aus Serum und Erythrozytenmembranen wurde mit Hilfe einer 4-Punkt-Kalibrierung bestimmt. Hara & Radin empfehlen in ihrer Methode für eine optimale Ausbeute ein Verhältnis von 18:1 für Extraktionsreagenz zu Probenmenge (Hara A and Radin NS, 1978). Basierend auf dieser Angabe wurde dieses Verhältnis in vier Schritten auf 12,5:1 verringert, dabei wurde das Volumen des Extraktionsreagenz konstant gehalten und die Probenmenge erhöht. Für jedes Verhältnis wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Anschließend wurden die Determinationskoeffizienten (R^2) von neun der 47 Analyten zufällig ausgewählten Fettsäuren berechnet und die Kalibrierfunktion mittels des Linearen Regressionsmodells erstellt.

Im Fall der Extraktion der Milchfettsäuren nach Bligh & Dyer (Bligh EG and Dyer WJ, 1959) wurde das Verhältnis von Extraktionsreagenz und Proben analog zu den Serum- und Erythrozytenproben in vier Schritten reduziert, die Determinationskoeffizienten und die Kalibrierfunktion bestimmt.

Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweisgrenze (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BG) wurden in dieser Arbeit anhand Signal/Rausch-Verhältnis (SRV) bestimmt (Vial and Jardey, 1999). Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze einer Analysemethode bezeichnet nach DIN 32645 die kleinsten erfassbaren Mengen für den Nachweis und die Quantifizierung bei einer vorgegebenen Richtigkeit und Präzision.

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde aus jeder untersuchten biologischen Matrix eine Probe aufgearbeitet, welche die zu bestimmenden Analyten in einer Konzentration nahe der NWG enthält, und jeweils 10 mal gemessen. Mit Hilfe der HP ChemStation Auswertungssoftware (Agilent Technologie, Waldbronn) wurde das SRV und die Konzentration von Linolsäure (C18:2 n6) in jedem Chromatogramm bestimmt. Als Rauschen wird die Differenz zwischen dem größten und dem kleinsten Messpunkt im Chromatogrammabschnitt in der Nähe des zu beurteilenden Peaks bezeichnet (Kromidas, 2006). Der rechnerische Wert für die NWG und BG wurde mit Hilfe der folgenden mathematischen Formeln berechnet:

$$NWG : \frac{3 \cdot C}{SRV} \quad BG : \frac{10 \cdot C}{SRV}$$

C	= Konzentration der Realprobe
SRV	= Signal/Rausch-Verhältnis
NWG	= Nachweisgrenze
BG	= Bestimmungsgrenze

Stabilitätstests

Um die Stabilität der aufgearbeiteten Proben bei -80°C zu evaluieren wurden sechs identische FAME-Proben vorbereitet, luftdicht mit Plastikdeckel und Septum verschlossen und bei -80°C gelagert. Die Konzentrationen von ausgewählten Fettsäuren über fünf Wochen nach der Ausgangsbestimmung wöchentlich aufgenommen. Die sieben ausgewählten Fettsäuren sind repräsentative Vertreter der saturierten, einfach ungesättigten und langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

2.2 Geburtskohortenstudie PASTURE/Efrain

2.2.1 Studiendesign

In 2002 wurde die multizentrische, prospektive Geburtskohortenstudie PASTURE (Protection against Allergies – Study in Rural Environments)/Efrain (Mechanisms of Early Protective Exposures on Allergy Development) initiiert (von Mutius E and Schmid S, 2006). Insgesamt wurden für diese Studie 1133 Familien aus Österreich (Salzburger Land), Schweiz (St. Gallen, Ost-Schweiz), Deutschland (Bayerisches Alpenvorland), Finnland (Kuopio, Mittelfinnland) und Frankreich (Besançon, Franché Comté) rekrutiert. Die Mütter der Bauern- und Nicht-Bauernfamilien befanden sich zu Beginn der Studie alle im dritten Trimester der Schwangerschaft. Die Kinder der Studienfamilien wurden von der Schwangerschaft bis zum sechsten Lebensjahr begleitet. Der erste Studienabschnitt umfasst die Schwangerschaft und das erste Lebensjahr (PASTURE), der zweite Abschnitt das zweiten bis sechste Lebensjahr der Kinder (Efrain). Die Studie wurde durch die lokalen Ethikkommissionen in allen Feldzentren genehmigt und die Zustimmung aller Eltern schriftlich eingeholt.

Die Ziele der Studien sind:

- Prüfung des Bauernhofeffektes im prospektiven Studiendesign
- Die Aufklärung von Allergie protektiven Lebensstilfaktoren und Lebens-/Wohnumfeld
- Die Identifikation von Nahrungsmitteln mit immun-modulatorischer Wirkung
- Die Identifikation von Mechanismen der Allergieprotektion durch vergleichende Messungen immunologischer Parameter (spez. IgE- und Zytokinmessungen)

Die Probensammlung und Interviews (Feldarbeit) erfolgte durch die fünf Studienzentren: München, Salzburg, Basel, Besançon und Kuopio. Alle Laborparameter wurden in verschiedenen Studienzentren und weiteren Partnerzentren aufgenommen. Eine zentrale Datenbank zur Dokumentation aller Daten wurde in Ulm eingerichtet.

Alle verwendeten Fragebögen basieren auf den Fragebögen der ISAAC (International Study of Asthma and Allergy in Childhood), der ALEX-Studie (The Allergy and Endotoxin study) und der PARSIFAL-Studie. Während die Fragebögen zur Anamnese der Gesundheit der Eltern aus den Fragebögen der Amerikanischen Gesellschaft für Thoraxerkrankungen entnommen wurden (Ferris, 1978). Die Fragebögen wurden im Rahmen von Interviews und Selbstverwaltung der Mütter am Ende der Schwangerschaft und bei Hausbesuchen im Alter der Kinder von zwei Monaten, einen und vier Jahren durchgeführt (Abbildung 7). Im Rahmen dieser Befragungen wurden u.a. Daten zum kindlichen Milchkonsum, Auftreten allergischer Erkrankungen und

Atemwegserkrankungen der Kinder gesammelt. Zusätzliche Informationen über den Allergiestatus und Erkrankungen der Atemwege sowie potenziellen Störfaktoren (*englisch: confounder*), wie sozio-demographische Umstände, Rauchen und Familiengröße wurden in separaten Befragungen der Eltern aufgenommen. Parallel zu den Milchsammlungen wurden die Familien zum Herkunft der von ihnen konsumierten Milch (Bauernhof- oder Molkereimilch) befragt. Familien, die Bauernhofmilch konsumieren mussten zusätzlich Angaben zur Milchbehandlung (Abkochen, Entrahmung etc.) und zur Haltung der Milchkühe machen.

Zur Untersuchung der Allergieentstehung der Studienkinder wurde diverse Instrumente entwickelt, die die qualitative sowie die quantitative Erhebung von Exposition, immunologisch-biologischen Parametern und klinischer Endpunkte ermöglichen (Abbildung 7).

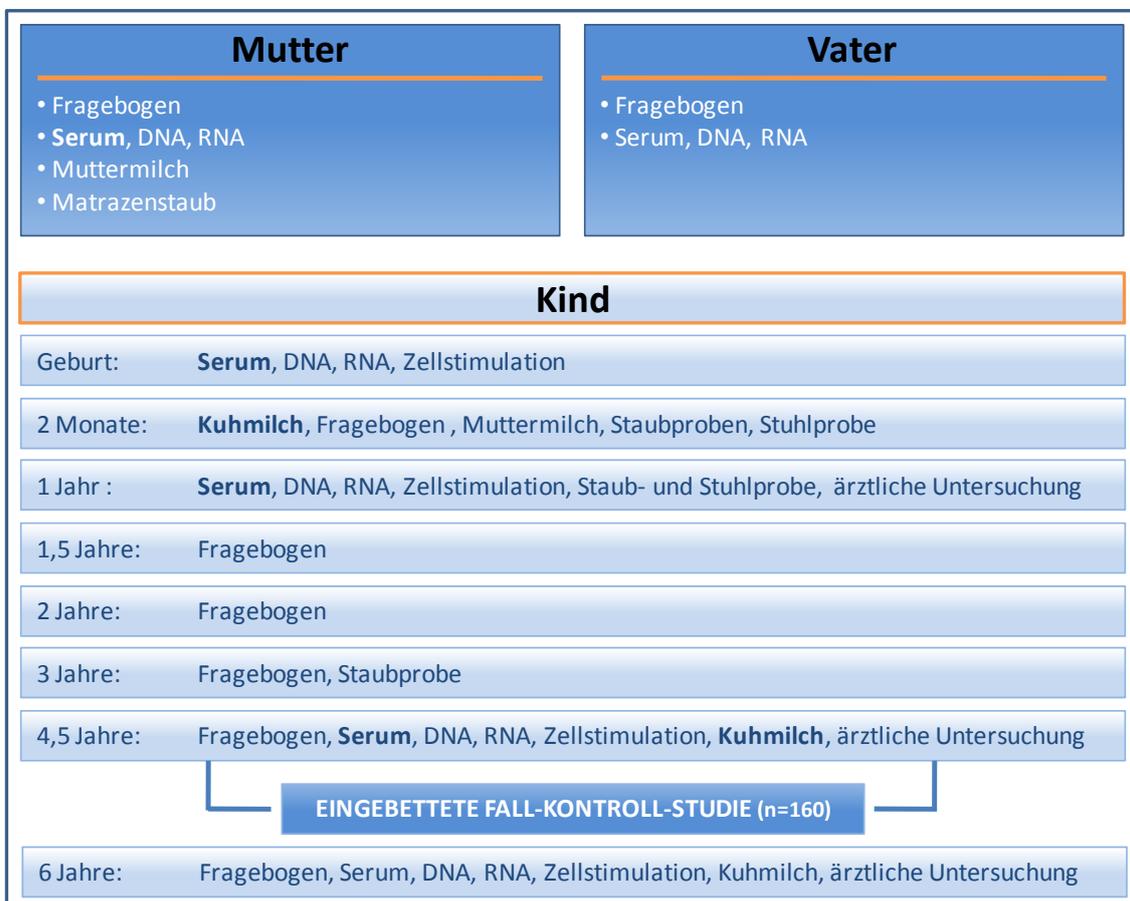


Abbildung 7: Studiendesign der PASTURE/Efrain-Studie (modifiziert nach Habilitationsschrift Pfefferle)

Expositionen: Fragebögen zu Stall- und Heuschoberaufenthalten, bäuerliche Tätigkeiten, Lebensstilfaktoren (Haustiere, Familiengröße, Rauchen, Stillen) und Ernährungsgewohnheiten; Staubsammlungen für Endoxinbestimmungen; Milchsammlung für Fettsäure- mikrobielle Analyse; Immunologisch-biochemische Parameter: Zellstimulation aus Vollblut zur Zytokinproduktion; Serum: Analyse von spezifisches IgE und Fettsäuren.Vollblut: DNA für genetische Typisierung, RNA für Expressionsanalysen; Stuhlproben für Charakterisierung der Mikroflora; Klinische Endpunkte: ärztliche Untersuchung, allergie-diagnostische Tests (Pricktest, Lungenfunktion)

2.2.2 Probensammlung

Für die in die Studie eingebetteten Fall-Kontroll-Studie wurden folgende Serumproben für die Fettsäureanalysen der Mütter (n=144) und der Kinder bei der Geburt (n=121), im Alter von einem Jahr (n=121) und im Alter von viereinhalb Jahren (n=144) gesammelt und auf Trockeneis zur Analyse in eins der zentralen Analysezentrum in Marburg geschickt. Außerdem wurden zusätzlich zu diesen Proben passende Kuhmilchproben der Indexfamilien zum Zeitpunkt von zwei Monaten (n=159) und viereinhalb Jahren (n=128) gesammelt (Abbildung 7). Diese Kuhmilchproben spiegelten die für gewöhnlich konsumierte Milch wieder. Weitere Informationen über die Herkunft oder Behandlung der Milch vor ihrem Konsum sowie den Zeitpunkt der Milchsammlung wurden einem zusätzlichen Fragebogen zur Milchsammlung dokumentiert.

2.2.3 Datensätze für epidemiologische Studien

Zusätzlich zu dem in dieser Arbeit erhobenen Fettsäuredatensatz wurden von Studienzentrum für epidemiologische Analysen in Ulm folgende in der PASTURE/Efrain erhobene Datensätze für weitere statistische Auswertungen zur Verfügung gestellt:

- Messung von allergen-spezifischen IgE des Kindes im Alter von einem und viereinhalb Jahren (durchgeführt durch das Studienzentrum Marburg, Prof. Harald Renz und Dr. Petra Ina Pfefferle)
- Auswertung der Fragebögen (durchgeführt durch das Studienzentrum Ulm, Dr. Jon Genuneit und Dr. Gisela Büchele)

2.2.4 Statistische Auswertung

Alle statischen Analysen in diesem Teil der Arbeit wurden mit SAS 9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC) durchgeführt. Alle verwendeten Modelle wurden auf die gerichtete Stichprobe gewichtet und auf die unterschiedlichen Zentren adjustiert.

Unterschiede in der Verteilung der Fall- und Kontrollgruppe der Fall-Kontroll-Studie wurden mithilfe des Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) und des Cochran-Armitage-Test für Trends auf statistische Signifikanz untersucht. Adjustierte Odds Ratios (OR) mit einem 95%-Konfidenzintervall (KI) wurden für die Untersuchung der Assoziationen zwischen dem Konsum von Bauernhofmilch und Asthmasymptomen sowie zwischen dem Konsum von Bauernhofmilch und Atopie berechnet. Spezifische IgE-Levels wurden dafür als kontinuierliche oder dichotomisierte Variablen bei einem Detektionslimit von 0.35 IU/l verwendet. Die spezifischen IgE wurden für die Analysen in folgende Gruppen unterteilt: IgE für inhalative

Allergene (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farina*, Katze, Pferd, Hund, *Alternaria spezies*, Beifuß, Wegerich, Erlen-, Birken-, Haselnuss-, Roggenpollen und Graspollen-Mix), IgE für saisonale Allergene (Erlen-, Birken-, Haselnuss-, Roggenpollen, Beifuß, Wegerich, *Alerniaria spezies* und Graspollen-Mix) und IgE für Nahrungsmittelallergene (Hühnerei, Kuhmilch, Erdnuss, Haselnuss, Karotte und Weizenmehl).

Die Regressionskoeffizienten β (β -Wert) und deren 95%-Konfidenzintervalle (KI) für Vergleich der Bauernhof- und Molkereimilch sowie der Einfluss verschiedener Faktoren auf den CLA-Gehalt der Bauernhofmilch wurden mithilfe des Modells der linearen Regression berechnet. Die Unterschiede der β -Werte wurden mithilfe des Wald-Tests auf statistische Signifikanz untersucht.

Die Berechnung der Korrelationen zwischen den Fettsäuren in Milch und Serum sowie zwischen den mütterlichen und kindlichen Fettsäuren wurden mithilfe der Pearson-Korrelationskoeffizienten r^2 berechnet. Die Daten der Fettsäurenmessung im Serum wurden zuvor log-transformiert (Basis 10, nach Addition von 1), um eine zufriedenstellende Annäherung an die Normalverteilung der Daten zu erhalten.

Die statische Signifikanz bei allen durchgeführten exploratorischen Analysen wurde für p-Werte unterhalb von 0.05 angenommen.

2.3 Experimentelle *in-vivo* Studien

2.3.1 Versuchstiere und Versuchshaltung

Für alle *in vivo* Studien wurden weibliche BALB/c-Mäuse im Alter von sechs bis acht Wochen verwendet. Sämtliche Tiere wurden unter keimarmen Bedingungen in einzeln belüfteten Käfigen bei Raumtemperatur von 20°C und konstanter Luftfeuchtigkeit gehalten. Des Weiteren wurde ein künstlicher 12 h-Hell-Dunkelzyklus erzeugt.

2.3.2 Induktion einer allergischen Atemwegsentszündung

Als Basis der *in vivo* Studien diene ein Tiermodell der allergischen Atemwegsentszündung in Balb/c-Mäusen. Grundvoraussetzung für die Etablierung einer lokalen Entzündungsreaktion in der Lunge ist die Sensibilisierung und Provokation gegen ein artfremdes Protein. Diese Sensibilisierung wird durch drei subkutane (s.c.) Injektionen von 10 μ g Ovalbumin (OVA Grade VI) gelöst in 200 μ l PBS an den Tagen 0, 7 und 14 des Versuchsprotokolls (Abbildung 8) ausgelöst (Conrad et al., 2009a). Die daraus resultierende systemische Sensibilisierung gegen OVA und die Bildung OVA-spezifischer Th2-Zellen lässt sich anhand des Nachweises von OVA-

spezifischer IgE- und IgG₁-Antikörper bestätigen. An den Tagen 26-28 wurden die Tiere zur Initiation der lokalen Entzündungsreaktion in der Lunge für 20 Minuten in einer Expositions-kammer einem OVA-Aerosol (1%) zur Provokation ausgesetzt. Die Lungenfunktionsanalyse folgte an Tag 29, während die endgültige Analyse an Tag 30 stattfand.

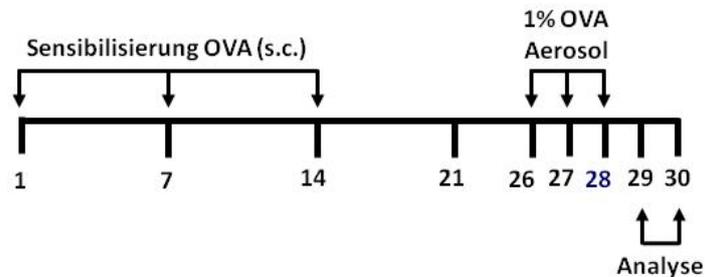


Abbildung 8: Protokoll zur Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung

Chemikalien:

PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)

PAA Laboratories, Pasching, A

OVA Grade VI

Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

2.3.3 Modellierung der allergischen Atemwegsentzündung durch die Verabreichung von Kuhmilch

Um die Verträglichkeit und den Einfluss von Kuhmilch auf die Entwicklung des asthmatischen Phänotyps zu untersuchen, wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt, in denen Dosis, Verabreichungsform und Prozessierungsweg der Milch auf ihre Asthma protektive Eigenschaft untersucht. Hierzu wurden folgende modifizierte Modelle der akuten allergischen Atemwegsentzündung verwendet (Abbildung 9):

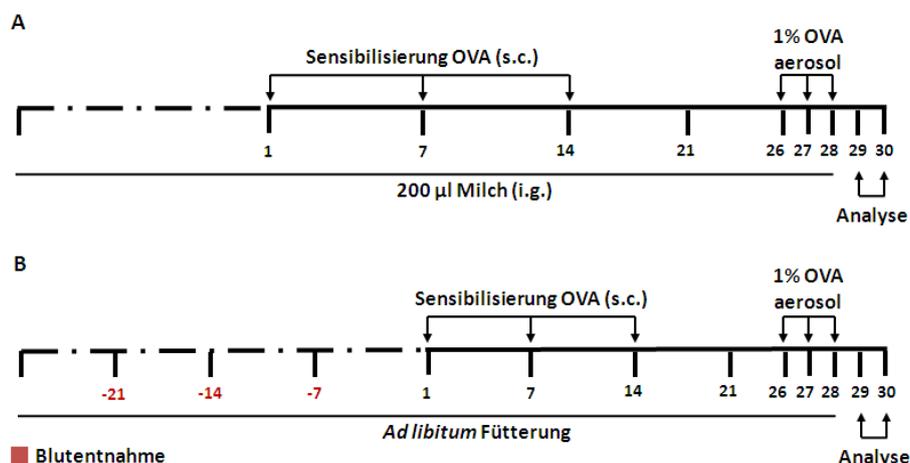


Abbildung 9: Protokolle zur Modellierung der allergischen Atemwegsentzündung durch die Verabreichung von Kuhmilch

Chemikalien:

PBS (Dublecco's Phosphate Buffered Saline)	PAA Laboratories, Pasching, A
Ketanest	Pfizer, Berlin, D
OVA Grade VI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Rompun	Bayer, Leverkusen, D

2.3.4 Head-out-Body-Plethysmographie

Head-out-Body-Plethysmographen dienen der nicht-invasiven Messung der Lungenfunktion eines spontan atmenden, nicht anästhesierten Tieres. Während der Messung werden die sensibilisierten Tiere mit dem Bronchiokonstriktor Metacholin (MCh) exponiert. Durch diese Exposition kommt es zu einer Veränderung des Atemflusses der Tiere, wobei asthmatische Tiere im Vergleich zu nicht-asthmatischen Tiere empfindlicher reagieren und damit bereits bei geringeren Dosen Metacholin eine 50%ige Reduktion des Atemflusses (MCh_{50}) zeigen.

Im Laufe der Messung befindet sich der Rumpf der Maus im luftdicht verschlossenen Plethysmographen, während der Kopf durch eine Halskrause in eine Glasexpositions-kammer ragt. Mit Hilfe dieser Kammer können bis zu vier Tiere gleichzeitig gemessen werden. Die Thoraxbewegungen, die bei der Atmung der Maus auftreten, führen zu Volumenänderungen im Plethysmographen. Der dabei entstehende Luftstrom wird von einem Pneumotachographen gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Software NOTOCORD hem 3.5.

Vor der Messung wurde zunächst die Basislinie ohne Zugabe von MCh ermittelt. Während dieses Zeitraums atmet die Maus circa viertausendmal ein und aus. Mit Hilfe dieser ermittelten Werte des Atemflusses bei Ein- und Ausatmung wurde ein Mittelwert errechnet und dem Wert 100 gleichgesetzt. Nach der Aufnahme der Basislinie erfolgt die Zugabe von MCh, das in PBS gelöst alle fünf Minuten für jeweils 70 Sekunden als Aerosol in die Expositions-kammer geleitet wird. Dabei wurden aufsteigende Konzentrationen an MCh (0, 12.5, 25, 50, 75 und 100 mg/ml) verwendet.

Durch die Provokation mit MCh nimmt die Verengung der Atemwege zu und damit der Atemfluss ab. Die Konzentration, bei der eine Verminderung um 50% erreicht wird, gilt als Maß für Reagibilität der glatten Muskulatur der Atemwege.

Chemikalien:

β-Methyl-Acetylcholin (MCh)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	PAA Laboratories, Pasching, A

Materialien:

Glasexpositions-kammer	Forschungswerkstätten, MHH, D
Pneumotachographen PTM 378/1.2	Hugo-Sachs-Elektronik, March, D
NOTOCORD hem 3.5 Software	Notocord, Paris, F

2.3.5 Probengewinnung**Blutentnahme, Plasma- und Erythrozytengewinnung**

Zur Gewinnung von Blut wurden die Tiere nach Gabe von 200 µl 5x Narkose i.p. (Ketamin, Rompun) und einem Achselschnitt entblutet. Für die vollständige Gerinnung der Blutproben wurde diese bei Raumtemperatur (RT) für mindestens eine Stunde inkubiert. Danach wurden die Proben für 30 min bei 3000 rpm und 4°C inkubiert. Die Plasmaüberstände wurden vorsichtig abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Zur Gewinnung von Erythrozyten wird das untere Zellpellet dreimal mit isotonomischer Natriumchloridlösung (0.9 %) gewaschen und ebenfalls bis zur weiteren Verwendung bei -20°C tiefgefroren.

Chemikalien:

Ketanest	Pfizer, Berlin, D
Rompun	Bayer, Leverkusen, D

Materialien:

Microvette®	Sarstedt, München, D
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Osterode, D

Bronchoalveoläre Lavage

Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) dient der Gewinnung von Probenmaterial aus der Lunge. Dieses umfasst alle Zellen, die in das bronchoalveoläre Lumen infiltriert sind. Des Weiteren dient die BAL dem Herausspülen der in diesem Kompartiment vorhandenen Proteine. Nach Gabe von 200 µl 5x Narkose wurde die Trachea des getöteten Tiers freigelegt und eine kleine Öffnung in diese geschnitten. In diese Öffnung wurde eine Kanüle eingeführt und eine Spritze mit 1 ml PBS mit Protease-Inhibitor aufgesetzt, die Spritze in das Lumen entleert und direkt

wieder aufgezogen. Anschließend wurde die erhaltene Suspension für zehn Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand entnommen und bei -20°C eingefroren.

Chemikalien:

PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	PAA Laboratories, Pasching, A
Protease-Inhibitor	Roche, Mannheim, D

Materialien:

Vasofix Venenverweilkatheter	Braun, Melsungen, D
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Osterode, D

Gewinnung von primären Zellen aus Lymphknoten

Durch Gabe von 200 µl 5x Narkose wurde die Maus getötet und die an der Lunge vorhandenen Lymphknoten entnommen. Diese wurden in eiskaltem sterilem RPMI-Medium aufgenommen und unter sterilen Bedingungen mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Nylonsieb (100 µm) gedrückt. Die Einzelzellsuspension wurde bis zur weiteren Verarbeitung im Probengefäß auf Eis gelagert.

Chemikalien:

RPMI 1640 Komplettmedium:

RPMI 1640 (1x) ohne L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, A
FCS Gold	PAA Laboratories, Pasching, A
Antimykotikum/Antibiotikum	PAA Laboratories, Pasching, A
L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, A

Materialien:

Präparierbesteck	Kobe, Marburg, D
Zellsieb (100 µm)	BD, Heidelberg, D

2.3.6 Differenzierung und Zellzählung der Leukozyten in der BAL

Zur Bestimmung der Zellzahl der BAL wurde das jeweilige BAL-Zellpellet in 1 ml PBS/1 % BSA resuspendiert, 1:200 mit CASY®ton-Lösung verdünnt und mittels CASY®TT-Zellzählssystem gezählt.

Für die Differenzierung der Leukozytenpopulation in der BAL wurden Zytospins angefertigt. Dafür wurden 50 µl Probe mit 150 µl PBS/1 % BSA verdünnt und anschließend einer Zytozentrifugation (5 min, 1200 rpm) unterzogen. Die zentrifugierten Präparate wurden an der Luft getrocknet und mit einer Diff-Quick®-Lösung eingefärbt. Die Zelldifferenzierung erfolgte lichtmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung anhand morphologischer Eigenschaften.

Chemikalien:

BSA Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe, D
CASY®Ton	Schärfe Systems, Reutlingen, D
Färbelösung (Diff-Quick®)	Dade-Behring, Marburg, D
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	PAA Laboratories, Pasching, A

Materialien:

CASY®Model TT	Schärfe Systems, Reutlingen, D
Mikroskop (BH2)	Olympus, Hamburg, D
Objektträger (76 x 26 mm, Mattrand)	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Probenkammer	Shandon, Frankfurt a.M., D
Zytoklip	Shandon, Frankfurt a.M., D
Zytozentrifuge (Cytospin 3)	Shandon, Frankfurt a.M., D

2.3.7 Lungenhistologie

Um das vorhandene Blut aus der Lunge zu entfernen, wurde die Lunge perfundiert. Dazu wurde das rechte Atrium mit einem kleinen Schnitt geöffnet und über eine Kanüle eiskalte isotonische Kochsalzlösung in die Blutgefäße der Lunge zugeführt. Durch zyklisches Einblasen von Luft über den Trachealkatheder wurde daraufhin das Blut aus der Lunge gedrückt. Zur morphologischen Analyse der Lunge erfolgte eine histologische Analyse des Organs. Die Lunge wurde dafür *in situ* über die Trachea mit Paraformaldehyd (6 %) gefüllt und im Folgenden zur Fixierung in Paraformaldehyd (6 %) eingelegt. Anschließend erfolgte die Einbettung der Organe in Agarose und schließlich in Paraffin in Form von kleinen Blöcken. Aus den Paraffinblöcken wurden mithilfe des Mikrotoms 3 µm dicke Lungenschnitte angefertigt.

Chemikalien:

Paraformaldehydlösung (6%)	Merck, Darmstadt, D
----------------------------	---------------------

Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE)

Bei der HE-Färbung handelt es sich um eine Standardfärbung in der Histologie, die einen Überblick über die Struktur des Gewebes liefert und dabei die Unterscheidung der zu untersuchenden Strukturen in normal, entzündlich- oder degenerativ-verändert oder pathologisch ermöglicht. Im ersten Schritt wurden die entparaffinierten Schnitte mit einer Hämatoxylinlösung behandelt, wodurch die Zellkerne des Präparates violett bis dunkelviolett gefärbt werden. Der zweite Schritt war die Gegenfärbung mit Eosin. Dabei wurden Zytoplasma, Bindegewebe, Interzellularräume und Erythrozyten rot gefärbt.

Chemikalien:

Färbelösung (Hämatoxilin III nach Gill)	Merck, Darmstadt, D
Färbelösung (Eosin G)	Merck, Darmstadt, D

Materialien:

Auswertungssoftware Cell F	Olympus, Hamburg, D
Mikroskop (BX51)	Olympus, Hamburg, D
Mikrotom (Accu-Count®SRMTM200)	Sakura, NL
Objektträger (76 x 26 mm, Mattrand)	Menzel GmbH, Braunschweig, D

Periodsäure-Schiff-Färbung (PAS)

Die PAS-Färbung dient zur Darstellung der Mukushyperplasie in den Atemwegen der Lungenschnitte. Durch Behandlung der Schnitte mit Periodsäure werden 1.2-Glykole zu Aldehydgruppen oxidiert. Das Schiffs-Reagenz reagiert mit Aldehyden zu einem leuchtend roten Farbstoff. Dadurch lassen sich bestimmte Mukusbestandteile wie z.B. unsubstituierte Polysaccharide, Phospholipide und neutrale Mukopolysaccharide spezifisch anfärben. Die Gegenfärbung dieser Schnitte erfolgt mit Hämatoxilin.

Anhand der PAS-gefärbten Schnitte wurde die Anzahl und das Volumen der Gobletzellen mittels eines PC-gekoppeltes Lichtmikroskop und dem CAST (Computer Assisted Stereological Toolbox)-System morphometrisch quantifiziert. Dafür wurden zufällig 150 Bilder der jeweiligen Schnitte angefertigt und ausgewertet. Mit Hilfe der folgenden Formel wurden der prozentuale Anteil von Gobletzellen an der Epitheloberfläche und das Volumen der Gobletzellen berechnet:

$$\text{Anzahl: } N_{GC} [\%] = \frac{I_{GC} \cdot 100}{I_{GC+EC}} \qquad \text{Volumen: } V_{GC} \left[\frac{\mu\text{m}^3}{\mu\text{m}^2} \right] = \frac{P_{Mucin} \cdot L(P) \cdot 0,5}{\sum I_{GC+EC}}$$

GC Gobletzellen, EC Epithelzelle, I_{GC} Linie die GC und Basalmembran schneidet, $L(P)$ Länge der Linie, P_{Mucin} Anzahl von Muzin (aus laboreigener SOP)

Chemikalien:

Färbelösung (PAS-Färbung Kit)	Merck, Darmstadt, D
-------------------------------	---------------------

Materialien:

Auswertungssoftware CAST-Grid System	Visiopharm, Hoersholm, DK
Auswertungssoftware Cell F	Olympus, Hamburg, D
Mikroskop (BX51)	Olympus, Hamburg, D
Mikrotom (Accu-Count®SRMTM200)	Sakura, NL
Objektträger (76 x 26 mm, Mattrand)	Menzel GmbH, Braunschweig, D

2.3.8 Zytokinbestimmung aus der BAL und restimulierten Lymphozytenkulturen mittels Cytometric Bead Array (CBA)

Der *Cytometric Bead Array (CBA)* basiert auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie, welche die Unterscheidung verschiedener Partikel aufgrund ihrer Größe und Farbe ermöglicht. Der große Vorteil dieser Methodik im Vergleich zur Zytokinbestimmung mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)* ist die Bestimmung mehrerer Zytokine in einer Probe. Dafür wurden verschiedene Latexpartikel verwendet, die unterschiedliche Größen aufwiesen und bei Anregung durch einen Laser unterschiedliche Fluoreszenz zeigten. Jedes der Partikel ist mit einem Primärantikörper beschichtet, der ein bestimmtes Zytokin spezifisch bindet. Nach der Zugabe der Proben, bzw. der verschiedenen Zytokinstandards wurde ein zweiter PE-konjugierter Antikörper hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben im FACS Canto II gemessen. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Kit zugehörigen Software FACP Array®. Für die Messungen wurde das kommerziell erhältliche „CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Zytokin Kit“ verwendet. Dieses Kit ermöglichte die gleichzeitige Bestimmung der sieben Zytokine Interleukin 10 (IL-10), Interleukin 17A (IL-17A), TNF- α , IFN- γ , Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 2 (IL-2). Das dafür benötigte Probenvolumen betrug 50 μ l BAL bzw. Überstand der restimulierten Lymphknotenkulturen. Als Zytokinstandards wurden zehn Verdünnungen im Bereich von 10 – 5000 pg/ml verwendet.

Die Bestimmung der weiteren drei Zytokine Interleukin-5 (IL-5), Interleukin-9 (IL-9) und Interleukin-1 beta (IL-1 β) wurde mittels FACSArray® von BD gemessen. Hierfür wurde ebenfalls ein Probenvolumen von 50 μ l benötigt.

Chemikalien:

CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Kit	BD Bioscience, San Diego, US
CBA Mouse IL-5 Flex Set	BD Bioscience, San Diego, US
CBA Mouse IL-9 Flex Set	BD Bioscience, San Diego, US
CBA Mouse IL-1 β Flex Set	BD Bioscience, San Diego, US

Materialien:

Software FACPArray [®]	BD Bioscience, San Diego, US
FACS Canto II [®]	BD Bioscience, San Diego, US
FACS Array [®]	BD Bioscience, San Diego, US

2.3.9 Immunglobulin-Bestimmung mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Die ELISA-Technik ist ein weit verbreitetes immunologisches Nachweisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Für die Messung der Serumkonzentrationen OVA-spezifischer Immunglobuline (Ig) der Subklassen IgE, IgG₁ und IgG_{2a} wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt. Dieser wird in speziell beschichteten 96-well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Der für das nachzuweisende Antigen spezifische Primärantikörper bindet mit dem Fc-Teil an die feste Phase und mit dem anderen Fc-Teil die aufgetragenen Proben und Standards. Nach einer Inkubationsphase wurde der Sekundärantikörper dazu gegeben, dieser bindet ebenfalls das Antigen und es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Nach der Bindung des Streptavidin-Peroxidase-Komplexes und der Zugabe eines chromogenen Substrats, welches durch den Enzymkomplex umgesetzt wird, erfolgte die Auswertung der Farbreaktion.

Für die Messung wurde zunächst die 96-Well-Flachbodenplatte mit jeweils 50 μ l OVA über Nacht bei 4°C beschichtet. Zuvor wurde OVA in Beschichtungspuffer (0.1 M NaHCO₃, pH 8.3) verdünnt. Nach viermaligem Waschen mit PBS/0.1 % Tween 20 wurden 150 μ l Blockpuffer (PBS/0.1 % BSA) hinzugegeben, um unspezifische Wechselwirkungen zu verhindern. Nach wiederholtem Waschen der Platte wurden die Standards und 50 μ l der vorverdünnten Proben aufgetragen und zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Durch einen weiteren Waschvorgang wurde ungebundenes Material entfernt und daraufhin der biotinylierte Sekundärantikörper hinzugegeben (Tabelle 3). Nach Entfernung des überschüssigen Sekundärantikörpers wurden pro Well 50 μ l Streptavidin-Peroxidase-Lösung hinzugegeben und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte nach erneutem Waschen die Zugabe von 100 μ l Substratlösung. Die Substrat-Enzym-Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l 2 N Schwefelsäure (H₂SO₄) gestoppt. Die Zugabe von H₂SO₄ führte zu einem Farbumschlag von blau nach gelb, sodass die Absorption bei einer Wellenlänge von

450 nm mit einem Absorptionsphotometer gemessen wurde. Die Datenauswertung erfolgte anhand der Photometersoftware Magellan 3.

Tabelle 3: AK-Konzentrationen und Verdünnungsfaktoren für Ig-ELISA

ELISA	Konzentration OVA/ Beschichtungs-AK $\mu\text{g/ml}$	Konzentration Detektions-AK $\mu\text{g/ml}$	Konzentration 1. Standard ng/ml	Proben - Verdünnung
OVA-IgE	20	2.5	200	1:10
OVA-IgG ₁	0.4	2.5	50	1:10000
OVA-IgG _{2a}	20	2.5	10	1:2000

Chemikalien:

BM blue POD Substrat	Roche, Mannheim, D
BSA Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe, D
OVA-IgE	
Anti-Mouse-IgE-Biotin	BD Bioscience, San Diego, US
IgE-AK Standard	Serotec, Oxford, UK
OVA Grade VI	Sigma, Taufkirchen, D
OVA-IgG ₁	
Anti-Mouse- IgG ₁ -Biotin	BD Bioscience, San Diego, US
Anti-OVA-IgG ₁	Sigma, Taufkirchen, D
OVA Grade VI	Sigma, Taufkirchen, D
OVA-IgG _{2a}	
Anti-Mouse- IgG _{2a} -Biotin	BD Bioscience, San Diego, US
Anti-OVA chicken	AntibodyShop, Gentofte, DK
OVA Grade VI	Sigma, Taufkirchen, D
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	PAA Laboratories, Pasching, A
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt, D
Streptavidin/Peroxidase	Sigma, Taufkirchen, D
Tween 20	Roth, Karlsruhe, D
<u>Materialien:</u>	
96-Well-Mikrotiterplatten Maxisorp Flachboden	Nunc, Wiesbaden, D
Immuni™ Wash 12 Mikrotiterplatten-Washer	Nunc, Wiesbaden, D
Mikrotiterplattenreader Sunrise	Tecan, Crailsheim, D
Software Magellan	Tecan, Crailsheim, D

2.3.10 Bestimmung der Fettsäuremuster in Serum und Erythrozytenmembranen

Für die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung in murinem Serum und Erythrozytenmembranen wurde wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben Blut entnommen, entsprechend für die anschließende Messung aufgearbeitet (s. Kap. 2.1.1 und Kap. 2.1.2) und bei -80°C bis zur gaschromatographischen Messung tiefgefroren. Die aufgetauten Proben wurden mit dem GC/FID System A7890 von Agilent gemessen und die prozentualen Anteile der Gesamtmenge aller gemessenen Fettsäuren bestimmt.

2.3.11 Eicosanoidanalytik

Die Analytik der Eicosanoide wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rolf Nüsing am Institut für klinische Pharmakologie der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt a. M. durchgeführt. Folgende Prostaglandine, Leukotriene und Thromboxane sowie deren Vorläufer wurden in 500 μl Bronchoalveolärer Lavage (BAL) bestimmt: PGD_2 , PGE_2 , PGF_{2a} , 6-Keto- PGF_{1a} , TXB_4 , LTB_4 und 5S-, 12S-, 15-HETE. Außerdem wurden die Konzentrationen der freien DHA und EPA in der BAL bestimmt. Alle Analysen wurden mit Hilfe von LC-MS/MS wie in Brenneis et al. und Linke et al. beschrieben durchgeführt (Linke et al., 2009; Brenneis et al., 2011). Das Detektionslimit der einzelnen Analyten ist der Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Nachweisgrenzen (NWG) für Eicosanoide

Analyt	NWG [ng/ml]	Analyt	NWG [ng/ml]
PGD_2	0,0400	LTB_4	0,0357
PGE_2	0,04	5S-HETE	0,04
PGF_{2a}	0,16	12S-HETE	0,04
TXB_2	0,04	15s-HETE	0,04
6-keto- PGF_{1a}	0,04	EPA	0,5
		DHA	0,5

2.3.12 Herstellung der Mauditäten

Für die Herstellung der Milchdiäten (Abbildung 10) wurden jeweils 30 Liter Milch aus den Regionen Hessen und Oberbayern gesammelt. In der oberbayerischen Region wurden drei Bauernhöfe mit traditioneller Tierhaltung und in Hessen ein Bauernhof für die Milchsammlung ausgewählt. Die weitere Milchprozessierung wurde in Kooperation mit dem Wissenschaftszentrum Weihenstephan Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie (AG Prof. Kulozik) durchgeführt. Die Milch wurde dafür gekühlt angeliefert und anschließend schonend bei $72-73^{\circ}\text{C}$ für 15 sec in einer Röhrenerhitzeranlage pasteurisiert und auf 5°C abgekühlt. Die pasteurisierte Milch wurde daraufhin bei 190°C am

Sprühurmeingang und 78-80°C am Sprühurmeausgang sprühgetrocknet. Die je ca. 2.6 kg gewonnenes Vollmilchpulver wurden in PET-Beutel abgefüllt und diese luftdicht verschweißt. Das Milchpulver wurde anschließend an die Firma Altromin (Lage, Deutschland) versandt. Dort wurde das Milchpulver anstatt der gewöhnlich verwendeten Fettfraktion in die Standardmausdiät C1000 integriert. Dabei entstanden zwei fast identische Mausdiäten mit einem Fettgehalt von 5 %, in denen der Caseinanteil angeglichen wurde. Die Diäten unterschieden sich lediglich in der Zusammensetzung des Milchpulvers, insbesondere in den Milchfetten.

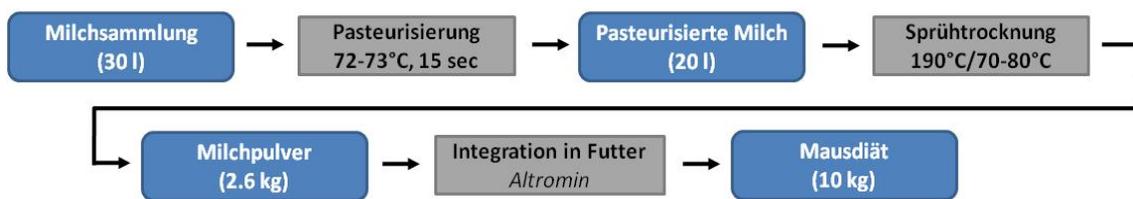


Abbildung 10: Prozessschema der Mausdiätherstellung

2.3.13 Statistische Auswertung

Die graphische Auswertung der Analysen-Daten, die statistische Auswertung und die Berechnung der Signifikanz wurde mit der Software GraphPad Prism® durchgeführt. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) bzw. Standardabweichung (SD) angegeben. Zur Überprüfung von Unterschieden zwischen den Vergleichsgruppen auf statistische Signifikanz wurde der ANOVA-Test und Students t-Test verwendet. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet bei: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3 Ergebnisse

Im folgenden Teil der Arbeit werden die Ergebnisse der sich aus der Hypothese hergeleiteten Fragestellungen präsentiert. Das Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war die Etablierung und Validierung einer analytischen Methode zur Bestimmung von Fettsäuremustern in verschiedenen biologischen Matrices und Milchproben mittels Gaschromatographie. Der Schwerpunkt lag dabei insbesondere auf dem Hintergrund, dass diese Methode zum Vergleich von Fettsäuremustern in epidemiologischen Studien sowie in experimentellen Mausstudien angewendet werden sollte. In beiden Fällen liegt die Herausforderung in der optimalen Nutzung der nur gering vorhandenen Probenvolumina. Um trotzdem ein optimales Biomonitoring und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus verschiedenen Matrices zu gewährleisten, sollte sich die hier entwickelte Methode nur geringer Probenmengen bedienen und der Aufbau der Prä-Analytik der Proben möglichst vergleichbar sein. Darüber hinaus sollte diese Methodik eine schnelle, reproduzierbare und quantitative Bestimmung eines breiten Spektrums von Fettsäuren ermöglichen. Das Spektrum der zu bestimmenden Fettsäuren sollte u.a. ungesättigte (SFA), langkettige einfach (MUFA) oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren (LC-PUFA), wie Omega-3-, Omega-6-Fettsäuren und konjugierte Linolsäuren (CLA) beinhalten.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte im Rahmen des interdisziplinären EU-unterstützten PASTURE/EFRAIM-Projekts untersucht werden, ob sich die Fettsäuremuster von Bauern und Nichtbauern in dieser Kohortenstudie unterscheiden. Des Weiteren sollten die immunregulatorischen Eigenschaften der Fettsäuren im Bezug auf verschiedene allergische Erkrankungen, wie z.B. Asthma bronchiale oder atopische Dermatitis beschrieben werden.

Im Rahmen epidemiologischer Studien konnte gezeigt werden, dass der Konsum von Bauernhofmilch protektiv auf die Entstehung von Asthma, Heuschnupfen, allergischer Sensibilisierung und atopischen Dermatitis wirkt (Riedler J et al., 2001; Wickens K et al., 2002; Ege MJ et al., 2006; Perkin MR and Strachan DP, 2006b; Waser M et al., 2007; Pfefferle PI et al., 2010). Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit sollte diese Hypothese als „*Proof of concept*“ im Model des experimentellen Asthmas überprüft werden und mögliche Mechanismen der Protektion untersucht werden.

3.1 Methodenentwicklung zur gaschromatischen Fettsäurebestimmung in Serum, Erythrozyten und Kuhmilch

Im nachfolgenden Teil werden die Ergebnisse der Entwicklung bzw. Validierung der Analyseverfahren für die Fettsäurebestimmung in Serum, Erythrozytenmembranen und Kuhmilch beschrieben. Hierbei wird zwischen der Geräte- und Methodvalidierung unterschieden.

3.1.1 Validierung des Agilent A7890 System

Selektivität der Messung

Unter der Selektivität einer Methode versteht man die Fähigkeit verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störung zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren (Kromidas, 1999).

Die Selektivität einer Methode wird weitgehend durch die Auswahl der verwendeten Kapillarsäule bestimmt. Wesentliche Parameter im Bezug auf die Selektivität einer Säule sind die Länge, der Durchmesser und das Material bzw. die Polarität der stationären Phase. Zu Beginn der Methodenentwicklung spielt daher die Evaluation verschiedener Kapillarsäulen eine bedeutende Rolle. Deshalb wurden in dieser Arbeit drei verschiedene für die Fettsäureanalytik geeignete Säulen (Tabelle 5) evaluiert. Als Kriterien für die Auswahl der Säule dienten cis/trans-Trennung von C18:1- und C18:2-Isomeren, die optimale Trennung der Fettsäuremethylester (FAME) im Bereich von C4:0 bis C22:6 und die zusätzliche selektive Trennung der konjugierten Linolsäuren (CLA).

Tabelle 5: Evaluierte GC-Säule für die Bestimmung von Fettsäuremethylester (FAME)

Bezeichnung	Lieferant	Dimensionen
DB-WAX	Agilent	30 m x 250 µm I.D,
CP Select FAME	Varian	50 m x 250 µm I.D,
CP-Sil 88	Varian	100 m x 250 µm I.D

Zur Evaluation der obengenannten Säulen diente der kommerziell erhältliche 37 FAME-Standard von Sigma®. Um die Analysedauer anfangs so gering wie möglich zu halten, wurden zunächst die Trenneigenschaften der Säulen DB-WAX (Abbildung 11) und CP Select FAME (Abbildung 12) verglichen. Die Analysedauer wird vor allem durch die Totzeit der Säule bzw.

ihrer Länge und der Flussgeschwindigkeit des Trägergases beeinflusst. Der Vergleich der beiden Säulen fand unter identischen Parametereinstellungen statt.

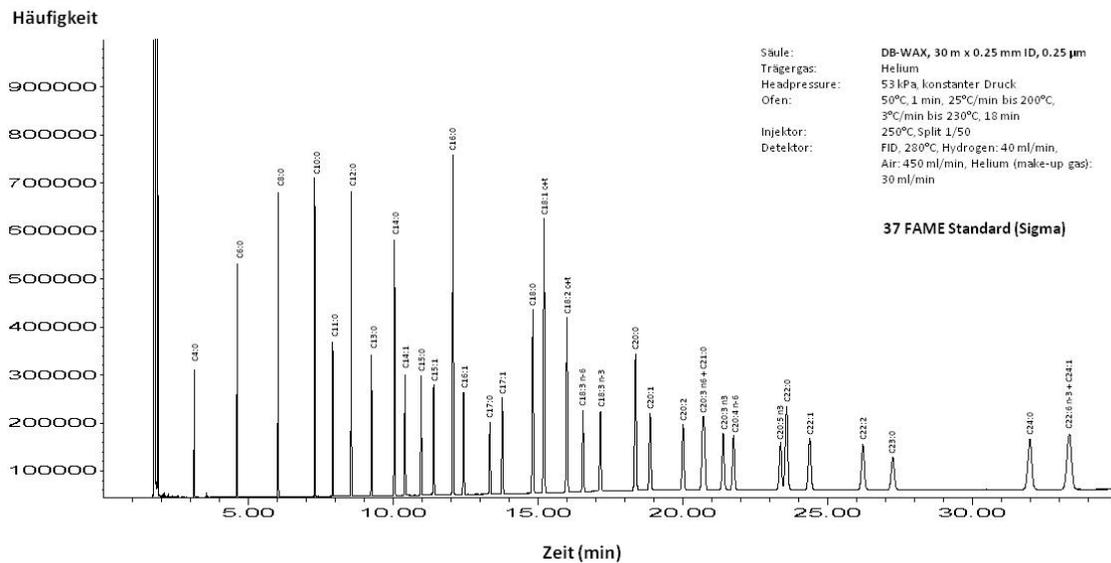


Abbildung 11: GC/FID-Analyse von 37 FAME Standard Mischung auf der DB-WAX Säule von Agilent

Der Vergleich der beiden Säulen ergab, dass die DB-WAX Säule von Agilent nicht für die Trennung von cis/trans-Isomeren von C18:1 und C18:2 geeignet ist. Ebenfalls nicht getrennt werden konnten die FAME C24:1 und C22:6 n3 sowie C20:3 n6 und C22:1. Dagegen zeigte die Messung mit der CP Select FAME-Säule, dass diese Säule für die selektive Trennung dieser FAME geeignet ist und dies zudem in einem kürzeren Analysezeitraum möglich ist.

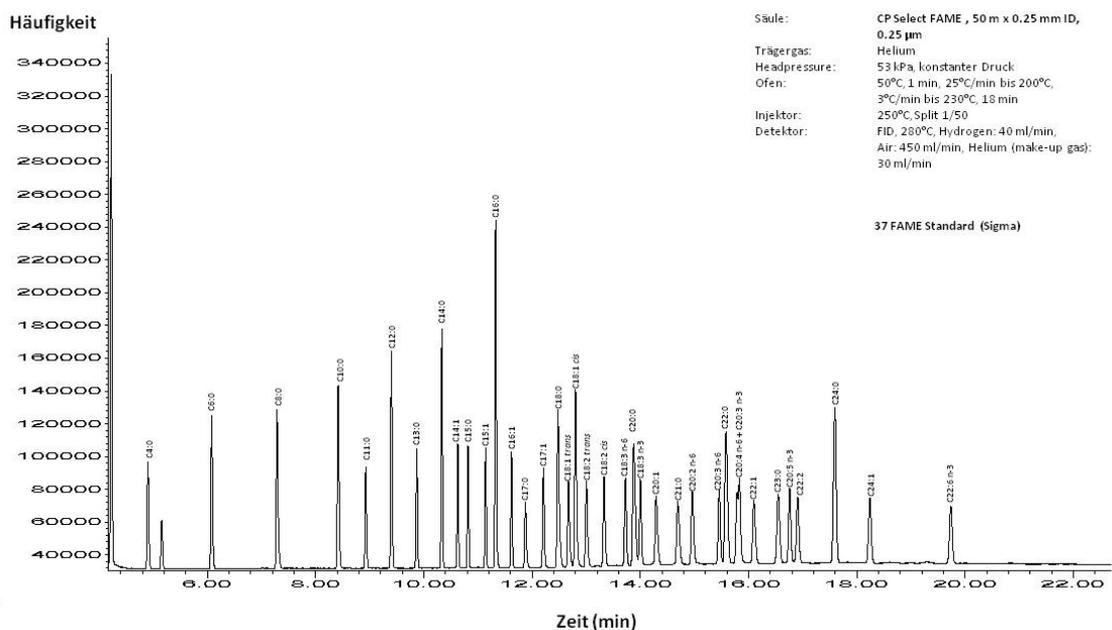


Abbildung 12: GC/FID-Analyse von 37 FAME Standard Mischung auf der CP-Select FAME Säule von Varian

Die Zielsetzung dieser Arbeit umfasste jedoch die Bestimmung weiterer Fettsäuremethylester, so dass am Ende insgesamt 47 FAME bestimmt werden sollten. Deshalb wurden dem 37 FAME Standard weitere zehn FAME, hauptsächlich langkettige mehrfache ungesättigte Omega-3 und Omega-6 Fettsäuren, hinzugefügt (s. Anhang V). Die Analyse dieses Standards mit der für diese Anzahl von FAME-Analyten zuvor nicht getesteten CP Select FAME Säule zeigte, dass die selektive Trennung aller Analyten nicht gewährleistet werden konnte. Speziell die Trennung im Bereich der C18:2-Isomere, C18:2 c9,t11 und C18:2 t10,c12, sowie C20:1 und C21:0 offenbarte einen in der Literatur bereits bekannten Schwachpunkt (Kramer JK et al., 2002). Um dieses Problem zu lösen, wurde nun doch auf die für die Analyse von Milchfetten als Goldstandard bezeichnete 100 m lange CP-Sil 88 Säule zurückgegriffen. Dies bedeutet allerdings, dass sich die Analysezeit einer Probe erheblich verlängerte, jedoch dass sich damit die Selektivität der Methodik stark erhöhte. Mit Hilfe der CP-Sil 88 Säule gelang es nach Optimierung der Methodenparameter, wie z.B. der Flussgeschwindigkeit und des Temperaturgradienten, alle 47 FAME im Standard eindeutig voneinander zu trennen (Abbildung 13). Damit konnten ideale Bedingungen für Quantifizierung aller Analyten gewährleistet werden. Eine vergleichbare gute Trennung konnte ebenfalls für physiologische Konzentrationen von Fettsäuren in Serum-, Erythrozytenmembran- und Milchproben erzielt werden.

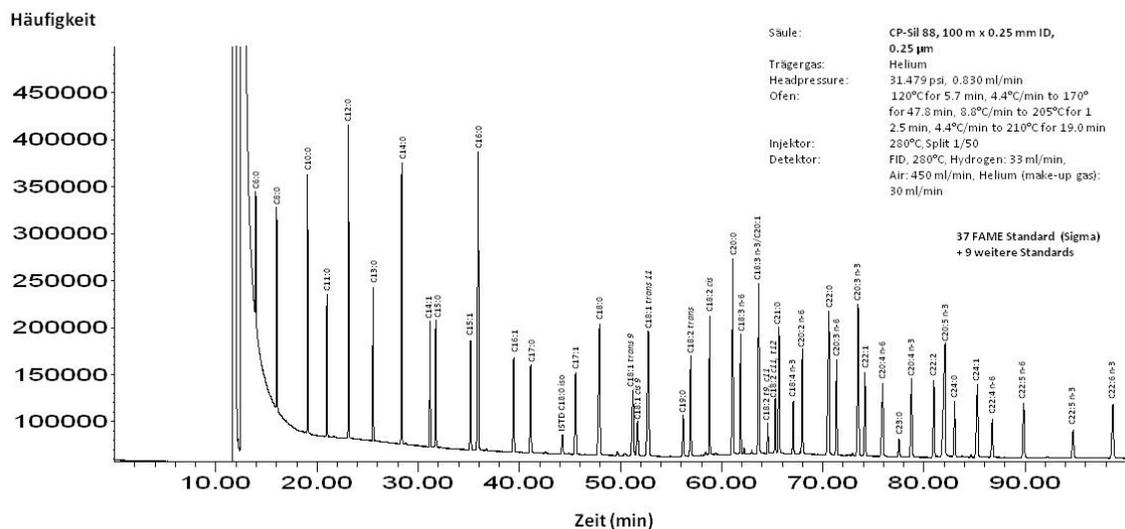


Abbildung 13: GC/FID-Analyse von 37 FAME Standard Mischung plus neun weitere Standards auf der CP-Sil Säule von Varian

Zur Identifizierung der den einzelnen Fettsäuremethylester zugehörigen Peaks wurden kommerzielle Reinsubstanzen mittels des GC/FID gemessen. Durch den Vergleich der Retentionszeiten konnten den einzelnen Peaks der kommerziellen Standards und der biologischen Proben die entsprechenden Fettsäuremethylester zugeordnet werden. Fernerhin

zur Identifizierung der Peaks anhand der Retentionszeiten, wurde zur Überprüfung die Identität durch massenspektrometrische Analysen und Datenbankabgleich spezifischer Massenspektren bestätigt.

Messpräzision

Als Maß der Reproduzierbarkeit der Messung erfolgte die Bestimmung der Wiederholpräzision, durch die Analyse eines Fettsäurestandards unter identischen Bedingungen aus zehn aufeinander folgende Messungen. Aus diesen zehn Messungen wurde dann Mittelwerte, Variationskoeffizienten (V_k) und die Standardabweichung sowie die Minimal- und Maximalwerte für zehn zufällig ausgewählte Analyten ermittelt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Bestimmung der Gerätepräzision mit Hilfe zehn zufällig ausgewählter FAME (n=10)

	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1 t11	C18:2 c9,c12
MW, µg/ml	166.63	17.28	50.95	139.29	101.48
STABW	2.14	0.39	0.67	1.94	1.93
Min.	163.57	16.52	49.44	136.28	96.85
Max.	169.01	17.67	51.79	141.14	103.16
V_k	1.29	2.28	1.31	1.39	1.90

	C20:4 n6	C20:5 n3	C22:5 n6	C22:5 n3	C22:6 n3
MW, µg/ml	24.73	2.65	6.69	2.57	4.94
STABW	0.65	0.10	0.23	0.10	0.09
Min.	23.40	2.54	6.24	2.42	4.73
Max.	25.50	3.89	7.01	3.77	5.07
V_k	2.62	3.89	3.49	3.77	1.87

Messlinearität

Die Gerätelinearität beschreibt die Fähigkeit der Methode Ergebnisse zu liefern, die der Konzentration des Analyten direkt proportional sind. Die Linearität wurde durch visuellen Betrachtung der Kalibriergeraden und die Berechnung des Bestimmtheitsmaßes R^2 geprüft (Abbildung 14). Hierzu wurden Myristinsäure- (C14:0) und Palmintinsäuremethylster (C16:0) mit einer elektronischen Mikrowaage ausgewogen und in n-Hexan gelöst. Aus dieser Stocklösung wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt und sieben verschiedene Konzentrationen der Standards mittels des GC/FID gemessen. Dabei wurde jeweils eine Doppelbestimmung für jede Messung durchgeführt und der Mittelwert daraus bestimmt.

Die Kalibriergeraden und das jeweilige Bestimmtheitsmaß R^2 beider Analyten weisen auf eine sehr gute Messlinearität des Gerätes hin. Daher wurde auf die Überprüfung weiterer Analyten verzichtet.

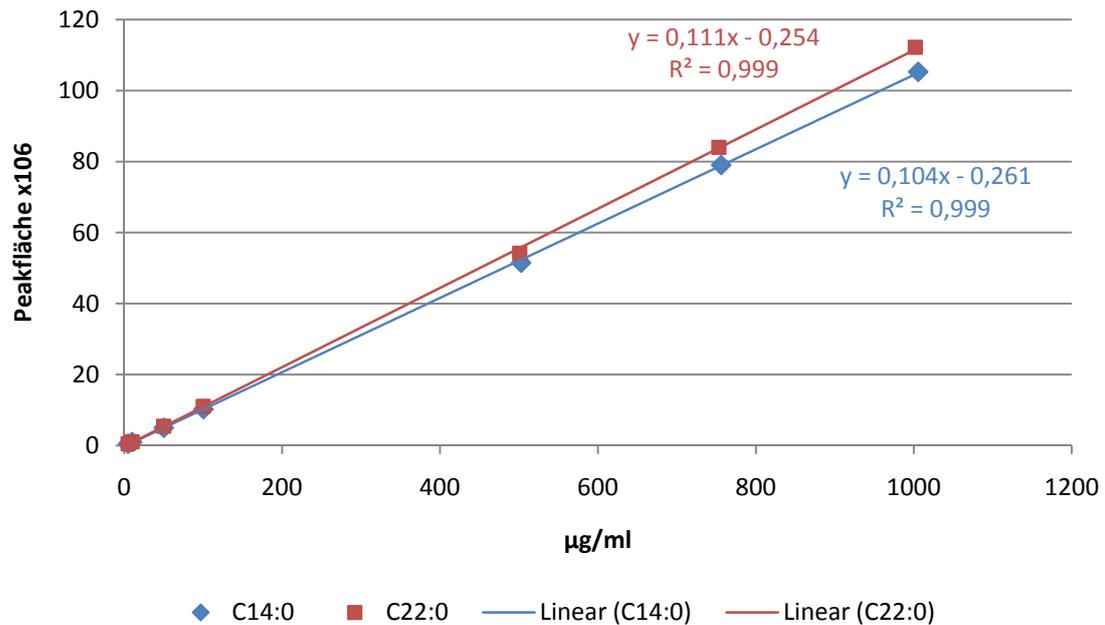


Abbildung 14: Kalibrationskurven und Bestimmtheitsmaße R^2 für C14:0 und C16:0 in Hexan

Responsefaktor-Kalibrierung

Der Flammenionisationsdetektor (FID) spricht selektiv auf den organisch gebundenen Kohlenstoff in der Gruppe der Kohlenwasserstoffe an. In erster Näherung ist das Messsignal des Detektors der Anzahl der Kohlenwasserstoffe im Trägergas proportional. Zu beachten ist jedoch, dass der FID abhängig von der Molekülstruktur ein unterschiedliches Ansprechverhalten besitzt. Um dieses unterschiedliche Ansprechverhalten zu quantifizieren wurden im Jahr 1964 die theoretischen Responsefaktoren von Ackman und Sipos (Ackman RG and Sipos JC, 1964) bestimmt.

Da die Responsefaktoren u.a. von Gasflüssen und der Detektorgeometrie abhängig sind, müssen diese für jedes Gerät einzeln kalibriert werden oder mit den theoretischen Responsefaktoren verglichen werden.

Für die Bestimmung der empirischen Responsefaktoren des verwendeten GC/FID-Systems wurden fünf geradzahlige Fettsäuremethylester C14:0 bis C22:0 gleichermaßen in n-Hexan eingewogen und mit Hilfe des GC/FID gemessen. Anhand des Chromatogramms wurden die prozentualen Flächenanteile der einzelnen Fettsäuremethylester bestimmt und mit den zu erwartenden Prozentanteilen aus der Einwaage verglichen. Aus diesem Vergleich konnten dann die Responsefaktoren berechnet werden. Die berechneten Responsefaktoren wurden dann mit den theoretischen Responsefaktoren von Craske und Bannon (s. Tabelle im Anhang

IV) verglichen und im Diagramm (Abbildung 15) aufgetragen. Zusätzliche Berechnungen ergaben, dass die totale prozentuale Abweichung der empirischen Responsefaktoren mit 1,9 % sehr gering ist.

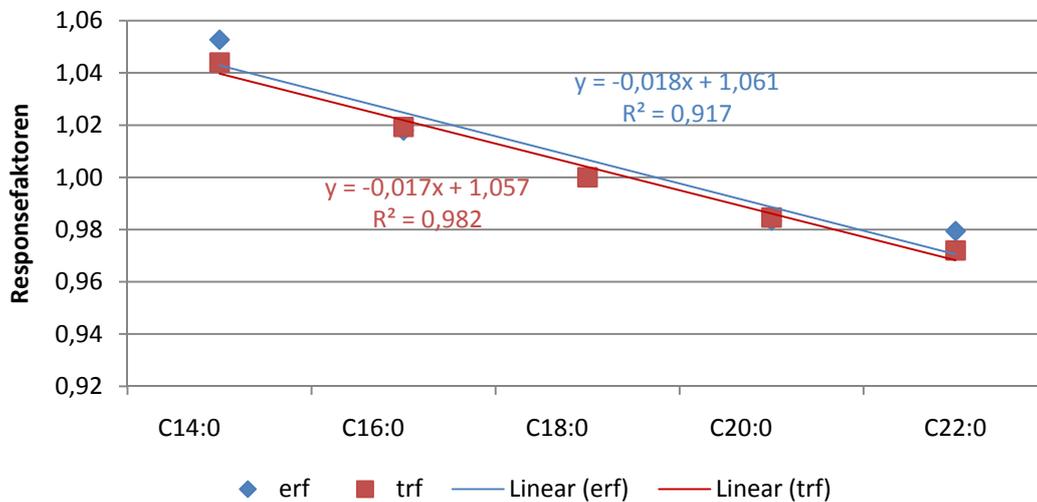


Abbildung 15: Vergleich von theoretischen Responsefaktoren (trf) mit empirischen Responsefaktoren (erf)

3.1.2 Methodenvalidierung

Nach der Überprüfung der Validität des gaschromatographischen Analysesystems folgte die Evaluierung der gesamten Methode inklusive aller Schritte der Prä-Analytik, wie die Extraktion und die Derivatisierung der Fettsäuren. Die Ergebnisse dazu werden im Folgenden vorgestellt:

Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden

Um die optimale Effektivität der Fettsäureextraktion aller biologisch bedeutsamen Fettsäuren zu gewährleisten, wurden die in der Literatur am meisten beschriebenen Lipidextraktionen nach Folch et al. (Folch J et al., 1957), Hara & Radin (Hara A and Radin NS, 1978) und Bligh & Dyer (Bligh EG and Dyer WJ, 1959) miteinander verglichen. Die Effektivität der Extraktion wurde anhand der einzelnen Fettsäureausbeuten bewertet und mit der am häufigsten verwendeten Methode nach Folch et al. verglichen und auf statistisch signifikante Unterschiede geprüft.

Die Fettsäuren im Serum wurden mit der jeweiligen Extraktionsmethode nach Folch et al., Hara & Radin und Bligh & Dyer isoliert und anschließend wie in Kap. 2.1.2.1 beschrieben zu Fettsäuremethylestern (FAME) derivatisiert. Die entstandenen FAMEs wurden mit Hilfe des GC/FID quantifiziert. Die statistische Analyse der Daten zeigte, dass keine statistisch

signifikanten Unterschiede in den Ausbeuten der Fettsäuren unabhängig der verwendeten Extraktionsmethode zu finden sind (Tabelle 7).

Als Nächstes wurden die Extraktionsausbeuten der Fettsäuren aus Erythrozytenmembranen gegenübergestellt (Tabelle 7). Zunächst wurden zehn Vollblutproben vereint, um ein größeres Probenvolumina zu erhalten. Im nächsten Schritt wurden die Erythrozyten aus jeweils 1 ml Vollblut aufgereinigt, konzentriert und hämolysiert. Anschließend wurden die Fettsäuren parallel mit den obengenannten Extraktionsverfahren extrahiert und wie in Kap. 2.1.2.2 dargestellt transmethyliert. Der Vergleich der beiden Methoden von Hara & Radin und Bligh & Dyer zeigte keine statistisch signifikanten Abweichungen in der Ausbeute der Fettsäuren. Demgegenüber zeigte der Vergleich dieser beiden Methoden mit der Extraktion nach Folch et al. Unterschiede in der Ausbeute einzelner Fettsäuren. Die Effizienz der Extraktion nach Folch et al. ist für überwiegenden Teil der gemessen Fettsäuren signifikant geringer. Während nur die drei Fettsäuren C20:0, C18:2 t10,c12 und C24:1 keine signifikant geringere Ausbeute aufweisen und in vergleichbaren Mengen aus den Erythrozytenmembranen extrahiert werden konnten.

Tabelle 7: Vergleich verschiedener Lipidextraktionsmethoden in Serum (µg/ml) und Erythrozytenmembranen (µg/ml)

MW Mittelwert (n=3), SEM Standardfehler (%), *signifikant unterschiedlich gegenüber Folch (p < 0.001)

Fettsäuren	Serum						Erythrozytenmembranen					
	Bligh & Dyer		Folch		Hara & Radin		Bligh & Dyer		Folch		Hara & Radin	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
C16:0	145.54	2.69	146.39	4.04	136.95	3.37	183.91 *	0.72	56.41	0.56	201.50 *	3.33
C16:1	21.88	0.48	23.57	1.81	20.56	0.05	3.57 *	0.01	1.12	0.11	4.00 *	0.07
C17:0	0.29	0.02	0.20	0.02	0.23	0.01	2.89 *	0.09	1.17	0.09	3.44 *	0.21
C18:0	51.01	0.71	50.89	0.62	45.35	0.90	138.88 *	10.24	25.62	0.33	169.05 *	6.16
C18:1 t9	0.40	0.17	0.93	0.10	0.39	0.05	1.44 *	0.14	0.18	0.18	2.77 *	0.53
C18:1 t11	1.29	0.23	0.37	0.01	0.80	0.27	144.97 *	7.72	47.62	2.54	167.78 *	5.22
C18:1 c9	140.12	3.14	141.19	1.43	142.37	3.40	12.55 *	0.58	5.00	1.04	14.58 *	0.42
C18:2 t9,t12	0.70	0.08	0.72	0.04	0.81	0.05	0.32 *	0.01	0.00	0.00	0.42 *	0.01
C18:2 c9,c12	121.16	3.13	116.14	1.00	112.69	1.75	90.64 *	3.46	31.96	2.23	109.53 *	1.93
C20:0	0.29	0.07	0.34	0.02	0.28	0.01	1.24	0.18	1.36	0.01	0.95	0.01
C18:3 n6	2.15	0.06	2.05	0.02	1.51	0.50	1.17 *	0.07	0.00	0.00	1.76 *	0.18
C18:3 n3	3.89	0.01	3.89	0.23	2.77	0.18	1.81 *	0.30	1.22	0.16	2.00 *	0.30
C18:2 c9,t11	1.23	0.03	2.50	0.82	1.80	0.12	0.79 *	0.03	0.53	0.02	0.93 *	0.02
C18:2 t10,c12	0.55	0.01	1.14	0.85	0.26	0.04	0.34	0.02	0.43	0.02	0.22	0.01
C20:2 n6	1.28	0.04	1.43	0.13	1.23	0.00	2.69 *	0.26	1.13	0.15	3.27 *	0.12
C20:3 n6	10.57	0.31	11.41	1.32	9.84	0.24	19.16 *	0.55	2.86	2.16	21.39 *	0.29
C20:4 n6	40.32	1.23	42.29	1.63	37.00	0.69	155.85 *	12.65	52.92	2.43	228.05 *	7.01
C22:4 n6	3.84	0.11	4.53	0.70	3.57	0.09	5.81 *	0.46	2.05	0.28	6.98 *	0.34
C24:1	0.34	0.19	0.61	0.10	0.53	0.10	0.37	0.07	0.59	0.18	0.15	0.15
C22:4 n6	0.49	0.10	0.61	0.10	0.48	0.14	34.15 *	0.43	12.54	0.84	48.12 *	7.05
C22:5 n3	3.97	0.12	4.07	0.06	3.40	0.18	22.58 *	2.04	9.43	0.78	125.17 *	13.56
C22:6 n3	9.13	0.39	9.50	0.24	9.12	0.27	42.72 *	3.91	10.74	0.45	48.26 *	0.55

Evaluation der Derivatisierungsmethoden

Im nächsten Schritt der Methodvalidierung wurde die Vollständigkeit der Derivatisierung der aus Serum, Erythrozytenmembranen und Kuhmilch extrahierten Fettsäuren zu Fettsäuremethylestern (FAME) überprüft. Dazu wurden die Bedingungen der Methylierungsverfahren für jede einzelne biologische Matrix konstant gehalten (s. Kap. 2.1.2). Die Derivatisierung der verschiedenen Lipidfraktionen

- Phospholipide (PL),
- freie Fettsäuren (FFA),
- Triglyceride (TG) und
- Cholesterolester (CE)

in ihre respektive Ester wurde mittels Dünnschichtchromatographie (DC) überprüft. Dafür wurden unbehandelte Lipidextrakte und transmethylierte Lipidextrakte punktförmig auf DC-Platten aufgetragen und in Laufmittel entwickelt. Die Lipidfraktionen konnten mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs visualisiert werden. Dadurch konnten die transmethylierten Lipidfraktionen und die nicht methylierten Kontrollen miteinander verglichen werden (Abbildung 16 A-C). Die visuelle Beurteilung der DC-Platten zeigte nur eine Bande für die FAME nach der jeweiligen Methylierung, damit konnte die Vollständigkeit der Derivatisierung nachgewiesen werden.

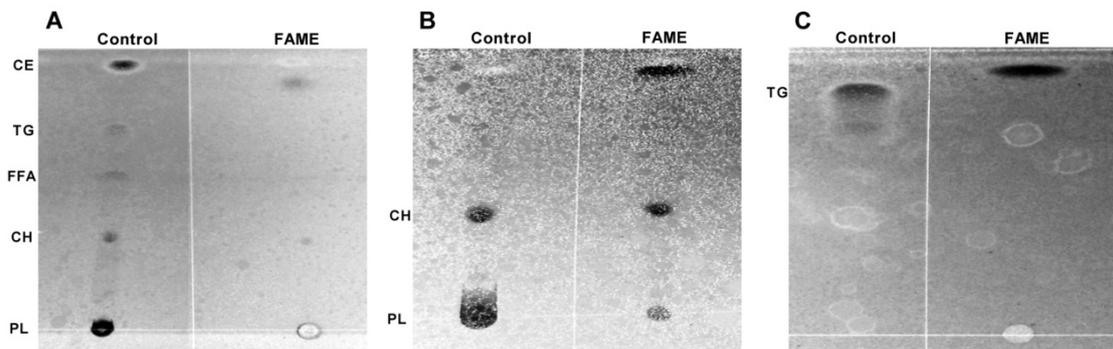


Abbildung 16: Dünnschichtchromatographie von unbehandelten (links) und transmethylierten (rechts) Lipidextrakten aus (A) Serum, (B) Erythrozytenmembranen und (C) Kuhmilch

CE Cholesterol, TG Triglyceride, FFA, freie Fettsäuren, CH Cholesterol, PL Phospholipide, FAME Fettsäuremethylester

Wiederfindung

Um eine quantitative Extraktion der Fettsäuren zu gewährleisten, wurden im nächsten Schritt der Methodvalidierung Aufstockungsexperimente durchgeführt. Die Vollständigkeit der Extraktion kann anhand der Wiederfindungsraten verschiedener Fettsäuren in Serum und Milch bewertet werden. Für die Aufstockungsversuche wurden physiologisch übliche quantitative Mengen der Fettsäuren ausgewählt, um zu überprüfen, ob die ausgewählte Extraktionsmethode für die Bestimmung natürlich vorkommender Fettsäurekonzentrationen geeignet ist.

Fettsäurebestimmung in Serum

Die physiologischen Konzentrationen von Arachidonsäure (C20:4 n6), Palmitinsäure (C16:0) und Stearinsäure (C18:0) (Tabelle 8) wurden in Vorversuchen durch Messungen mehrere Serum- und Kuhmilchproben ermittelt.

Tabelle 8: Physiologischen Fettsäurekonzentrationen in Serum und Kuhmilch

Fettsäuren	Serum µg/ml	Milch mg/ml
C20:4 n6	60	0,4
C16:0	140	---
C18:0	---	320

Im nächsten Schritt wurden die exakten physiologischen Aufstockungsmengen anhand von Doppelbestimmungen des jeweils in Hexan gelösten Standards mittels GC/FID bestimmt (Tabelle 9). Daraufhin wurden mit Hilfe der nun charakterisierten Standards ausgewählte Serumproben aufgestockt und die Wiederfindung überprüft.

Tabelle 9: Aufstockungsmengen von C20:4 n6 und C16:0 in Serum

ISTD Interner Standard, MW Mittelwert

	Arachidonsäure (C20:4 n6)				Palmitinsäure (C16:0)			
	ISTD		MW		ISTD		MW	
	Peakfläche	Peakfläche	µg/ml	µg/ml	Peakfläche	Peakfläche	µg/ml	µg/ml
25%	988542	818976	14,99	15,22	2085584	786065	32,94	33,04
	1030670	828244	15,45		2049101	767978	33,13	
50%	1996520	775990	31,95	32,63	4118293	781243	65,45	66,72
	2099279	782261	33,32		4169530	761477	67,99	
100%	3797035	796515	59,19	59,31	8427631	748722	139,76	137,32
	3866706	807878	59,43		8480363	780648	134,88	

Zur Ermittlung und Berechnung der Wiederfindungsraten (Tabelle 10) wurde die Differenz der gemessenen Fettsäuren in nativen und aufgestockten Serumproben ermittelt. Diese Differenz wurde mit den Aufstockungsmengen (Tabelle 9) verglichen und daraus die Wiederfindungsraten berechnet. Die Ergebnisse zeigten, dass die beiden addierten Fettsäuren Arachidonsäure und Palmitinsäure mit nahezu 100 % wiedergefunden werden konnten.

Tabelle 10: Wiederfindungsraten (n=4) von C20:4 n6 und C16:0 in Serum
WF, Wiederfindung; STABW, Standardabweichung; MW, Mittelwert

n	Arachidonsäure (C20:4 n6)					Palmitinsäure (C16:0)				
	Nullwert µg/ml	Gesamt- AA µg/ml	Differenz	WF %	STABW %	Nullwert µg/ml	Gesamt- C16:0 µg/ml	Differenz	WF %	STABW %
	25%					25%				
1	32,2	47,9	15,8	103,7		97,7	129,1	31,4	95,2	
2	32,3	47,2	14,9	98,1		94,4	131,4	36,9	111,7	
3	32,3	46,2	13,9	91,2		98,6	129,0	30,4	92,0	
4	32,9	47,3	14,4	94,6		98,2	130,7	32,4	98,2	
MW	32,4	47,2	14,7	96,9	5,3	97,2	130,0	32,8	99,3	8,7
	50%					50%				
1	32,2	365,1	201,0	101,1		97,7	160,7	63,1	94,5	
2	32,3	374,9	209,8	105,5		94,4	164,6	70,2	105,2	
3	32,3	363,4	201,4	101,3		98,6	169,2	70,6	105,9	
4	32,9	66,8	33,9	103,8		98,2	169,6	71,4	107,0	
MW	32,4	292,5	161,5	102,9	2,1	97,2	166,0	68,8	103,1	5,8
	100%					100%				
1	32,2	91,2	59,0	99,5		97,7	236,1	138,4	100,8	
2	32,3	92,8	60,5	102,0		94,4	239,8	145,4	105,9	
3	32,3	91,2	58,9	99,2		98,6	234,3	135,8	98,9	
4	32,9	90,7	57,8	97,5		98,2	234,6	136,4	99,3	
MW	32,4	91,5	59,0	99,5	1,9	97,2	236,2	139,0	101,2	0,8

Zur Überprüfung der Linearität der Extraktion wurden lineare Regressionsanalysen (Abbildung 17) basierend auf einer 3-Punktkalibrierungskurve durchgeführt. Die Betrachtung der Determinationskoeffizienten R² und dem Schnittpunkt mit der x-Achse zeigte, dass es sich um eine lineare Extraktion im physiologischen Arbeitsbereich handelt. Für die 3-Punktkalibrierungskurve wurden 100 %, 50 % und 25 % der physiologischen Konzentrationen von C20:4 n6 und C16:0 verwendet.

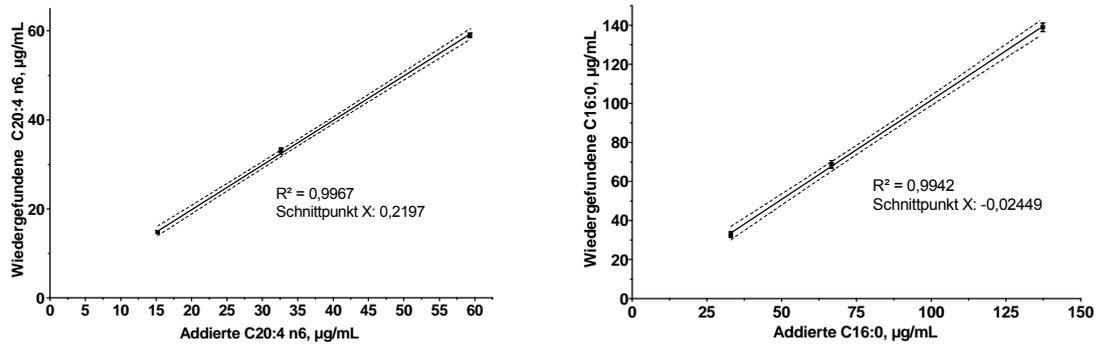


Abbildung 17: Lineare Regression der Wiederfindung (n=4) für C20:4 n6 und C16:0 in Serum

R² Determinationskoeffizient, 95% Konfidenzintervall (gestrichelte Linie)

Fettsäurebestimmung in Kuhmilch

Parallel wurde die Wiederfindung bzw. die quantitative Extraktion der Fettsäuren aus Kuhmilch überprüft. Dafür wurden native Kuhmilchproben exemplarisch mit Arachidonsäure (C20:4 n6) und Stearinsäure (C18:0) aufgestockt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Aufstockungsmengen von C20:4 n6 und C18:0 in Kuhmilch

ISTD, Interner Standard; MW, Mittelwert

	Arachidonsäure (C20:4 n6)				Stearinsäure (C18:0)			
	ISTD		MW	MW	ISTD		MW	MW
	Peakfläche	Peakfläche			µg/ml	µg/ml		
25%	988542	818976	15,0	99,5	27115460	85529	78,7	77,5
	1030670	828244	15,5		27280894	88850	76,2	
50%	1996520	775990	31,9	198,9	56769753	87044	162,0	172,9
	2099279	782261	33,3		65592916	88555	183,9	
100%	3797035	796515	59,2	396,7	111499460	87432	316,7	319,2
	3866706	807878	59,4		111489186	85894	322,3	

Die Wiederfindungsraten von Arachidonsäure (AA, C20:4 n6) und Stearinsäure (C18:0) (Tabelle 12) wurden analog zu den Bestimmungen der Wiederfindungsraten in Serum ermittelt.

Tabelle 12: Wiederfindungsraten (n=4) von C20:4 n6 und C18:0 in Kuhmilch
 WF, Wiederfindung; STABW, Standardabweichung; MW, Mittelwert

n	Arachidonsäure (C20:4 n6)					Stearinsäure (C18:0)				
	Nullwert µg/ml	Gesamt- AA µg/ml	Differenz	WF %	STABW %	Nullwert mg/ml	Gesamt- C16:0 mg/ml	Differenz	WF %	STABW %
	25%					25%				
1	164,1	261,4	97,3	97,8		11,4	19,3	7879,2	101,7	
2	165,2	265,4	100,2	100,7		11,4	19,5	8100,3	104,5	
3	162,0	265,3	103,3	103,8		11,4	19,5	8157,9	105,3	
MW	163,7	264,0	100,3	100,8	3,0	11,4	19,4	8045,8	103,8	1,9
	50%					50%				
1	164,1	63,3	31,2	95,5		11,4	29,0	17603,9	101,8	
2	165,2	66,6	34,3	105,1		11,4	28,9	17580,6	101,7	
3	162,0	64,8	32,5	99,5		11,4	29,0	17689,9	102,3	
MW	163,7	64,9	32,6	100,0	4,8	11,4	29,0	17624,8	101,9	0,3
	100%					100%				
1	571,9	407,8	102,8	99,5		11,4	43,2	31788,0	99,5	
2	574,4	409,2	103,2	102,0		11,4	43,4	32001,3	100,2	
3	573,2	411,2	103,7	99,2		11,4	43,6	32240,3	100,9	
MW	573,1	409,4	103,2	100,2	1,5	11,4	43,4	32009,9	100,2	0,2

Gleichermaßen wie im Serum wurde die Linearität der Extraktion in Kuhmilch durch lineare Regressionsanalysen nachgewiesen werden. Zur Bewertung der Linearität wurden die Determinationskoeffizienten R^2 und der Schnittpunkt mit der x-Achse. Außerdem konnte die Linearität durch visuelle Überprüfung der Abbildung 18 bestätigt werden.

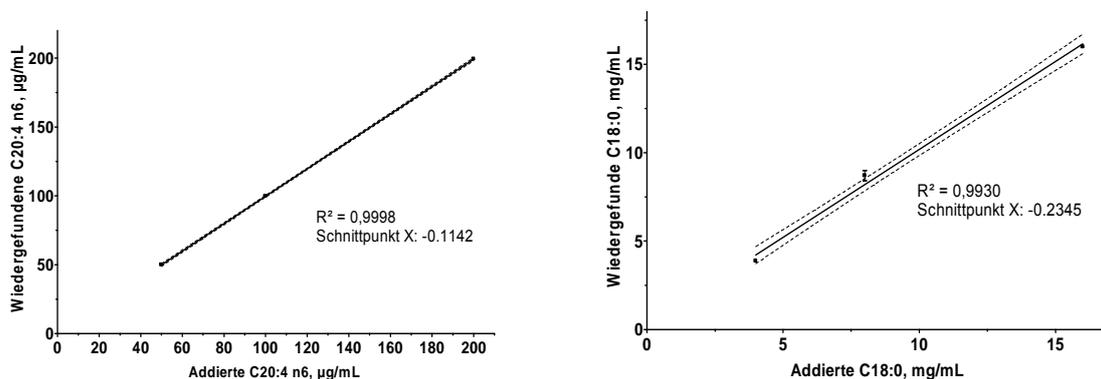


Abbildung 18: Lineare Regression der Wiederfindung (n=4) für C20:4 n6 und C16:0 in Serum

R² Determinationskoeffizient, 95% Konfidenzintervall (gestrichelte Linie)

Methodenpräzision

Als Maß der Reproduzierbarkeit und Reliabilität der Methode erfolgte die Bestimmung der Wiederholpräzision in Serie „*intra assay*“ und von Tag zu Tag „*inter assay*“ unter identischen Bedingungen. Im Gegensatz zur Messpräzision beschreibt die Methodenpräzision die Streuung der Ergebnisse, die durch alle Schritte der Methode verursacht werden. Die Messpräzision beschreibt dagegen nur die Schwankungen, die durch das Analysengeräte selbst verursacht werden. Im nächsten Abschnitt werden die Ergebnisse der Präzisionsanalysen anhand fünf exemplarisch ausgewählter Fettsäuren präsentiert. Die Daten der weiteren 42 Analyten befinden sich im Anhang V und VI dieser Arbeit.

Fettsäureanalysen in Serum

Die Überprüfung der Präzision in Serie ergab die in Tabelle 13 aufgeführten Variationskoeffizienten V_K . Darüber hinaus wurden der Mittelwert, die Standardabweichung, der minimale und maximale Werte der zehnfachen Messungen ermittelt. Hierzu wurden exemplarisch die fünf Analyten Stearinsäure, Linolsäure, α -Linolensäure, Arachidonsäure und Docosahexaensäure ausgewählt, die ein Spektrum von 0,13 bis 120 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ Serum abbilden. Die Variationskoeffizienten aller anderen Analyten variieren zwischen 7 % und 14 % (s. Anhang V und VI).

Tabelle 13: Präzision in Serie in Serum
MW, Mittelwert; STABW, Standardabweichung; VK, Variationskoeffizient

	C18:0 <i>$\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$</i>	C18:2 c9,c12 <i>$\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$</i>	C18:3 n3 <i>$\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$</i>	C20:4 n6 <i>$\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$</i>	C22:6 n3 <i>$\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$</i>
MW	49,04	120,05	0,13	29,05	5,62
STABW	3,95	9,81	0,02	2,24	0,43
MIN	45,14	111,16	0,11	26,86	5,13
MAX	56,32	141,83	0,15	34,27	6,53
VK	8,05	8,17	11,52	7,71	7,73

Die Abbildung 19 stellt den Verlauf der Präzision von Tag zu Tag verschiedener Analyten als Kurve dar. Des Weiteren sind die Bereiche der positiven bzw. negativen einfachen (1σ), zweifachen (2σ) und dreifachen (3σ) Standardabweichung eingezeichnet. Alle Messwerte der ausgewählten Analyten liegen im Bereich der zweifachen Standardabweichung.

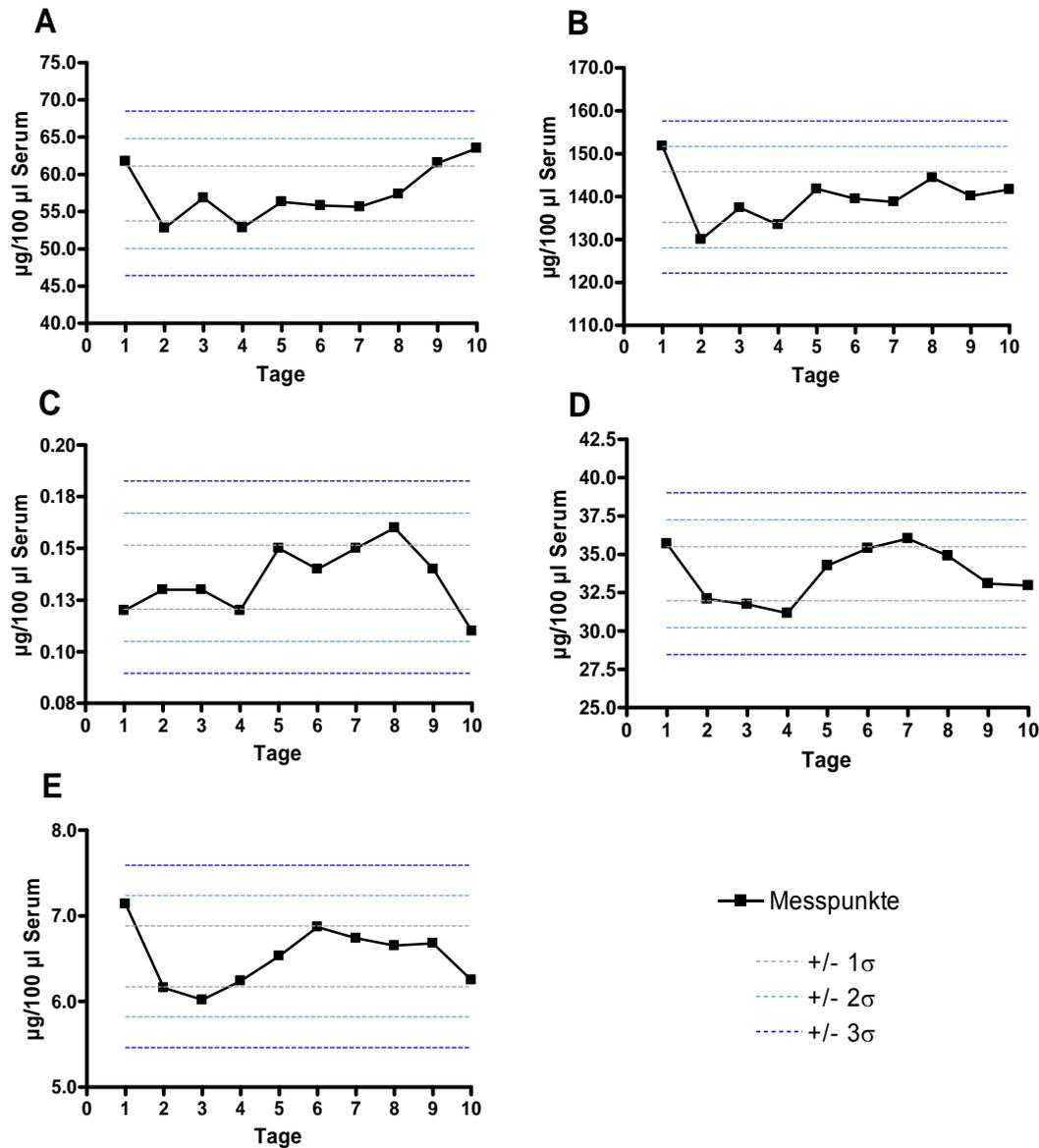


Abbildung 19: Präzision von Tag zu Tag in Serum für (A) C18:0, (B) C18:2 c9,c12, (C) C18:3 n3, (D) C20:4 n6 und (E) C22:6 n3

Des Weiteren wurde durch die Aufarbeitung und Bestimmung der gleichen Serumprobe unter identischen Bedingungen, an zehn aufeinander folgenden Tagen, die Reproduzierbarkeit der Methode mittels Variationskoeffizienten V_k bestimmt (Tabelle 14).

Mit Hilfe des Trendtests nach Neumann wurde überprüft, ob die Messwerte der Wiederholmessungen im zeitlichen Verlauf fallen oder ansteigen. Als Maß für den Trendtest wurde die statistische Größe Q ermittelt. Diese Größe Q wurde dann mit dem entsprechenden Tabellenwert bei einem Signifikanzniveau $P = 95\%$ verglichen. Der Tabellenwert entsprach für die Anzahl der Messwerte $n=10$ dem Wert 1.0623. Die Analysen zeigten, dass zur 95%igen

Sicherheit keine Trends in den durchgeführten Wiederholungsmessungen vorliegen, da alle Q-Werte der fünf Analyten oberhalb des entsprechenden Tabellenwerts lagen (Tabelle 14).

Tabelle 14: Präzision von Tag zu Tag in Serum und Trendtest nach Neumann
MW, Mittelwert; STABW, Standardabweichung; VK, Variationskoeffizient; Q, P(95%, n=10) bei 1,0623

	C18:0 <i>µg/100 µl</i>	C18:2 c9,c12 <i>µg/100 µl</i>	C18:3 n3 <i>µg/100 µl</i>	C20:4 n6 <i>µg/100 µl</i>	C22:6 n3 <i>µg/100 µl</i>
MW	57,44	139,91	0,14	33,73	6,53
STABW	3,68	5,91	0,02	1,75	0,36
MIN	52,80	130,03	0,11	31,16	6,02
MAX	63,50	151,78	0,16	36,02	7,14
VK	6,41	4,23	11,38	5,20	5,45
Q	1,22	2,13	1,15	1,06	1,28

Fettsäureanalysen in Erythrozytenmembranen

Entsprechend der Präzisionsüberprüfungen der Fettsäurebestimmung im Serum wurde ebenfalls die Präzision in Serie in Erythrozytenmembranen geprüft. Die parallele Aufarbeitung und Messung von zehn Proben zeigte nur geringe Variationen für fünf ausgewählte Analyten (Tabelle 15). Die weiteren Variationskoeffizienten V_k der sonstigen Fettsäuren lagen in der gleichen Größenordnung wie die V_k der exemplarisch ausgewählten Analyten (s. Anhang V und VI).

Tabelle 15: Präzision in Serie in Erythrozytenmembranen
MW Mittelwert; STABW, Standardabweichung; VK, Variationskoeffizient

	C18:0 <i>µg/ml</i>	C18:2 c9,c12 <i>µg/ml</i>	C18:3 n3 <i>µg/ml</i>	C20:4 n6 <i>µg/ml</i>	C22:6 n3 <i>µg/ml</i>
MW	56,19	40,50	2,16	79,04	17,16
STABW	4,37	2,87	0,11	5,17	0,88
MIN	49,10	33,65	1,96	73,11	15,80
MAX	62,54	43,16	2,29	88,08	18,49
VK	7,78	7,08	5,01	6,55	5,13

In Abbildung 20 sind die Verläufe der Präzision von Tag zu Tag von fünf Fettsäuren an zehn verschiedenen Tagen sowie die Bereiche der einfachen, zweifachen und dreifachen Standardabweichung dargestellt. Gleichmaßen wie die Ergebnisse der Wiederholungsmessungen in Serie zeigten die Messungen von Tag zu Tag ebenfalls nur geringe Variationen in den Konzentrationen der zu bestimmenden Analyten.

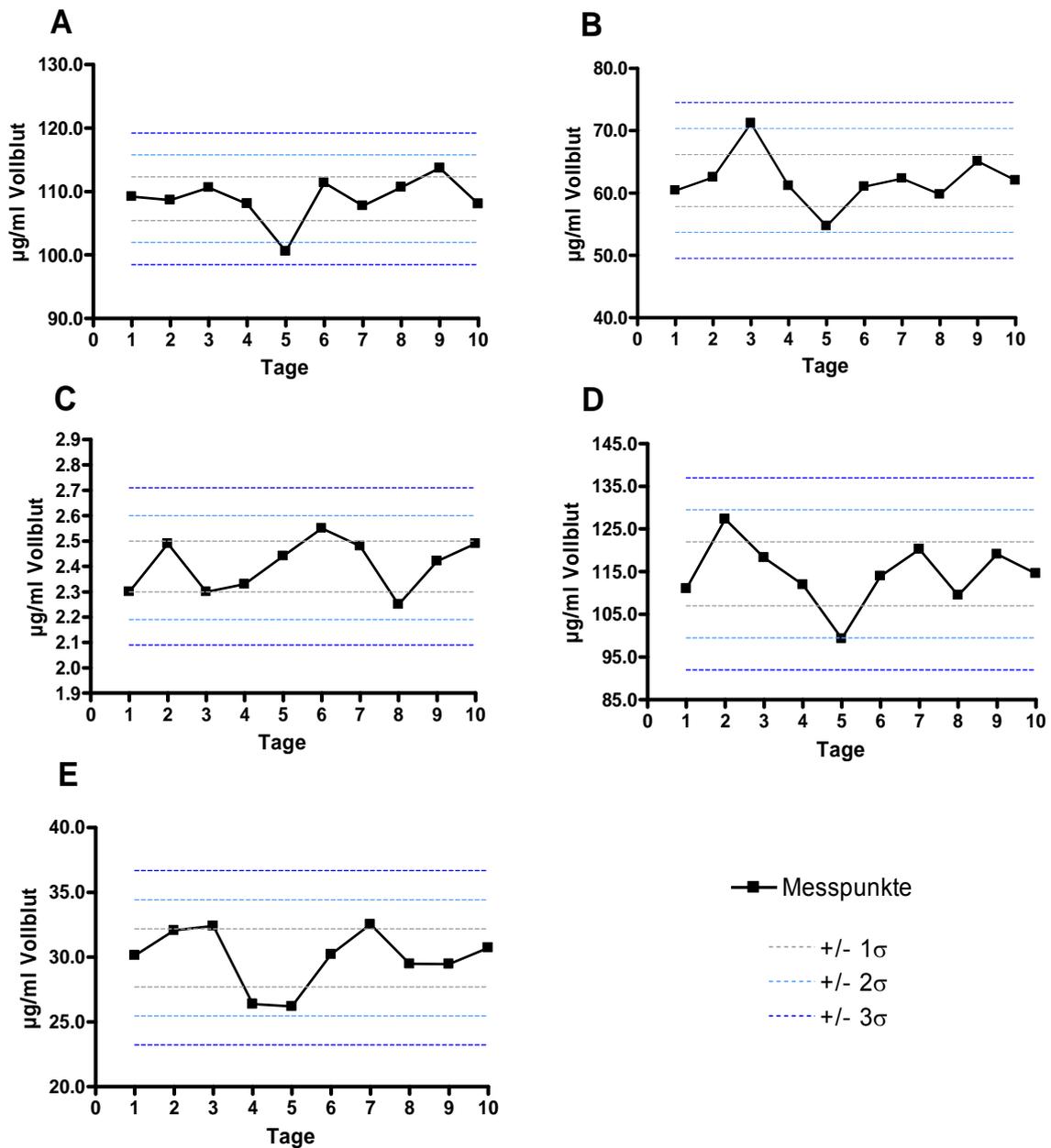


Abbildung 20: Präzision von Tag zu Tag in Erythrozytenmembranen für (A) C18:0, (B) C18:2 c0,c12, (C) C18:3 n3, (D) C20:4 n6 und (E) C22:6 n3

In der Tabelle 16 sind die exakten V_K der zu bestimmenden Analyten zusammengefasst. Analog zu den vorherigen Präzisionsanalysen wurden die Daten hier auf ein mögliches Trendverhalten durch den Test nach Neumann untersucht. Die Überprüfung der Q-Werte zeigte auch dieses Mal, dass Wiederholungsmessungen keinem Trend folgen.

Tabelle 16: Präzision von Tag zu Tag in Erythrozytenmembranen und Trendtest nach Neumann
 MW, Mittelwert; STABW, Standardabweichung; VK, Variationskoeffizient; Q, P(95%, n=10) bei 1,0623

	C18:0 µg/ml	C18:2 c9,c12 µg/ml	C18:3 n3 µg/ml	C20:4 n6 µg/ml	C22:6 n3 µg/ml
MW	108,87	62,03	2,40	114,54	29,95
STABW	3,45	4,16	0,10	7,50	2,24
MIN	100,59	54,72	2,25	99,34	26,19
MAX	113,67	71,17	2,55	127,30	32,52
VK	3,17	6,71	4,28	6,55	7,48
Q	2,30	1,97	2,02	2,03	1,61

Fettsäureanalysen in Kuhmilch

Abschließend wurde die Streuung (Präzision) der Kuhmilchfettsäureanalysen überprüft. Dafür wurde wie zuvor zum Einen die Präzision in Serie und zum Anderen die Präzision von Tag zu Tag bestimmt. Die Ergebnisse dieser Analysen werden im Folgenden präsentiert.

In der Tabelle 17 sind die Variationskoeffizienten für die Fettsäurebestimmung in Kuhmilch zusammengestellt. Die Ergebnisse aller weiteren nicht aufgeführten Analyten sind dem Anhang zu entnehmen (s. Anhang V und VI).

Tabelle 17: Präzision in Serie in Kuhmilch
 MW, Mittelwert; STABW, Standardabweichung; VK, Variationskoeffizient

	C18:0 µg/ml	C18:2 c9,c12 µg/ml	C18:3 n3 µg/ml	C20:4 n6 µg/ml	C22:6 n3 µg/ml
MW	57,44	139,91	0,14	33,73	6,53
STABW	3,68	5,91	0,02	1,75	0,36
MIN	52,80	130,03	0,11	31,16	6,02
MAX	63,50	151,78	0,16	36,02	7,14
VK	6,41	4,23	11,38	5,20	5,45

Mit Hilfe der Standardabweichung und der Variationskoeffizienten, lässt sich ebenso wie in den vorherigen Analysen in Serum und Erythrozytenmembranen die Genauigkeit bzw. die Präzision der Fettsäureanalysen in Kuhmilch beurteilen. Wie in Abbildung 20 dargestellt, liegen alle Messwerte innerhalb des Bereiches der zweifachen Standardabweichung (2σ).

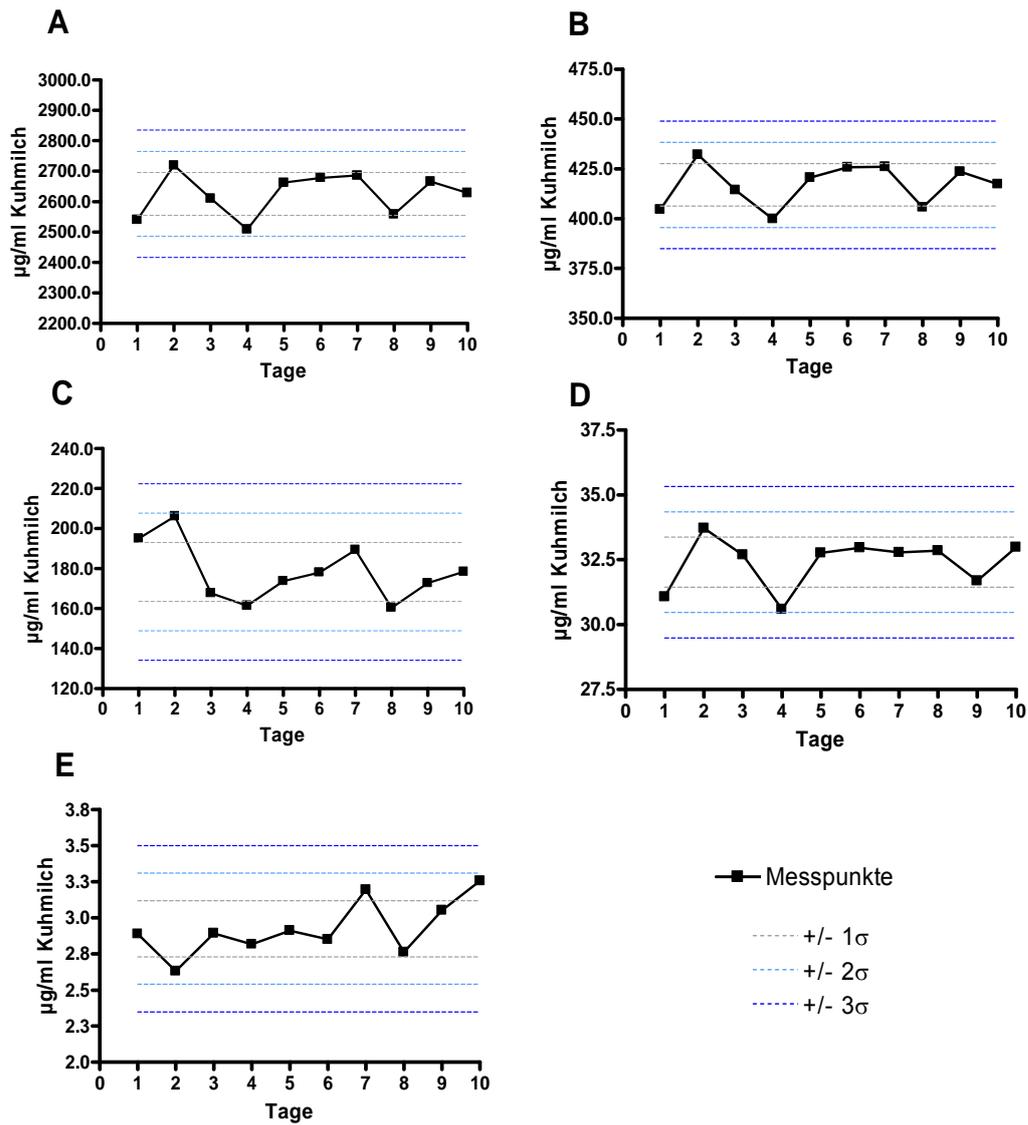


Abbildung 21: Präzision von Tag zu Tag in Kuhmilch für (A) C18:0, (B) C18:2 c9,c12, (C) C18:3 n3, (D) C20:4 n6 und (E) C22:6 n3

Während in Abbildung 20 die Präzision anhand der Standardabweichung beurteilt wurde, zeigten ebenso die in Tabelle 18 aufgeführten V_k , dass es sich um eine störungsfreie Bestimmung handelt.

Tabelle 18: Präzision von Tag zu Tag in Kuhmilch und Trendtest nach Neumann

MW, Mittelwert; STABW, Standardabweichung; VK, Variationskoeffizient; Q, P(95%, n=10) bei 1,0623

	C18:0 µg/ml	C18:2 c9,c12 µg/ml	C18:3 n3 µg/ml	C20:4 n6 µg/ml	C22:6 n3 µg/ml
MW	2625,72	416,96	178,33	32,41	2,93
STABW	69,72	10,68	14,70	0,97	0,19
MIN	2508,68	399,84	160,45	30,59	2,63
MAX	2719,05	432,13	206,17	33,72	3,26
VK	2,66	2,56	8,25	3,00	6,56
Q	2,45	2,45	1,52	2,93	1,77

Methodenlinearität

Im nächsten Schritt der Methodenvalidierung wurde die Linearität der Fettsäureextraktion mittels einer 4-Punkt-Kalibrierkurve verifiziert. Hara und Radin beschrieben in ihrer 1978 publizierten Methode zur Extraktion von Fettsäuren aus Gehirnen von Nagern, das optimale Verhältnis von Extraktionsreagenz und Probenvolumen mit 18:1 (Hara A and Radin NS, 1978). Damit war sichergestellt, dass die Ausbeute der Fettsäuren ideal war. Die Linearität der Extraktion wurde anhand der zuvor ausgewählten Fettsäuren Stearin-, Linol-, α -Linolen-, Arachidon- und Docosahexaensäure beurteilt.

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurde daher die Anfälligkeit (Robustheit) der Extraktion durch schrittweise Reduzierung des obengenannten Verhältnisses überprüft. Dafür wurde das Volumen des Extraktionsreagenz konstant gehalten und die Probenmenge erhöht, um das obengenannte Verhältnis in vier Schritten auf 12,5:1 verringern.

Als Maß der Linearität dienen der Determinationskoeffizient R^2 und die visuelle Bewertung der Regressionsgeraden (Abbildung 22A-C). Die Regressionsanalysen sowie die visuelle Beurteilung zeigten, dass die Extraktion der Fettsäuren aus den drei verschiedenen biologischen Matrices (Serum, Erythrozyten und Kuhmilch) durch die Reduzierung des Verhältnis von Extraktionsreagenz zu Probenvolumen nicht beeinträchtigt wurden.

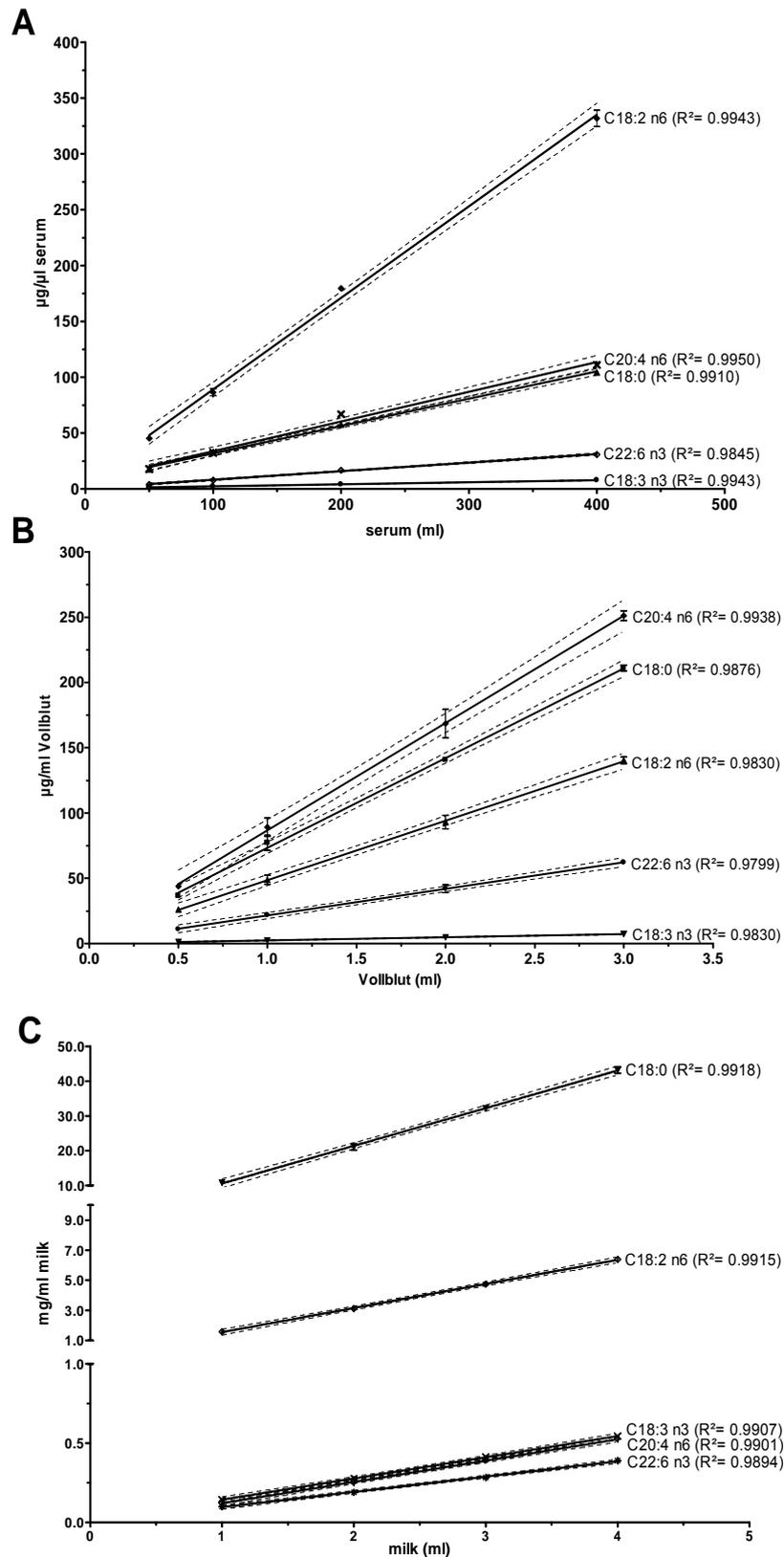


Abbildung 22: Methodenlinearität (A) Serum, (B) Erythrozytenmembranen und (C) Kuhmilch

Die Methodenlinearität wurde anhand einer 4-Punktkalibrierkurve aus dem Mittelwert ($n=3$) der Messungen \pm Standardfehler (schwarze Linie) und des Konfidenzintervalls $P=95\%$ (gestrichelte Linie) überprüft. Die Determinationskoeffizienten R^2 der Linearen Regression werden ebenfalls dargestellt.

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweis- (NWG) und Bestimmungsgrenze (BG) einer Analysenmethode bezeichnen die kleinste erfassbaren Mengen für den Nachweis und die Quantifizierung einer vorgegebenen Richtigkeit und Präzision (Kromidas, 1999).

Im Falle der Chromatographie ist die Nachweisgrenze diejenige Konzentration, bei welcher der Analytenpeak deutlich vom Hintergrundrauschen der Basislinie differenzierbar ist. Für diese Methode wird ein minimales Verhältnis von 3:1 für die NWG und 10:1 für die BG zwischen Peak und Grundrauschen postuliert. Zur Ermittlung des Grundrauschens wurde die zehnfache Breite der Peakbasis verwendet.

Zur Ermittlung der NWG und der BG wurde jeweils eine Probe jeder biologischen Matrix aufgearbeitet und zehnmal gemessen. Die NWG und die BG wurde anhand der Linolsäure (C18:2 c9, c12) ermittelt (Tabelle 19). Für die anderen Fettsäuren innerhalb der identischen biologischen Matrix können vergleichbare Nachweis- und Bestimmungsgrenzen angenommen werden, da sie sich von ihren strukturellen und biologischen Eigenschaften nicht unterscheiden und das Detektorsignal proportional zur Substanzmenge ist.

Tabelle 19: Nachweis- (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BG) in Serum, Erythrozytenmembranen und Kuhmilch

Matrix	NWG ng/ml	STABW %	BG µg/ml	STABW %
Serum	598,96	128,05	2,00	0,43
Erythrozytenmembran	179,98	43,51	0,54	0,13
Kuhmilch	610,13	181,97	2,03	0,61

Probenstabilität

Um die Stabilität der Proben über einen längerfristigen Lagerzeitraum bei -80°C sicherstellen, wurde eine sechswöchige Untersuchung der Stabilität durchgeführt. Dafür wurden die Proben entsprechenden der Vorschriften (s. Kap. 2.1.1 und Kap. 2.1.2) aufgearbeitet, in n-Hexan gelöst und daraufhin in Probengefäßen mit PTFE/Silikon Septum verschlossen. Die Konzentrationen verschiedener Fettsäuremethylester (FAME) wurden an den Tagen 0, 7, 14, 21, 28 und 35 gemessen und in Abbildung 23 dargestellt. Beispielhaft wurden sieben FAME repräsentativ für die verschiedenen Fettsäuregruppen, wie gesättigte, einfach ungesättigte und mehrfach ungesättigte Fettsäuren, ausgewählt. Die statistische Analyse mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (*One-way ANOVA*) zeigte keine signifikanten Unterschiede in den Konzentrationen der FAME zwischen den verschiedenen Messzeitpunkten.

Mit Hilfe des Trendtest nach Neumann wurde überprüft, ob die Messwerte der verschiedenen Zeitpunkte im zeitlichen Verlauf fallen oder ansteigen. Dafür wurden die Größe Q für die Verläufe der sieben FAME ermittelt. Diese Größe Q wurde dann mit dem entsprechenden Tabellenwert bei einem Signifikanzniveau P = 95 % verglichen. Der Tabellenwert entsprach für die Anzahl der Messwerte n=36 dem Wert 1,4656. Der Vergleich zeigte, dass die zeitlichen Verläufe von Linol-, α -Linolen-, Eicosapentaen- (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) einen geringfügigen Trend aufweisen, aber jedoch meist nach sechs Wochen im Bereich der Variationskoeffizienten der Messung liegen.

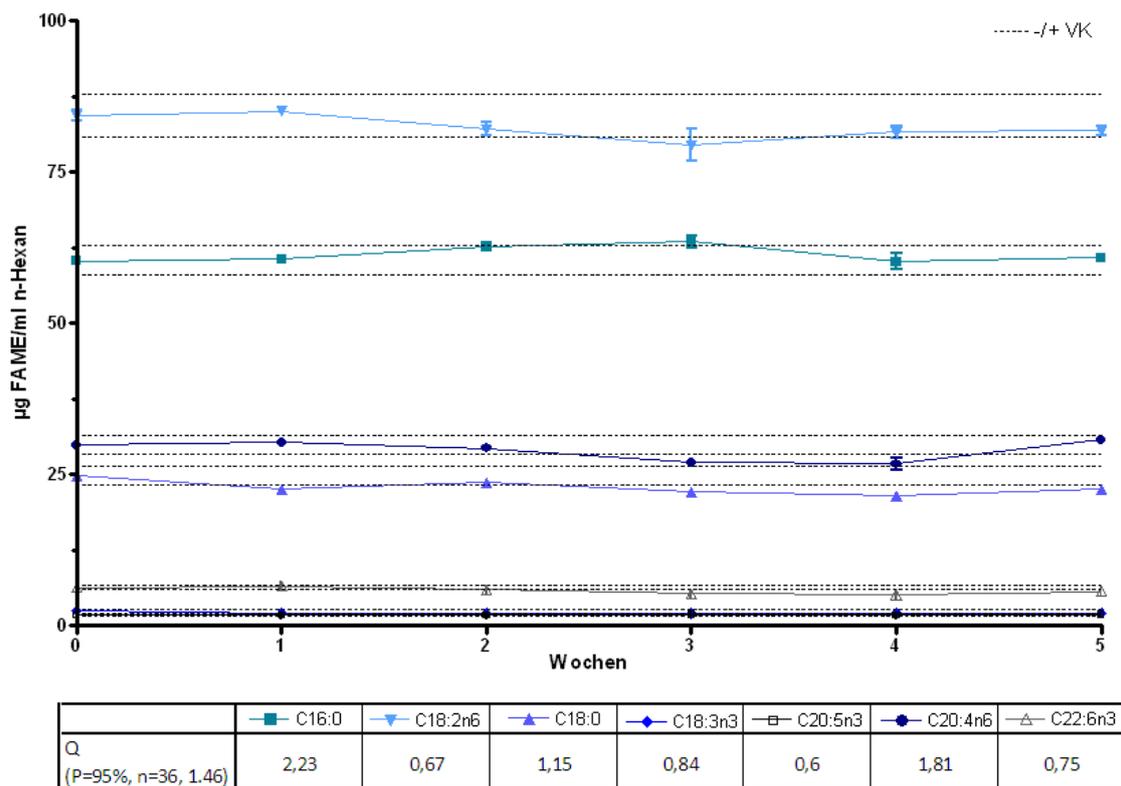


Abbildung 23: Stabilität der aufbereiteten Fettsäuremethylester (FAME)

Mittelwerte (n=3) der Messungen \pm Standardfehler sowie die Bereiche der positiven und negativen Variationskoeffizienten (\pm VK, gestrichelte Linie)

3.2 Epidemiologische Analysen zur Rolle von Fettsäuren aus der Kuhmilch in der Entwicklung von Allergie und Asthma bronchiale

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der epidemiologischen Analysen innerhalb der in die PASTURE/Efrain-Studie eingebetteten Fall-Kontroll-Studie präsentiert.

3.2.1 Charakterisierung der Fall-Kontroll-Studie

Zur Durchführung von Analysen im Rahmen der PASTURE/Efrain-Studie wurde zum Zeitpunkt von vier Jahren ($n=994$) eine Fall-Kontroll-Studie (FKS, $n=160$) in die Kohortenstudie eingebettet. Da jedoch zu diesem frühen Zeitpunkt der Studie noch keine ärztliche Diagnose für Asthma vorlag, wurde mit Hilfe der Fragebögen eine stellvertretende Variable für Asthma erstellt. Die Auswahlkriterien für die Fälle lauteten: „Auftreten von Giemen im Alter zwischen drei und vier Jahren“ und „Behandlung mit Asthmamedikamenten“ und „Auftreten von zumindest einem Bronchitis-Anfall“. Für die Kontrollen galten folgenden Kriterien: „Niemals eine Asthmad Diagnose“ und „Niemals ein Bronchitis-Anfall aufgetreten“ und „Zu keiner Zeit die Behandlung mit Asthmamedikamenten und das Auftreten von Giemen“. Die Gesamtkohorte wurde anhand dieser Auswahlkriterien in drei Populationen unterteilt, um die Fälle und Kontrollen der FKS auszuwählen. Zum Ersten in die Population ($N_1=180$), die die alle Kriterien der Fälle erfüllt und zum Zweiten in die Population ($N_2=407$), die die alle Kriterien der Kontrollen erfüllt, während die dritte Population ($N=407$), aus den Kindern besteht, die weder die Kriterien der Fälle noch der Kontrollen erfüllten. Letztendlich wurden daraufhin jeweils 80 Fälle und 80 Kontrollen aus den Populationen der Fälle und Kontrollen so ausgewählt, dass die Verteilung der Bauern und Nichtbauern innerhalb der Fall- bzw. Kontrollgruppe durch „*matching*“ möglichst ausgeglichen war und jeweils 16 Fälle sowie 16 Kontrollen aus jedem der fünf Studienzentren eingeschlossen waren (Abbildung 24). Fortan wird die stellvertretende Variable für Asthma in Rahmen dieser Arbeit als „Asthmasymptome“ bezeichnet.

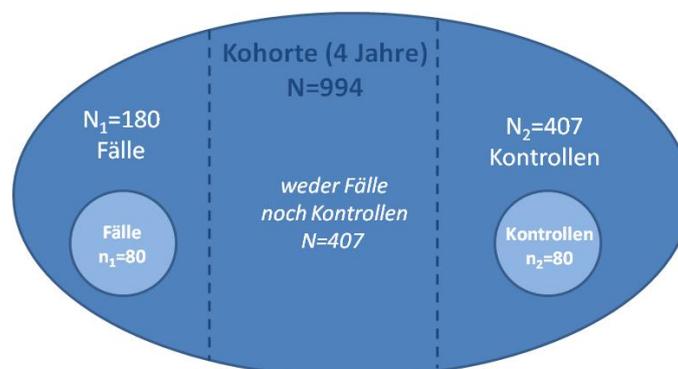


Abbildung 24: Auswahl der Fälle und Kontrollen für die Fall-Kontroll-Studie (FKS)

Die Gesamtkohorte wurde für die Auswahl der Fälle und Kontrollen für FKS in drei Populationen unterteilt: I. die Population, die die Kriterien der Fälle erfüllt; II. die Population, die die Kriterien der Kontrollen erfüllt; III. die Population, die weder die Kriterien der Fälle noch der Kontrollen erfüllt.

Die Anzahl Bauernhofmilchproben, die aus den Familien von Kindern mit Asthmasymptomen stammen, ist in beiden Milchsammlungen (2 Monaten und 4,5 Jahren) signifikant niedriger als die Anzahl der Bauernhofmilchproben, die in der Kontrollgruppe gesammelt wurden. Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass der Konsum von Bauernhofmilch in den Familien der Kontrollgruppe stärker verbreitet ist. Des Weiteren konnte ein Unterschied in der Anzahl von Bauernmilchproben zwischen den unterschiedlichen Sammlungen beobachtet werden. Dieser Unterschied beruht darauf, dass während der zweiten Sammlungsperiode keine Milch in Finnland gesammelt wurde. Obgleich führte diese Reduzierung nicht zu einem signifikanten Unterschied in der Verteilung der Bauernmilchproben in der Fall- bzw. Kontrollgruppe. In etwa die Hälfte der Kinder wurden bis zum sechsten Monat gestillt. Der Zeitpunkt des erstmaligen Konsums von Bauernmilch der Kinder mit Asthmasymptomen, unterscheidet sich nicht signifikant zu den Kindern der Kontrollgruppe. Die Erhebung der Daten zum Milchkonsum der Studienkinder ergab, dass alle Kinder im Alter von vier Jahren regelmäßig Milch tranken und damit exponiert waren (Tabelle 20).

Tabelle 20: Charakterisierung der Fall-Kontroll-Studiengruppen

Die prozentuale Verteilung der Parameter Geschlecht, Bauernstatus, Bauernhofmilch und erster Konsums von Bauernmilch innerhalb Fall- und Kontrollgruppe wurde berechnet; † p-Wert = Chi-Quadrat-Tests bestimmt; § p-Wert_{Trend} = Cochran-Armitage Trend Test

	Gesamt		Fälle		Kontrollen		p-Wert
	n*	%	n*	%	n*	%	
Gesamtzahl	160		80	50.0	80	50.0	
Geschlecht: männlich	81	50.6	48	60	33	41,3	0.0176 [†]
Bauern	78	48.8	35	43.8	43	53.8	0.2057 [†]
Stillen bis zum 6. Monat	86	55.7	43	50.0	43	50.0	
Anzahl der Bauernhofmilchproben 2 Monate [#]	67	42.1	27	34.2	40	50.0	0.0433 [†]
Anzahl der Molkereimilchproben 4,5 Jahre [#]	56	44.8	20	32.3	36	57.1	0.0051 [†]
Bauernhofmilchkonsum (aus Tagebuch)							
- vor 6 Monaten	5	3.1	3	3.8	2	2.5	0.5540 [†]
- 7 bis 9 Monate	17	10.6	8	10.0	9	11.3	
- 10 bis 12 Monate	17	10.6	5	6.2	12	15.0	
- 12 bis 24 Monate	121	75.6	64	80.0	57	71.3	
Milchkonsum (4 Jahre)							
- Bauernhofmilch	86	53.8	46	57.5	40	50.0	0.3414 [§]
- Molkereimilch	74	46,2	34	42,50	40	50.0	

3.2.2 Assoziation zwischen dem Auftreten von Asthmasymptomen und dem Verzehr von Bauernhofmilch

Die Ergebnisse der vorherigen Vergleiche der Fall- und Kontrollgruppe zeigten, dass der Verzehr von Bauernhofmilch in der Gruppe der Kinder mit Asthmasymptomen signifikant niedriger war, als der in der Kontrollgruppe. Daraufhin wurde im nächsten Schritt der Analysen eine mögliche Assoziation dieser beiden Variablen untersucht. Aus den vorherigen Analyse ging hervor, dass nur ein kleiner Anteil der Kinder Kuhmilch bereits in den ersten sechs Monaten ihres Lebens konsumierte und dadurch indirekt durch die Mutter mit den Milchfetten versorgt wurde, dadurch konnte eine Assoziation zwischen der Milch aus der 2-Monatssammlung und des Auftreten von Asthmasymptomen nachgewiesen werden. Diese Analysen wurden auf die unterschiedlichen Zentren adjustiert, um mögliche Heterogenitätseffekte auszuschließen. Der Konsum von Bauernhofmilch im Alter von vier Jahren konnte mit dem Auftreten von Asthmasymptomen invers assoziiert werden (Abbildung 25).

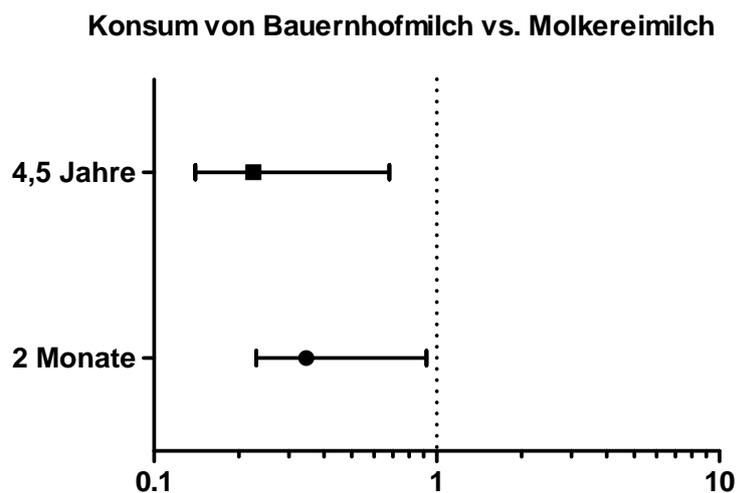


Abbildung 25: Assoziationen zwischen dem Konsum von Bauernhofmilch vs. Molkereimilch und dem Auftreten von Asthmasymptomen

Die Berechnungen der Odds Ratios und der Konfidenzintervalle (95%) wurden auf die gerichtete Stichprobe gewichtet und auf die unterschiedlichen Zentren adjustiert

3.2.3 Unterschiede in den Fettsäuremustern von Bauernhof- und Molkereimilch

Wie die vorangegangenen Analysen innerhalb der eingebetteten Fall-Kontroll-Studie zeigten, ist der Verzehr von Bauernhofmilch in den Familien, deren Kinder keine Asthmasymptome aufweisen, viel stärker verbreitet. Im nächsten Schritt der epidemiologischen Analysen wurde die Zusammensetzung der Milchfettsäuren der Bauernhof- und Molkereimilch untersucht. Wie bereits in Kap. 1.2.3 thematisiert, könnte die unterschiedliche Zusammensetzung der Milchfette eine mögliche Ursache der Schutzvermittlung darstellen. Für den Vergleich der

Fettsäuremuster wurden 46 verschiedene, für die Kuhmilch charakteristische Fettsäuren in Proben der Bauernhof- und Molkereimilch bestimmt (Jensen, 1995, 2002). Anschließend wurden die einzelnen Fettsäuren aufgrund ihrer chemisch-biologischen und strukturellen Eigenschaften in unterschiedliche Gruppen ($\Sigma n3$, $\Sigma n6$, ΣSFA , $\Sigma MUFA$ und ΣCLA) eingeteilt und somit die Anzahl der Variablen für die statistischen Analysen reduziert. Zusätzlich wurde das Verhältnis ($\Sigma n6/\Sigma n3$ -Ratio) der Summe aller n6-Fettsäuren zu der Summe aller n3-Fettsäuren und der n6/n3-Index (AA/EPA+DHA) berechnet und verglichen.

In beiden Milchsammlungen konnte die Bauernhofmilch im Vergleich zur Molkereimilch durch signifikant höhere Anteile von CLAs charakterisiert werden. Zudem war die Menge der n6-Fettsäuren in denen zum Zeitpunkt von zwei Monaten gesammelten Bauernmilchproben signifikant verringert. Folgerichtig waren daher auch der n6/n3-Index und das $\Sigma n6/\Sigma n3$ -Ratio in der Bauernhofmilch gegenüber der Molkereimilch unabhängig von der Milchsammelungsperiode signifikant reduziert. Im Gegensatz dazu konnten keine Unterschiede in der Menge von saturierten (SFA) und einfach ungesättigten Fettsäuren (MUFA) in Bauernhof- und Molkereimilch gefunden werden (Tabelle 21).

Tabelle 21: Unterschiede im Fettsäuremuster von Bauernhof- und Molkereimilch

Die Berechnungen der Regressionskoeffizienten β und der dazugehörigen Konfidenzintervalle (95%) wurden auf die gerichtete Stichprobe gewichtet und auf die unterschiedlichen Zentren adjustiert. # Regressionskoeffizienten mit 95% Konfidenzintervall gewichtet auf gerichtete Stichproben; § ohne Finnland

Bauernmilch vs. Molkereimilch	Milchproben (2 Monate)		Milchproben (4,5 Jahre) [§]	
	β (95% KI) [#]	p-Wert	β (95% KI) [#]	p-Wert
$\Sigma n3$	0.049 (-0.0166, 0.1154)	0.14	0.051 (-0.0101, 0.1122)	0.10
$\Sigma n6$	-0.305 (-0.4652, -0.144)	0.0003	-0.183 (-0.4649, 0.0993)	0.20
ΣSFA	-1.122 (-3.3373, 1.094)	0.32	-0.14 (-2.1603, 1.8799)	0.89
$\Sigma MUFA$	0.326 (-1.7706, 2.4223)	0.76	0.101 (-1.4635, 1.665)	0.90
ΣCLA	0.368 (0.1556, 0.5808)	0.0008	0.266 (0.0165, 0.5158)	0.037
n6/n3 index	-0.474 (-0.6951, -0.2527)	<.0001	-0.249 (-0.445, -0.0522)	0.014
$\Sigma n3/\Sigma n6$ ratio	-0.960 (-1.3549, -0.5659)	<.0001	-0.783 (-1.3961, -0.1689)	0.013

Um mögliche Zentrumseffekte zu untersuchen, wurde der CLA-Gehalt der Milch in den unterschiedlichen Studienzentren für beide Milchsammlungen gegenübergestellt und

verglichen (Abbildung 26). Der Vergleich der Bauernhofmilch (2 Monate) aus den Studienzentren Österreich (A), Schweiz (C), Frankreich (F), Deutschland (G) und Finnland (S) ergab signifikante Unterschiede im CLA-Gehalt der Milch, in den unterschiedlichen Studienzentren. Während in den Schweizer Milchproben der höchste mittlere Gehalt an CLA gemessen wurde, wiesen die finnischen Milchproben den geringsten mittleren CLA-Gehalt auf. Zusätzlich war der CLA-Gehalt der deutschen und französischen Milchproben signifikant geringer als in den Schweizer Bauernmilchproben. In der zweiten Milchsammlung wurde auf die Sammlung von finnischen Milchproben verzichtet, da in Finnland grundsätzlich Molkereimilch mit einem sehr geringen Fettgehalt von ca. 0,1 % verzehrt wird. Im Rahmen dieser Sammlung konnte ein signifikanter Unterschied des CLA-Gehalts in Milchproben aus Österreich und Deutschland beobachtet werden.

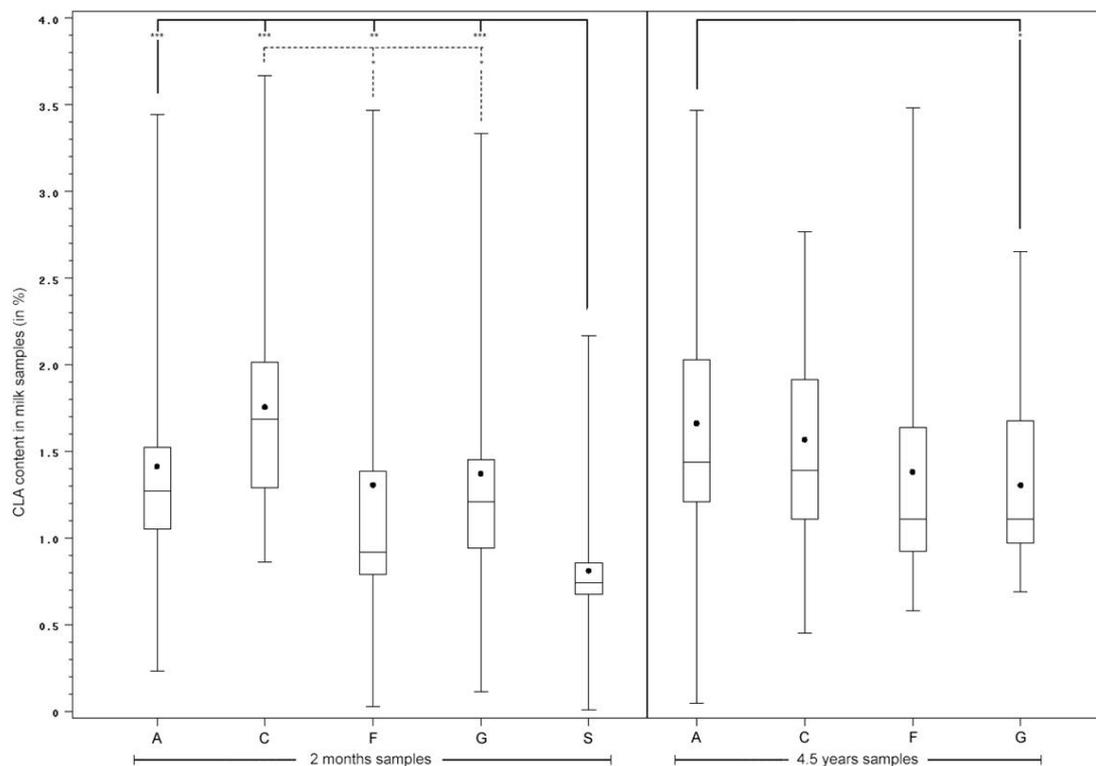


Abbildung 26: Zentren bedingte Unterschiede des CLA-Gehalt in Bauernhofmilch

Für die Erstellung der Boxplots wurden der jeweilige Median, das obere bzw. untere Quartile und der minimale bzw. maximale Wert der CLA-Verteilung in den verschiedenen Zentren berechnet. * <0.05 , ** <0.01 , *** $<0,0001$

3.2.4 Einflussfaktoren auf die CLA-Verteilung in der Bauernhofmilch

In der Literatur werden verschiedene Faktoren, wie Saison, Weidehaltung, Fütterung und Rasse, die die Verteilung von Fettsäuren in Milch, insbesondere die der CLAs, beeinflussen beschrieben (Jahreis, 1999; Collomb et al., 2001; Kraft et al., 2003; Leiber et al., 2005; De La Fuente LF et al., 2009). Des Weiteren sollte untersucht werden, ob der Bauernstatus mit

erhöhten Milch-CLA Konzentrationen assoziiert werden kann. Dafür wurde mit Hilfe von Zentrums-adjustierten Modellen der linearen Regression untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Bauernstatus und dem erhöhten CLA-Gehalt in Milch gibt. Wie zuvor bereits für Bauernhof- und Molkereimilch gezeigt, wiesen die bei Bauern gesammelten Milchproben signifikant niedrigere Konzentrationen an CLAs auf als die bei Nicht-Bauern gesammelten Milchproben. Dieser Effekt war besonders stark in den Milchproben der ersten Milchsammlung (2 Monate) ausgeprägt. Die Ergebnisse deuteten daraufhin, dass ein erhöhter CLA-Gehalt eine charakteristische Eigenschaft von Bauernhofmilch zu sein scheint.

Das Vorhandensein der erhobenen Daten zur näheren Charakterisierung der gesammelten Milchproben ermöglichte die Identifizierung weiterer Faktoren, die möglicherweise die CLA-Verteilung in Bauernhofmilch beeinflussen könnten. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Saison der Milchprobensammlung von zentraler Bedeutung für den CLA-Gehalt der Milch ist. Bauernhofmilchproben, die zwischen April und Oktober (Sommer) gesammelt wurden, enthielten signifikant mehr CLAs als Bauernhofmilchproben, die zwischen Oktober und April (Winter) genommen wurden. Als weiterer Einflussfaktor konnte die Haltung der Milchkühe ausfindig gemacht werden. Die Milch der Kühe, die während der Milchsammlung auf der Weide gehalten wurden, wiesen verglichen mit der Milch von im Stall gehaltenen Kühen einen deutlich erhöhten CLA-Gehalt auf. Im Gegensatz dazu konnten keine signifikanten Effekte durch ergänzende Fütterung mit Silage bzw. Maische auf den CLA-Gehalt der Milch der beiden Milchsammelungsperioden festgestellt werden (Tabelle 22).

Um zu kontrollieren, ob sich Einfluss nehmenden Faktoren wechselseitig beeinflussen, wurden die Ergebnisse der 2-Monats-Milchsammlung in einem gegenseitig adjustierten Modell überprüft. Dabei wurden die Milchproben aus Finnland nicht mit einbezogen, da nur wenige Bauernhofmilchproben im Studienzentrum gesammelt wurden. Dabei konnte mit Hilfe dieses Modells die Bedeutung der Saison (Summer vs. Winter, $p=0,0280$) und Weidehaltung während der Probensammlung (ja vs. nein, $p=0,0224$) hervorgehoben werden. Für die zweite Milchsammlung (4,5 Jahre) konnte dieses Modell aufgrund der fehlenden statistischen Signifikanz für den Einflussfaktor „Weidehaltung“ nicht zur Überprüfung herangezogen werden. Eine zusätzliche Analyse ergab, dass das Abkochen der Milch keinen Einfluss auf die Verteilung der CLAs in der Milch hat ($p_{4,5\text{ Jahre}}=0,8001$ $p_{4,5\text{ Jahre}}=0,8410$).

Tabelle 22: Einflussfaktoren auf die CLA-Verteilung in Bauernhofmilch

Die Berechnungen der Regressionskoeffizienten β und der dazugehörigen Konfidenzintervalle (95%) wurden auf die gerichtete Stichprobe gewichtet und auf die unterschiedlichen Zentren adjustiert. # Regressionskoeffizienten mit 95% Konfidenzintervall gewichtet auf gerichtete Stichproben; § ohne Deutschland, da nur Proben nach Silagefütterung vorhanden waren; § ohne Finnland

	Milchproben (2 Monate)			Milchproben (4,5 Jahre)		
	n*	β (95% KI) [#]	p-Wert	n*	β (95% KI) [#]	p-Wert
Bauern vs. Nichtbauern	78	0.27		78	0.25	
	82	(0.067, 0.470)	0.0092	82	(0.005, 0.496)	0.045
Milchproben aus dem Sommer (April-Oktober)	42	0.62		31	0.50	
ja/nein	25	(0.29, 0.95)	0.0003	22	(-0.83, -0.17)	0.0033
Milchproben aus der Weidezeit	27	0.78		21	0.44	
ja/nein	23	(0.35, 1.21)	0.0006	19	(-0.06, 0.95)	0.082
Fütterung mit...						
Silage [§]	24	0.27		15	0.22	
ja/nein	23	(-0.34, 0.87)	0.38	23	(-0.81, 0.37)	0.46
Maische	45	-0.078		35	0.35	
ja/nein	12	(-0.612, 0.461)	0.78	15	(-0.064, 0.770)	0.096

3.2.5 Unterschiede in Fettsäureverteilung im Serum von Bauern und Nicht-Bauern

Das Vorliegen von Serumproben von Kindern des Fall-Kontroll-Kollektivs ermöglicht es, die bisher in der Milch durchgeführten Untersuchungen durch Analysen der Fettsäuren im Serum zu ergänzen. Nahrungsfette werden in die Serum bzw. Plasmamembranen und in die Membranen verschiedener Zellen eingebaut und stehen dem menschlichen Körper so für biologische Stoffwechselforgänge zur Verfügung (Berg et al., 2007; Chow Kuang, 2008). Zur Untersuchung möglicher Unterschiede der Fettsäureprofile von Bauern und Nicht-Bauern und möglicherweise damit verbundene immun-modulatorischen Eigenschaften einzelner Fettsäuren wurden, wie in der Kuhmilch 46 natürliche Fettsäuren im Serum bestimmt und ebenfalls in fünf Gruppen eingeteilt, um die Anzahl der Variablen zu reduzieren (s. Kap. 3.2.2). Gleichmaßen wurden auch das $\Sigma n6/\Sigma n3$ -Ratio und der $n6/n3$ -Index berechnet.

Für den Vergleich der Fettsäuren im Serum von Bauern und Nicht-Bauern wurden die Fettsäuremuster der Mutter und des Kindes bei der Geburt sowie des Kindes im Alter von einem und viereinhalb Jahren bestimmt (Tabelle 23). Dabei zeigte sich, dass sich die Serumfettsäuremuster der Bauern und Nicht-Bauern in den prozentualen Anteilen der konjugierten Linolsäuren (Σ CLA) unterschieden. Über einen Zeitraum von viereinhalb Jahren konnte im Serum der Mütter und Kinder aus Bauernfamilien im Gegensatz zu den Müttern und

Kinder aus Nicht-Bauernfamilien ein konstant höherer CLA-Gehalt beobachtet werden. Dieser Unterschied erreichte jedoch nur im mütterlichen Serum und im Serum der Kinder im Alter von viereinhalb Jahren statistische Signifikanz. Ansonsten konnten keine weiteren signifikanten Unterschiede der Fettsäureverteilung im Serum von Bauern und Nicht-Bauern festgestellt werden.

Zur weiteren deskriptiven Charakterisierung der Unterschiede von CLAs im Serum von Bauern wurde der Anteil der CLAs im Serum der Bauernkinder, im Alter von einem und viereinhalb Jahren, aus den unterschiedlichen Studienzentren gegenüber gestellt (Abbildung 27). Während sich im Serum der Kinder zu einem Jahr insbesondere der CLA-Gehalt der finnischen Kinder signifikant von dem der Schweizer, deutschen und französischen Kinder unterschied, gab es im Serum der Kinder im Alter von viereinhalb Jahren keine signifikanten Unterschiede.

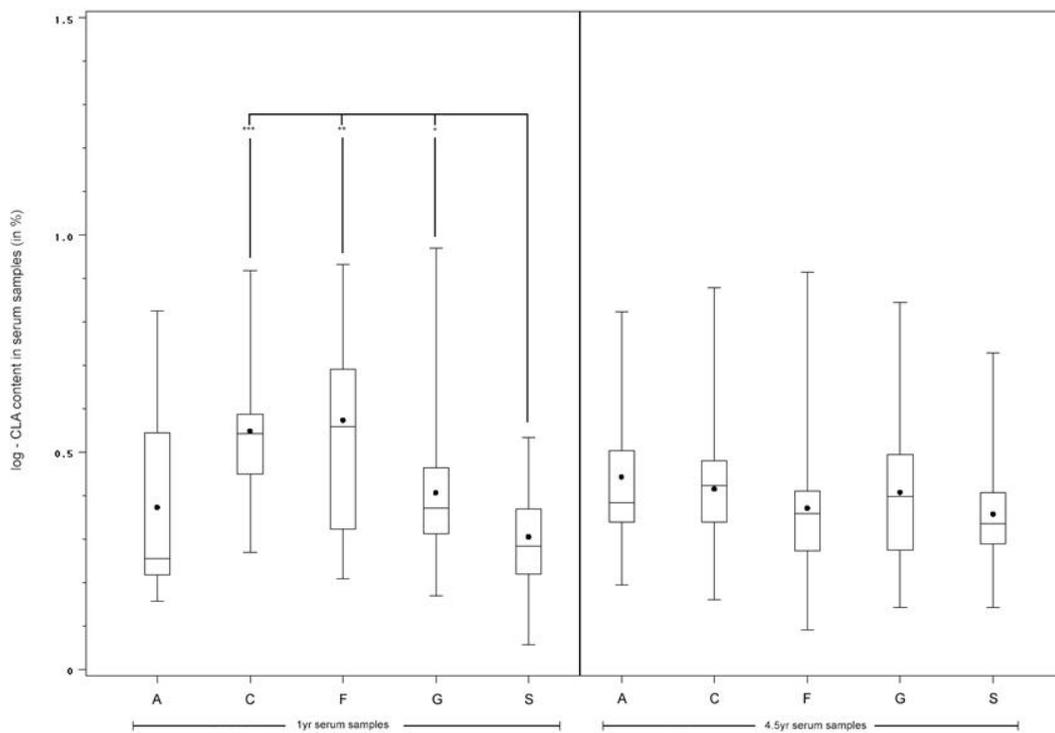


Abbildung 27: Zentren bedingte Unterschiede des CLA-Gehalt im Serum von Bauernkinder

Für die Erstellung der Boxplots wurden der jeweilige Median, das obere bzw. untere Quartile und der minimale bzw. maximale Wert der CLA-Verteilung in den verschiedenen Zentren berechnet. * <0.05 , ** <0.01 , *** $<0,0001$

Tabelle 23: Unterschiede im Fettsäuremuster von Bauern und Nicht-Bauern

Die Berechnungen der Regressionskoeffizienten β und der dazugehörigen Konfidenzintervalle (95%) wurden auf die gerichtete Stichprobe gewichtet und auf die unterschiedlichen Zentren adjustiert.
Regressionskoeffizienten mit 95% Konfidenzintervall gewichtet auf gerichtete Stichproben

Bauern vs. Nichtbauer	Serum (Mutter) n=144		Serum (Nabelschnurblut) n=121		Serum (Kind/Jahr 1) n=121		Serum (Kind/Jahr 4.5) n=144	
	β (95% CI)#	p-Wert	β (95% CI)#	p-Wert	β (95% CI)#	p-Wert	β (95% CI)#	p-Wert
$\Sigma n3$	0,002 (-0,0797, 0,0845)	0,8745	0,026 (-0,0920, 0,1447)	0,8799	0,059 (-0,0587, 0,1765)	0,4170	0,574 (0,4847, 0,6643)	0,6923
$\Sigma n6$	-0,039 (-0,0997, 0,0211)	0,1091	-0,052 (-0,0956, -0,0078)	0,0598	-0,011 (-0,1472, 0,1249)	0,7563	-0,140 (-0,2263, -0,0534)	0,6008
ΣSFA	-0,035 (-0,0646, -0,0062)	0,3902	0,030 (-0,0041, 0,0641)	0,6241	-0,022 (-0,0824, 0,0387)	0,6876	-0,107 (-0,1586, -0,0552)	0,6320
$\Sigma MUFA$	0,049 (-0,0006, 0,0978)	0,1194	0,044 (-0,0112, 0,0982)	0,0599	-0,229 (-0,3956, -0,0621)	0,4571	-0,564 (-0,6527, -0,4752)	0,8938
ΣCLA	0,095 (0,0445, 0,1456)	0,0006	0,054 (-0,0361, 0,1446)	0,2545	0,078 (-0,0297, 0,1866)	0,2082	0,208 (0,1339, 0,2817)	0,0029
n6/n3 Index	-0,022 (-0,1140, 0,0699)	0,6344	0,043 (-0,0294, 0,1156)	0,2571	0,031 (-0,1016, 0,1630)	0,6788	-0,064 (-0,1461, 0,0178)	0,5861
$\Sigma n6/\Sigma n3$ Ratio	0,085 (-0,0356, 0,2059)	0,1870	-0,009 (-0,135, 0,1181)	0,8924	-0,173 (-0,3649, 0,0188)	0,4248	-0,328 (-0,4833, -0,1732)	0,4258

In wie weit die Serumfettsäureprofile der Kinder bei Geburt und im ersten Lebensjahr den Serumfettsäurestatus der Mütter widerspiegeln, wurde anhand von Korrelationen nach Pearson berechnet (Tabelle 24), wobei die Clusterbildung der Fettsäuren analog zu den Milchfettsäuregruppierungen vorgenommen wurde (s. Kap. 3.2.3). Die Ergebnisse belegen eine hohe Korrelation zwischen mütterlichen und kindlichen Fettsäuren. Dabei war die Korrelation zwischen mütterlichen Serumfettsäuren und der Fettsäureverteilung im kindlichen Nabelschnurblut noch stärker ausgeprägt als die Korrelation der mütterlichen Serumfettsäuren und den kindlichen Serumfettsäuren im Alter von einem Jahr.

Tabelle 24: Korrelationen zwischen mütterlicher und kindlicher Fettsäureverteilung im Serum

Zum Überprüfung des linearen Zusammenhang zwischen mütterlichen und kindlichen Fettsäureprofilen wurden die Korrelationen zwischen mütterlichen Fettsäuren im Serum und den kindlichen Fettsäuren im Nabelschnurblut bzw. im Serum im Alter von einem Jahr mit Hilfe des Korrelationskoeffizient r nach Pearson berechnet.

Gruppen	Mutter - Kind (Nabelschnurblut)		Mutter - Kind (1 Jahr)	
	r^2	r	r^2	r
$\Sigma n3$	0,40	0,63	0,25	0,50
$\Sigma n6$	0,24	0,49	0,20	0,44
ΣSFA	0,27	0,52	0,23	0,48
$\Sigma MUFA$	0,19	0,44	0,17	0,41
ΣCLA	0,38	0,62	0,16	0,40
$n6/n3$ Index	0,14	0,38	0,03	0,18
$\Sigma n6/\Sigma n3$ Ratio	0,07	0,27	0,00	0,05

3.2.6 Keine Unterschiede in der Zusammensetzung der Fettsäuren in Erythrozyten von Bauern und Nicht-Bauern

Zum Vergleich der Fettsäuremuster im Serum von Bauern und Nicht-Bauern wurden weiterhin die Fettsäuremuster von Bauern und Nicht-Bauern in den Erythrozytenmembranen gemessen und verglichen. Während die Fettsäuren im Serum vergleichsweise einen kurzen Zeitraum der Ernährungsgewohnheiten von etwa ein bis zwei Wochen widerspiegeln, bilden die Fettsäuren in Erythrozytenmembranen einen längeren Expositionszeitraum von bis zu drei Monaten ab (Katan et al., 1997). Für diese Analysen standen tiefgefrorene bereits geronnene Serumklumpen der Mütter und ihrer Kinder bei Geburt aus der Fall-Kontroll-Studie zur Verfügung.

Ähnlich wie im Serum war auch in den Erythrozyten der Bauern die Summe der CLAs tendenziell erhöht. Da dieser Unterschied jedoch keine statistische Signifikanz erreichte und nur eine stark reduzierte Anzahl der Proben für die Messungen zur Verfügung standen, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit auf die Berechnung von Assoziationen und Korrelation mit Milch-CLAs und allergischen Erkrankungen sowie Asthma bronchiale verzichtet.

Tabelle 25: Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung der Erythrozyten von Bauern und Nicht-Bauern

Die Berechnungen der Regressionskoeffizienten β und der dazugehörigen Konfidenzintervalle (95%) wurden auf die gerichtete Stichprobe gewichtet und auf die unterschiedlichen Zentren adjustiert. # Regressionskoeffizienten mit 95% Konfidenzintervall gewichtet auf gerichtete Stichproben

Bauern vs. Nichtbauer	Mutter n=103		Kind (Nabelschnurblut) n=74	
	β (95% CI)#	p-Wert	β (95% CI)#	p-Wert
$\Sigma n3$	0,021 (-0,1179,0,1604)	0,7655	-0,050 (-0,2385,0,1378)	0,5940
$\Sigma n6$	0,117 (-0,0199,0,2545)	0,1203	0,015 (-0,1257,0,1566)	0,8342
ΣSFA	0,013 (-0,1126,0,1383)	0,8434	0,463 (0,3946,0,5318)	0,2871
$\Sigma MUFA$	-0,047 (-0,2014,0,1086)	0,5491	-0,034 (-0,2146,0,1461)	0,7063
ΣCLA	0,022 (-0,0151,0,0594)	0,2648	0,038 (-0,0049,0,0813)	0,0960
n6/n3 Index	0,040 (-0,1144,0,1952)	0,6199	0,087 (-0,0917,0,2650)	0,3679
$\Sigma n6/\Sigma n3$ Ratio	0,090 (-0,0921,0,2724)	0,3586	0,037 (-0,1466,0,2203)	0,7006

3.2.7 Der Konsum von CLA-reicher Milch führt zur erhöhten CLA-Serumspiegeln

Wie die vorherigen Ergebnisse zeigten, unterschieden sich die Fettsäureprofile von Bauern und Nicht-Bauern signifikant im Gehalt der konjugierten Linolsäuren (CLA). Bekanntlich dient insbesondere Kuhmilch als Quelle für die tägliche Aufnahme von CLAs (Fritsche and Steinhart, 1998). Da Serum die kurzzeitige Aufnahme der Nahrungsfette widerspiegelt, sollte im nächsten Schritt den vorgestellten Analysen überprüft werden, ob sich der Konsum von CLA-reicher Milch auf den Serumspiegel von CLA auswirkt. Um diese Frage zu beantworten, wurden der jeweilige Korrelationskoeffizient r nach Pearson für die Korrelation zwischen Milch- bzw. Serum-CLAs berechnet. Dabei wurde eine hohe Korrelation ($r=0,48$, $p=0,0370$) für die Milch-CLAs der Milch aus der 2-Monatsammlung und den Serumspiegel von CLAs der Kinder im Alter von einem Jahr gefunden. Des Weiteren konnte eine etwas schwächere jedoch immer noch signifikante Korrelation ($r=0,27$, $p=0,0316$) zwischen den Milch-CLAs aus der Milch der 4-Jahressammlung und den Serumspiegeln der Kinder im Alter von viereinhalb Jahren dargelegt werden.

3.2.8 Die Exposition bzw. der Konsum von CLA-reicher Milch ist invers mit der Entwicklung von Asthmasymptomen assoziiert

Vorangegangene Analysen zeigten, dass der Konsum von Bauernhofmilch im Gegensatz zum Konsum von Molkereimilch das Risiko der Entwicklung von Asthmasymptomen verringert.

Zudem konnte in weiteren Analysen belegt werden, dass der CLA-Gehalt in Bauernhofmilch im Gegensatz zur Molkereimilch stark erhöht ist und der Konsum CLA-reicher Milch zu erhöhten CLA-Serumspiegeln führte. Abschließend wurden daher mögliche Effekte der Milch- bzw. Serum-CLAs auf die Entwicklung von Asthmasymptomen untersucht.

Wie in Abbildung 28 zu erkennen ist, kann nur der CLA-Gehalt der Milch aus der ersten Milchsammlung (2 Monate) signifikant mit dem Auftreten von Asthmasymptomen bei den Studienkindern im Alter von viereinhalb Jahren assoziiert werden. Ebenfalls konnte der CLA-Gehalt der Milch aus der zweiten Milchsammlung (4,5 Jahre) invers mit dem Auftreten von Asthmasymptomen assoziiert werden, jedoch erreichte diese Assoziation keine statistische Signifikanz. Zudem konnten keine Assoziationen zwischen den CLA-Gehalt im Serum der Kinder im Alter von einem und viereinhalb Jahren und dem Auftreten von Asthmasymptomen festgestellt werden.

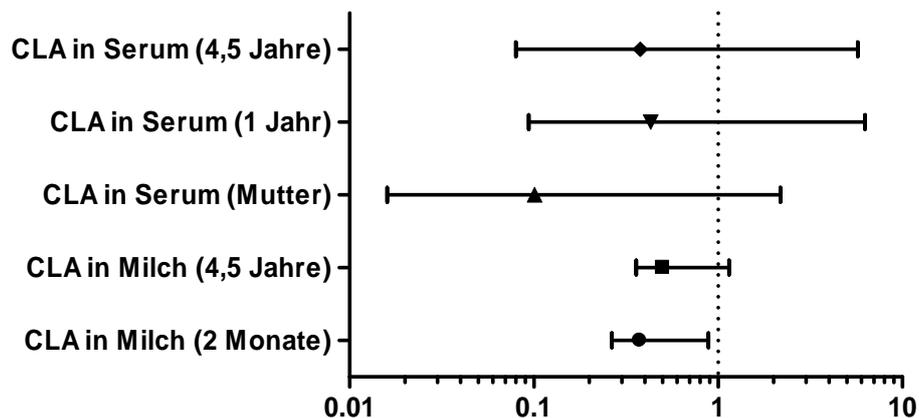


Abbildung 28: Assoziationen zwischen CLA-Gehalt von Milch- bzw. Serum und dem Auftreten von Asthmasymptomen

Die Berechnungen der Odds Ratios und der Konfidenzintervalle (95%) wurden auf die gerichtete Stichprobe gewichtet und auf die unterschiedlichen Zentren adjustiert

3.2.9 Assoziationen zwischen Milch- bzw. Serum-CLAs und der Entwicklung von Atopie

Zusätzlich zu den Assoziationen zwischen Milch- und Serum-CLAs und dem Auftreten von Asthmasymptomen wurde der mögliche Effekt der CLAs auf die Entwicklung von Atopie bzw. einer erhöhten allergen-spezifischen IgE-Antwort untersucht.

Zur Berechnung der Odds Ratio (OR) für die Assoziation zwischen einer Atopie und der Exposition zu CLAs aus Milch oder Serum-CLAs standen Daten der allergen-spezifischen IgE-Messung im Serum der Kinder im Alter von viereinhalb Jahren zur Verfügung. Die Analysen zeigten jedoch, dass weder der CLA-Gehalt der ersten Milchsammlung (2 Monate) noch der

CLA-Gehalt der zweiten Sammlung (4,5 Jahre) signifikant mit der Sensibilisierung gegenüber inhalativen, saisonalen Allergenen oder Nahrungsmittelallergenen assoziiert werden konnten. Des Weiteren konnten keine Assoziationen zwischen dem CLA-Gehalt im Serum der Kinder im Alter von einem und viereinhalb Jahren und Sensibilisierung festgestellt werden.

Tabelle 26: Assoziationen zwischen CLA-Gehalt in der Milch bzw. Serum und allergen-spezifischen IgE

Die Berechnungen der Odds Ratios und der Konfidenzintervalle (95%) wurden auf die gerichtete Stichprobe gewichtet und auf die unterschiedlichen Zentren adjustiert. * Anzahl in der Fall-Kontroll-Studie; # Regressionskoeffizienten mit 95% Konfidenzintervall gewichtet auf gerichtete Stichproben; § Cut-off für Atopie wurde für 4,5 Jahre mit 0.7 IU/l definiert; § ohne Finnland

	Atopie (4,5 Jahre) [§]		
	n*	OR (95% KI) [#]	p-Wert
CLA-Level in Serum (1 Jahr)			
inhalative Allergene	43	3.27 (0.26, 40.5)	0.36
Saisonale Allergene	27	0.83 (0.062, 11.2)	0.89
Nahrungsmittelallergene	36	1.41 (0.11, 17.7)	0.79
CLA-Level in Serum (4,5 Jahre)			
inhalative Allergene	43	14.1 (0.92, 214.2)	0.06
Saisonale Allergene	25	2.84 (0.11, 73.7)	0.53
Nahrungsmittelallergene	37	1.61 (0.092, 28.3)	0.74
CLA-Level in Kuhmilch (2 Monate)			
inhalative Allergene	48	0.92 (0.43, 1.98)	0.83
Saisonale Allergene	29	1.03 (0.40, 2.64)	0.95
Nahrungsmittelallergene	43	1.08 (0.49, 2.35)	0.85
CLA-Level in Kuhmilch (4,5 Jahre)[§]			
inhalative Allergene	33	1.07 (0.57, 2.00)	0.84
Saisonale Allergene	20	0.99 (0.48, 2.07)	0.98
Nahrungsmittelallergene	30	1.05 (0.48, 2.31)	0.89

3.3 Die Rolle von Milch-CLA auf den asthmatischen Phänotyp im Tiermodell der akuten Atemwegsentzündung

Im diesem Teil der Arbeit sollten die Ergebnisse der epidemiologischen Untersuchungen in ein geeignetes in vivo-Modell translatiert werden und im Rahmen eines „Proof of concept“ der Einfluss des Milchkonsums und insbesondere der Milch-CLAs auf Sensibilisierung und Ausprägung des asthmatischen Phänotyps des experimentellen Asthmas im Mausmodell untersucht werden.

3.3.1 Unterschiede in der Fettsäurekomposition in bayerischen Alpenbauernhofmilch und hessischer Bauernhofmilch

Die Milchfettsäurezusammensetzung wird, wie auch die vorherigen Untersuchungen belegen, durch verschiedene Faktoren beeinflusst (Kraft et al., 2003; Collomb et al., 2008). Daher war es wichtig, die für extensive Tierhaltung repräsentative Milch zur Fütterung der Tiere

auszuwählen. Die geeignete Milch sollte die Erkenntnisse aus den epidemiologischen Studien abbilden und sich daher im CLA-Gehalt signifikant unterscheiden. Dazu wurde Bauernhofmilch aus dem bayerischen Voralpenland und eine Kontrollmilch aus Mittelhessen gesammelt, die Fettsäurekomposition gaschromatographisch bestimmt und miteinander verglichen. Die Fettsäuren unterschieden sich insbesondere im CLA-Gehalt, welche die für extensiv gehaltenen Milchkühe charakteristischen Fettsäuren darstellen. Die Fettsäureanalysen zeigten, dass sich die Milch aus dem bayerischen Voralpenland und die Milch aus Mittelhessen neben den signifikanten Unterschieden in der Menge der CLA auch in weiteren Fettsäuren unterschieden (Tabelle 27).

Tabelle 27: Vergleich der Fettsäuremuster der Alpen- und Hessenmilch sowie der Vergleich der Fettsäuremuster der Milch und der daraus hergestellten Diäten

*Die Fettsäuren der Milchproben (n=3) wurden nach (Böcking et al.) aufgearbeitet, gaschromatographisch bestimmt und mittels des Student's t-Test verglichen; *weist auf Unterschied zw. Alpen- und Hessenmilch hin.*

Fettsäuren	MW Alpenmilch % der Gesamt-FS	SEM %	MW Alpendiät % der Gesamt-FS	SEM %	MW Hessenmilch % der Gesamt-FS	SEM %	MW Hessendiät % der Gesamt-FS	SEM %
C12:0	4,14	0,25	3,59	0,39	4,33	0,00	3,70	0,28
C14:0	13,57	0,83	13,37	1,17	14,35	0,04	13,31	1,00
C16:0	33,45*	2,15	35,85	2,30	42,93	0,17	41,87	3,29
C18:0	10,70*	0,80	8,36	6,13	8,12	0,09	8,31	0,66
C18:0	10,70*	0,80	8,36	6,13	8,12	0,09	8,31	0,66
C20:0	0,14	0,01	0,26	0,06	0,12	0,00	0,20	0,03
Σ SFA	64,25	4,16	63,94	2,27	72,21	0,25	74,02	1,99
C16:1	1,73*	0,12	1,77	0,13	2,73	0,36	2,07	0,16
C18:1 t9	0,24	0,02	0,29	0,04	0,21	0,02	0,22	0,03
C18:1 c9	28,06	4,06	26,36	1,61	19,69	0,20	18,73	1,47
C18:1 t11	0,65	0,30	0,86	0,05	0,63	0,04	0,65	0,11
Σ MUFA	30,95	4,01	29,62	1,85	23,57	0,15	21,97	1,74
C18:3 n3	0,79*	0,03	0,75*	0,04	0,64	0,02	0,55	0,04
C18:4 n3	0,04*	0,01	0,06	0,01	0,04	0,00	0,05	0,00
C20:4 n3	0,07	0,03	0,06	0,02	0,04	0,01	0,03	0,01
C20:5 n3	0,08	0,00	0,08	0,01	0,06	0,01	0,06	0,01
C22:5 n3	0,12	0,00	0,17	0,03	0,14	0,01	0,13	0,03
C22:6 n3	0,01*	0,00	0,04	0,02	0,04	0,01	0,05	0,03
Σ n3	1,13	0,03	1,17	0,06	0,98	0,05	0,87	0,03
C18:2 c9,c12	1,69	0,08	1,44	0,23	1,76	0,06	1,86	0,15
C20:2	0,02	0,00	0,04	0,01	0,03	0,00	0,04	0,01
C20:4 n6	0,12	0,00	0,13	0,01	0,16	0,01	0,14	0,01
C22:4 n6	0,02	0,00	0,03	0,01	0,03	0,00	0,04	0,01
C22:5 n6	0,02	0,00	nd	---	0,02	0,00	nd	---
Σ n6	1,98	0,07	1,75	0,26	2,13	0,07	2,19	0,17
C18:2 c9,t11	1,60*	0,24	1,70	0,12	1,08	0,08	0,93	0,06
C18:2 t10,c12	0,10**	0,00	0,09	0,00	0,04	0,00	0,02	0,00
Σ CLA	1,70	0,25	1,79	0,13	1,11	0,09	0,95	0,07
Ratio n6/n3	1,76*	0,05	1,50	0,09	2,18	0,05	2,51	0,20
Omega-3-6 Index	1,46*	0,07	1,36	0,11	2,90	0,66	1,35	0,45

Für den zweiten *in vivo*-Versuch wurde die gesammelte Milch durch die Firma Altromin in eine aus Grundnahrungsmitteln basierende Mausdiät integriert, um eine definierte und konzentriertere Verabreichung bzw. Aufnahme der Milchfette zu gewährleisten, bei der kein weiterer Eintrag von konjugierten Fettsäuren durch Grunddiät erfolgt. Zur Herstellung der Diät wurde die Milch sprühtrocknet und anstelle der auf Sonnenblumenöl basierenden

Fettfraktion in die Diät eingebaut (s. Kap. 2.3.13). Um sicherzugehen, dass der Sprühtrocknungsprozess und Einarbeitung des Milchpulvers in die Mausdiät (Pellets) diese nicht verändert, wurden die Fettsäurezusammensetzung der Diäten kontrolliert und mit der Zusammensetzung der Milchfetten verglichen. Die Milchfettzusammensetzung wird, wie auch die vorherigen Untersuchungen belegen, durch verschiedene Faktoren beeinflusst (Kraft et al., 2003; Collomb et al., 2008). Daher war es wichtig, die für extensive Tierhaltung repräsentative Milch zur Fütterung der Tiere auszuwählen. Die geeignete Milch sollte die Erkenntnisse aus den epidemiologischen Studien abbilden und sich daher im CLA-Gehalt signifikant unterscheiden. Dazu wurde Bauernhofmilch aus dem bayerischen Voralpenland und eine Kontrollmilch aus Mittelhessen gesammelt, die Fettsäurekomposition gaschromatographisch bestimmt und miteinander verglichen.

Die Fettsäuren unterschieden sich insbesondere im CLA-Gehalt, welche die für extensiv gehaltenen Milchkühe charakteristischen Fettsäuren darstellen. Die Fettsäureanalysen zeigten, dass sich die Milch aus dem bayerischen Voralpenland und die Milch aus Mittelhessen neben den signifikanten Unterschieden in der Menge der CLA auch in weiteren Fettsäuren unterscheiden (Tabelle 27). Die Fettsäuremuster der gesammelten Milch und der daraus hergestellten Diäten wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

3.3.2 Die Milch-Fütterung von Mäusen führt nicht zu Unverträglichkeiten

Bereits seit Jahrhunderten ist bekannt, dass der Konsum von Milch bzw. Milchprodukten bei Menschen zu Unverträglichkeit führen kann. Die bekannteste Form der Milchunverträglichkeit ist die Laktoseintoleranz. In diesem Fall kann der Milchzucker Laktose nicht hinreichend im Körper aufgespalten werden. In Einzelfällen ist es jedoch auch möglich, dass andere Milchbestandteile nicht vertragen werden. Typische Symptome dieser Unverträglichkeiten sind Übelkeit, Bauchschmerzen, Diarrhö und Koliken (Woodruff, 1976; Vesa et al., 2000).

Zur Überprüfung der Verträglichkeit der Milch von Mäusen wurden die Mäuse über einen Zeitraum von 40 Tagen jeweils ein- bzw. zweimal täglich 200 µl Milch intragastrisch (i.g.) gefüttert. Mit der Fütterung wurde bereits zehn Tage vor dem eigentlichen Start des Protokolls begonnen (Abbildung 9A). Die als Alpenmilch (Milch A) bezeichnete Milch wurde zuvor auf drei Bauernhöfen im bayerischen Voralpenland gesammelt, gepoolt und in 2 ml Aliquots bei -20°C tiefgefroren. Parallel dazu wurde eine Kontrollmilch (Milch B) auf einem mittelhessischen Bauernhofbetrieb gesammelt und tiefgefroren. Vor der Verabreichung wurde jeweils ein Aliquot frisch aufgetaut und homogenisiert. Zusätzlich erhielten die Tiere Wasser und Futter

ad libidum. Neben den Behandlungsgruppen wurden eine PBS- und OVA-Kontrollgruppe mitgeführt. Eine Gruppe umfasste jeweils acht Tiere.

Der gesundheitliche Zustand der Mäuse wurde durch die wöchentliche Dokumentation des Gewichtes (Abbildung 29) und durch die tägliche visuelle Kontrolle der Maus und des Stuhles überprüft. Innerhalb der ersten Woche des Versuches wurden die Tiere jeweils morgens und abends zusätzlich zum Stammfutter mit 200 µl Milch intragastrisch gefüttert. Während dieses Zeitraums konnte ein Gewichtsverlust bei den mit Milch gefütterten Mäusen gegenüber den Kontrolltieren verzeichnet werden. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass diese Tiere verglichen mit Tieren aus den Kontrollgruppen weniger Nahrung und Wasser zu sich nahmen. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die intragastrisch verabreichte Menge auf eine einmalige tägliche Gabe von 200 µl reduziert. Diese Reduzierung führt zu einer Gewichtszunahme und einer normalisierten Nahrungsaufnahme, dass die Mäuse wieder mehr aßen, tranken und an Gewicht zunehmen. Die visuelle Überprüfung des Stuhles während des kompletten Versuchs wies auf keine Anzeichen von Diarrhö oder sonstige intragastrische Unverträglichkeiten hin.

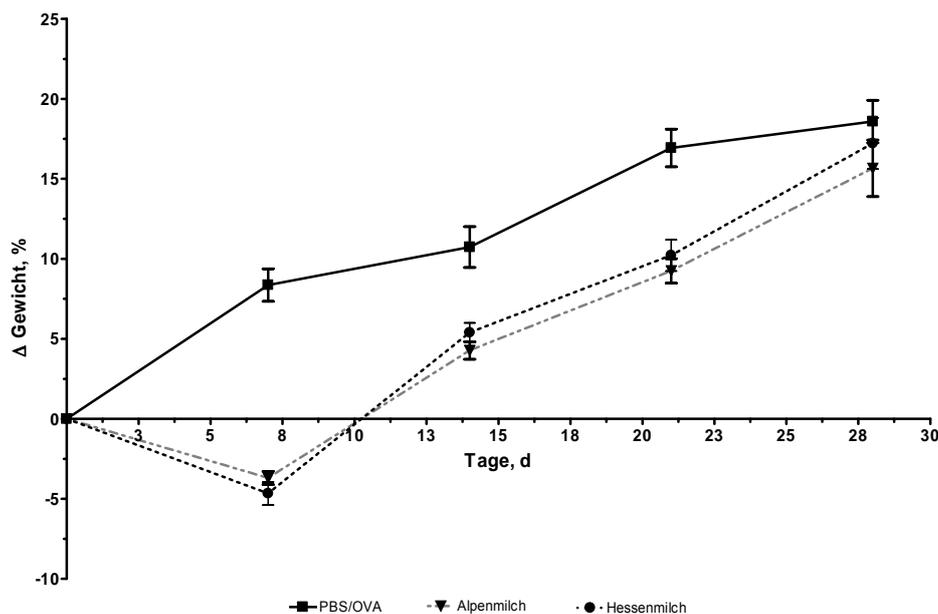


Abbildung 29: Prozentuale Gewichtsveränderungen nach Milchverabreichung

Balb/c-Mäuse ($n=8$ pro Gruppe) wurden täglich beginnend zehn Tage vor der Sensibilisierung intragastrisch (i.g) mit 200 µl Milch gefüttert und im einem Zeitraum über fünf Wochen wöchentlich das Gewicht dokumentiert, um die Milchverträglichkeit sicherzustellen.

Zusätzlich sollte dieser Versuch zur Ermittlung der biologisch wirksamen Milchmengen bzw. Milchfettmengen dienen. Dafür wurden die Tiere nach 10 Tage Milchfütterung dreimal sensibilisiert, anschließend nach dreimaliger OVA-Aerosol-Provokation präpariert (Abbildung 9A) und der asthmatische Phänotyp mittels der im Methodenteil beschriebenen Analysen

charakterisiert. Nach OVA-Sensibilisierung und –Provokation entwickelten die Tiere eine Atemwegshyperreaktivität gegenüber Metacholin, was zu einer signifikanten Verringerung der Lungenfunktion führt. Die mit Milch gefütterten Tiere weisen keine Verbesserung der Atemwegsfunktion im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe auf (Abbildung 30).

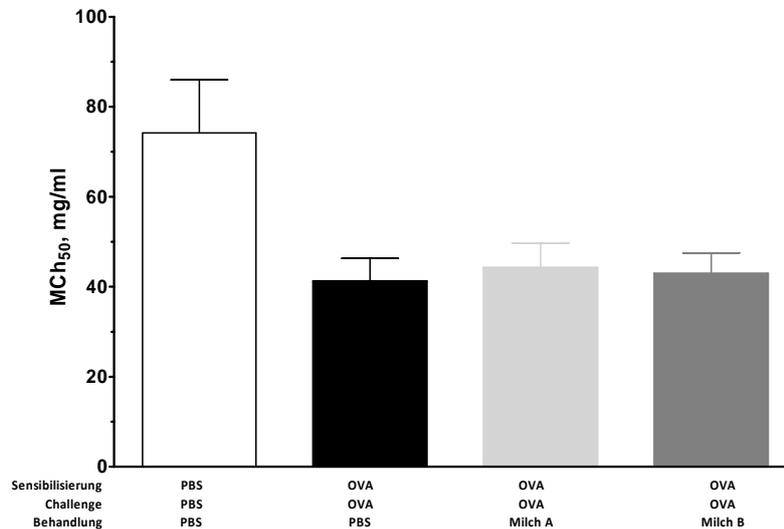


Abbildung 30: Atemwegsreaktivität nach Milchverabreichung

Balb/c-Mäuse (n=8 pro Gruppe) wurden täglich beginnend zehn Tage vor der Sensibilisierung intragastrisch (i.g) mit 200 µl Milch gefüttert. Anschließend erfolgte die dreimalige Provokation mit 1% OVA-Aerosol. 24 h nach der letzten Provokation wurde die Atemwegsreaktivität mittels Head-Out-Body-Plethysmographie gemessen.

Ferner zeigte sich keine Veränderung in der Anzahl der Leukozyten in der Bronchoalveolären Lavage (BAL). Ebenso wie die weitere Differenzierung der Leukozyten keine Veränderungen der Anzahl von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten auf (Abbildung 31).

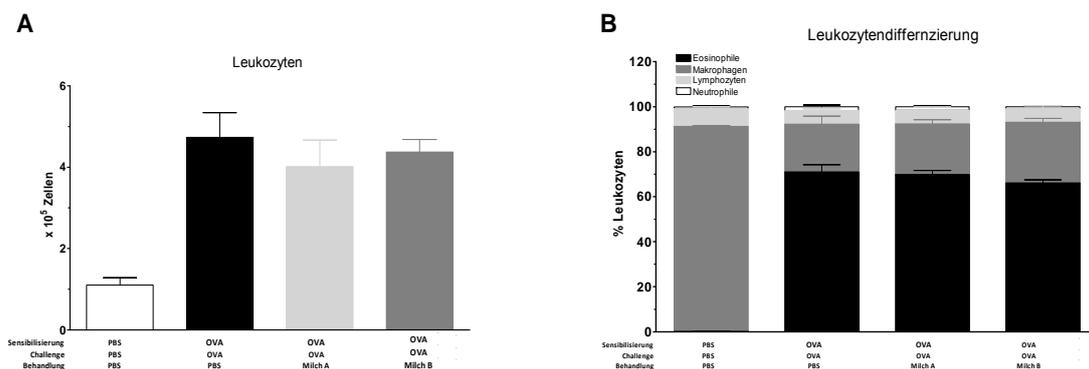


Abbildung 31: Leukozyten in der BAL nach 40-tägiger Milchfütterung im Model der allergischen Atemwegsentszündung

Balb/c-Mäuse (n=8 pro Gruppe) wurden täglich beginnend zehn Tage vor der Sensibilisierung intragastrisch (i.g) mit 200 µl Milch gefüttert. Anschließend erfolgte die dreimalige Provokation mit 1% OVA-Aerosol. (A) 24 h nach der letzten OVA-Provokation wurde die Gesamtzellzahl in der BAL-Flüssigkeit bestimmt und (B) die Differenzierung der Leukozyten in der BAL-Flüssigkeit durchgeführt.

Um den Einfluss der Milch bzw. der Milchfette auf die humorale Immunantwort zu untersuchen, wurden im Serum die Titer OVA-spezifischer Immunglobuline gemessen. In der nur mit OVA behandelten Gruppe konnten hohe OVA-spezifische Titer der Immunglobuline IgE, IgG₁ und IgG_{2a} detektiert werden. Während in der mit PBS behandelten Gruppe keine OVA-spezifischen Immunglobuline messbar waren. Weiterhin zeigte der Milchkonsum keinen Einfluss auf die Bildung von OVA-spezifischen IgE und IgG₁, jedoch ist ein tendenzieller Anstieg von OVA-spezifischen IgG_{2a} gegenüber mit der mit OVA behandelten Gruppe zu erkennen (Abbildung 32).

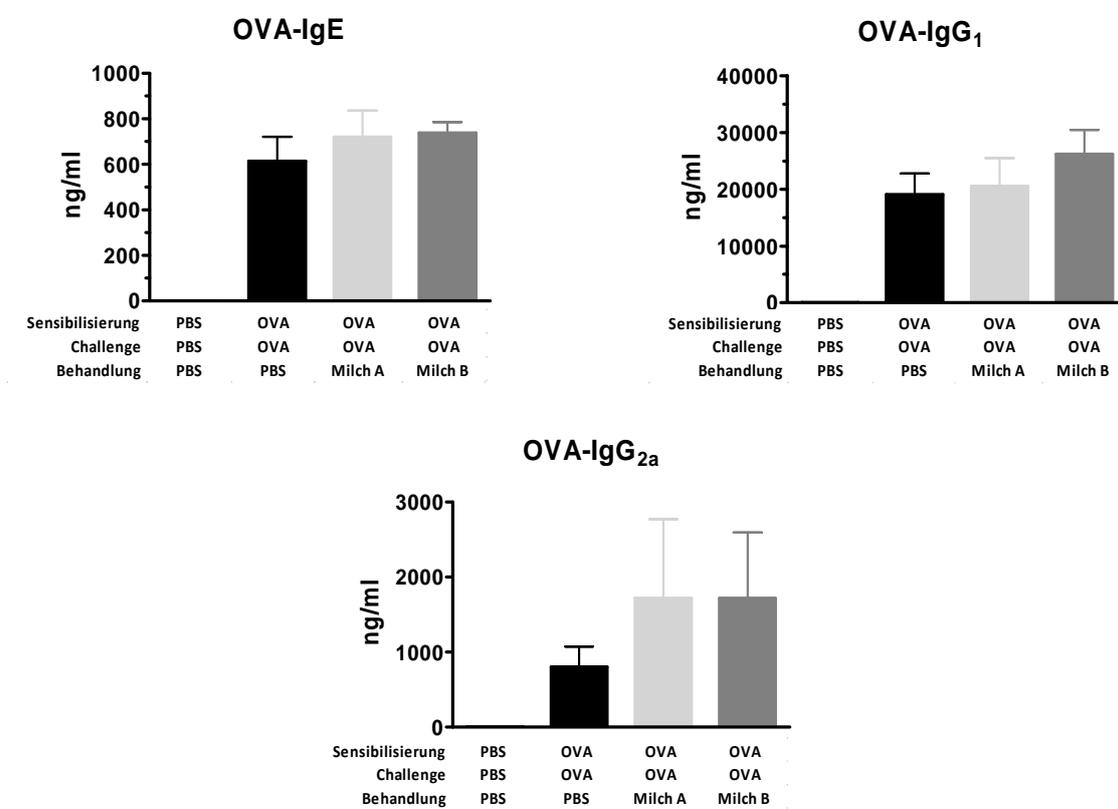


Abbildung 32: Immunoglobulinstatus nach 40-tätiger Milchfütterung im akuten Model der allergischen Atemwegsentzündung

Balb/c-Mäuse (n=8 pro Gruppe) wurden täglich beginnend zehn Tage vor der Sensibilisierung intragastrisch (i.g) mit 200 µl Milch gefüttert. Anschließend erfolgte die dreimalige Provokation mit 1% OVA-Aerosol. Die Bestimmung der OVA-spezifischen Immunglobuline IgE, IgG₁ und IgG_{2a} wurde mittels ELISA durchgeführt.

Die Milch bzw. die Milchfette zeigten in diesen Versuch keinerlei Einfluss auf den asthmatischen Phänotyp. Sowohl auf die Atemwegsreaktivität und die Leukozyten in der BAL, als auch auf die Antikörperproduktion blieb gegenüber der ausschließlich mit OVA

behandelten Gruppe unverändert. Aufgrund dieser eindeutigen Beobachtungen wurde auf die weitere Charakterisierung des asthmatischen Phänotyps verzichtet.

Die retrospektive Berechnung der durch die Milch insgesamt verabreichten CLA-Menge ergab eine durchschnittliche Verabreichung von ca. 48 µg pro Tag Alpenbauernhofmilch und ca. 16,5 µg pro Tag Hessenmilch

3.3.3 Die biologische Verfügbarkeit der CLAs nach Verabreichung ist gewährleistet

Das vorhergehende Pilotexperiment (s. Kap. 3.3.2) konnte durch die tägliche intragastrische Verabreichung von 200 µl Milch kein biologischen Effekt auf den asthmatischen Phänotyp im Mausmodell der akuten allergischen Atemwegsentzündung festgestellt werden. Zudem ergab der Vergleich der absoluten verabreichten Milchfettmengen mit Literaturwerten und -empfehlungen, dass deutlich geringere Fettmengen durch den geringen Milchkonsum aufgenommen wurden. Das Experiment jedoch zeigte, dass die tägliche Verabreichung größere Milchmengen nicht möglich ist. Des Weiteren ist eine *ad libitum* Milch-Fütterung der Mäuse anstelle von Wasser nicht möglich, da die konstante Kühlung der Milch während des gesamten Versuchs aufgrund eines hohen technischen Aufwands nicht möglich ist. Daher war es erforderlich eine neue bzw. konzentrierte Verabreichungsform der Milch bzw. ihrer Milchlipide zu ermöglichen. Dafür wurde die Milch bzw. die in der Milch vorhandenen Lipide in eine Standardmausdiät integriert (s. Kap. 2.3.13). Somit gelang es eine standardisierte und konzentriertere Verabreichungsform ohne Kühlungsbedarf zu gewährleisten.

Um sicherzustellen, dass die Milchlipide in den Zellmembranen der Mäuse aufgenommen werden und damit ihre biologische Verfügbarkeit garantiert ist, wurde zusätzlich zur Durchführung des akuten Modells der allergischen Atemwegserkrankung (Abbildung 9B) eine Kinetik der Plasma- und Erythrozytenmembranlipide über den Zeitraum von vier Wochen aufgezeichnet. Hierfür wurde den Mäusen aus den Kontrollgruppen und der Milchdiätgruppen wöchentlich Blut entnommen und die Lipidmuster bestimmt. Von zentraler Bedeutung dabei war der Einbau von CLAs, da die vorherigen epidemiologischen Analysen eine Korrelation zwischen dem CLA-Gehalt im Serum der Probanden und deren Milchkonsum zeigten (s. Kap. 3.2.5). Die Messungen des CLA-Gehalts im Plasma und Erythrozyten der Mäuse zeigten, dass die Mäuse die Milchdiäten konsumierten vergleichsweise höhere CLA-Spiegel in den Plasma- und Erythrozytenmembranen aufwiesen, als die Tiere, die nur die Kontrolldiät vorgesetzt bekamen (Abbildung 33).

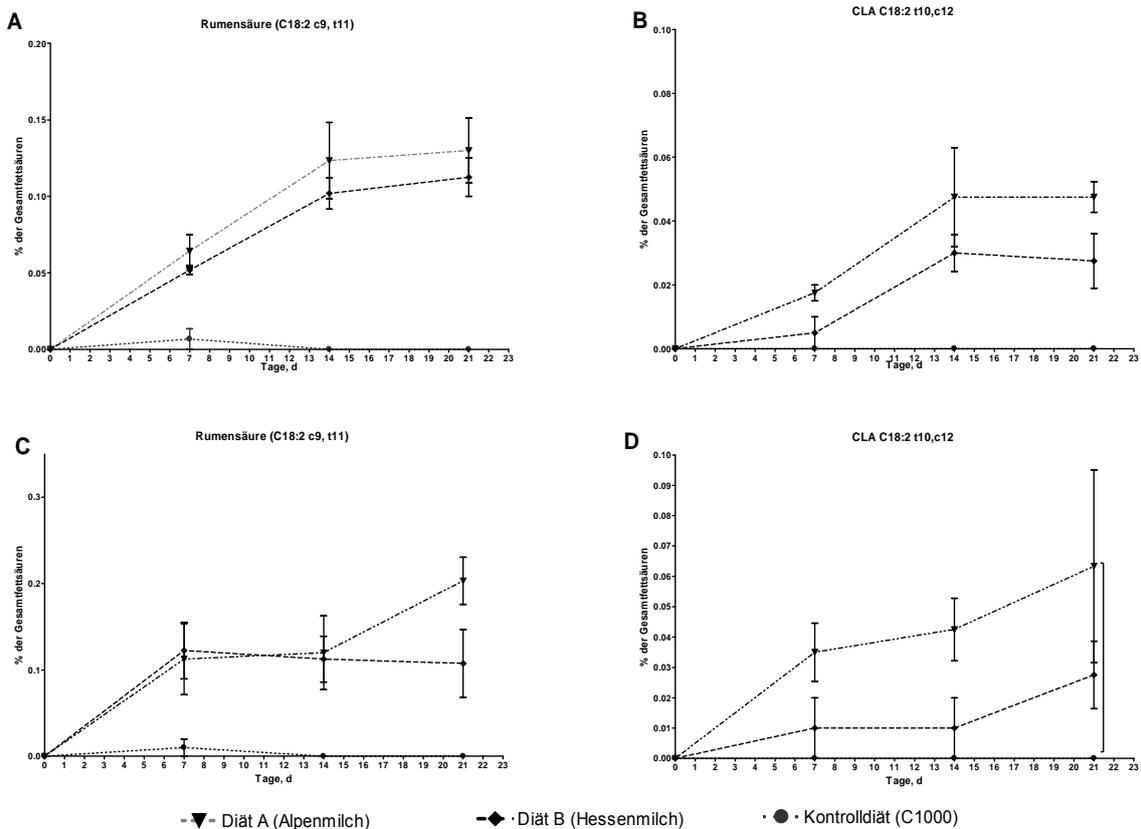


Abbildung 33: Kinetik der CLA-Aufnahme in Zellmembranen

Balb/c-Mäuse ($n=4$ pro Gruppe) wurden über einen Zeitraum von vier Wochen *ad libitum* mit verschiedene Maudsiäten und den Milchdiäten gefüttert. Wöchentlich erfolgten eine Blutentnahme und die Bestimmung der Fettsäurekomposition des Plasmas und der Erythrozytenmembranen. (A) Rumensäure und (B) C18:2 t10, c12 in Plasma, (C) Rumensäure und (D) C18:2 t10, c12 in Erythrozytenmembranen.

Um sicherzustellen, dass alle Versuchstiere täglich in etwa vergleichbare Fettmengen über die Diäten zu sich nehmen, wurden die täglich gefressenen Futtermengen dokumentiert. Anhand dieser Mengen ließen sich die über die Maudsiät zugenommen Fettmengen berechnen und vergleichen. Diese Berechnungen zeigten, dass die tägliche absolut zugenommene Gesamtfettmenge aller Versuchsgruppen vergleichbar ist (Tabelle 28). Während sich die Menge der einzelnen Fettsäuren, aufgrund der unterschiedlichen Fettsäuremuster der Diäten (s. Kap. 3.3.1) signifikant unterscheidet.

Tabelle 28: Futterkonsum der verschiedenen Versuchsgruppen

Balb/c-Mäuse (n=8 pro Gruppe) wurden über einen Zeitraum von zehn Tagen ad libitum mit verschiedene Mausdiäten und den Milchdiäten gefüttert. Täglich wurde der Futterkonsum dokumentiert und verglichen.

	Diät A (Alpenmilch)	Diät B (Hessenmilch)	Kontrolldiät (C1000)
MW ± SEM, g/d	2,37 ± 0,14	2,15 ± 0,13**	2,30 ± 0,11*
davon Protein, g	0,42	0,38	0,41
davon Fett, g	0,12	0,11	0,12
Omega-6, µg	351,13	265,76	7971,78
Omega-3, µg	109,39	106,22	425,10
CLA, µg	142,56	115,22	0,00
SFA, µg	6,02	9,00	1,71

Asteriks zeigt den Unterschied zur Kontrolldiät, *<0.05 und **<0.01

Des Weiteren wurde die prozentuale Gewichtsveränderung der einzelnen Tiere in den jeweiligen Versuchsgruppen bestimmt. Dafür wurde wöchentlich das Gewicht der Mäuse der Versuchsgruppen dokumentiert und das mittlere Gewicht berechnet. Die wöchentliche Gewichtsaufnahme der Mäuse zeigte, dass alle Tiere im vergleichbaren Maße über einen Zeitraum von acht Wochen zunahmen und im Vergleich zum Pilotversuch keine anfängliche Gewichtsabnahme zu verzeichnen ist (Abbildung 34).

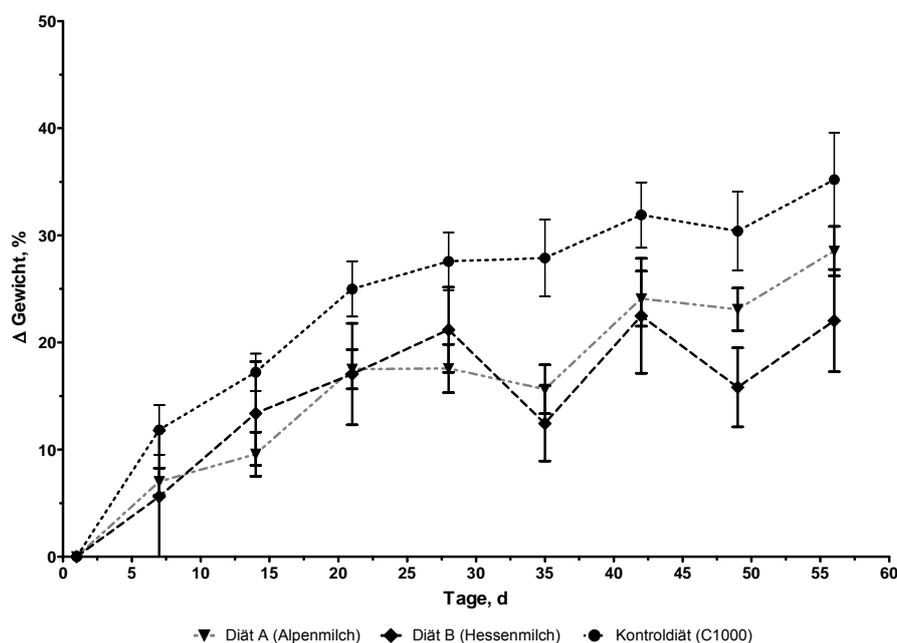


Abbildung 34: Prozentuale Gewichtszunahme der unterschiedlich gefütterten Versuchsgruppen

Balb/c-Mäuse (n=8 pro Gruppe) wurden über einen Zeitraum von vier Wochen ad libitum mit verschiedene Mausdiäten und den Milchdiäten gefüttert. Die Mäuse wurden wöchentlich gewogen und die prozentuale Veränderung des Körpergewichts berechnet.

3.3.4 Charakterisierung des asthmatischen Phänotyps nach Fütterung verschiedener Milchdiäten bzw. Milchfette

In den bisher beschriebenen Pilotversuch konnte die Verträglichkeit von Milch der Mäuse und die Aufnahme der Milchfette ins Plasma und die Erythrozytenmembranen nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass den Mäusen täglich nur eine für einen biologischen Effekt unzureichende Menge an frischer Milch verabreicht werden konnte, ohne das Anzeichen auf gesundheitliche Probleme der Mäuse auftreten. Daher wurden im Folgeversuch erneut die biologischen Effekte der Milchfette auf den asthmatischen Phänotyp im akuten Model der allergischen Atemwegsentszündung untersucht. Hierzu wurde Milch auf Bauernhöfen mit traditioneller Tierhaltung aus dem bayerischen Voralpenland und aus Mittelhessen gesammelt, pasteurisiert und sprühgetrocknet. Das dabei entstandenen Milchpulver wurde vom Tierfuttermittelhersteller Altromin (Lage, Deutschland) in zwei Diäten, Diät A (Alpenmilch) und Diät B (Hessenmilch), eingearbeitet (s. Kap. 2.3.13). Dabei wurde die Fettfraktion der Standarddiät durch die Milchfette ersetzt. Zusätzlich zu den mit den Milchdiäten gefütterten Gruppen wurde jeweils eine PBS- und OVA- Kontrollgruppe mit der Kontrolldiät (C1000, Altromin) gefüttert. Diese Kontrolldiät unterscheidet sich nur in der Zusammensetzung der Fettsäuren von den Milchdiäten. Der Gesamtfettgehalt (5%) der beiden Diäten wurden konstant gehalten.

Zuvor konnte nachgewiesen werden, dass die für die Herstellung notwendige Sprühtrocknung und Prozessierung der Milch verglichen mit der Fettsäurezusammensetzung der Ausgangsmilch keine Veränderungen in der Fettsäurekomposition der Diät hervorrufen hat (s. Kap. 3.3.1).

Um einen möglichen Einfluss der reinen Kontrolldiät (C1000, Altromin) auf den allergischen Phänotyp im akuten Model der allergischen Atemwegsentszündung (s. Kap. 2.3.2) zu untersuchen, wurde zusätzlich ein Vergleich mit der von uns üblich verwendeten Diät (Rod16R, LasVendi) durchgeführt. Die Zählung der Leukozyten in der BAL zeigte, dass die Sensibilierung und Provokation mit OVA lediglich in den mit der Rod16R-Diät gefütterten Tieren zu einer signifikanten Erhöhung der Gesamtzahl der Leukozyten im Gegensatz zur PBS-Kontrollgruppe führt. Während die Zahl der Leukozyten in den mit der Kontrolldiät gefütterten OVA-Tiere nur geringfügig erhöht war (Abbildung 35 A). Die weitere Differenzierung der Leukozyten zeigte, dass dieses verminderte Vorhandensein von Leukozyten bedingt war durch eine verringerte Anzahl von Lymphozyten, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten (Abbildung 35 B).

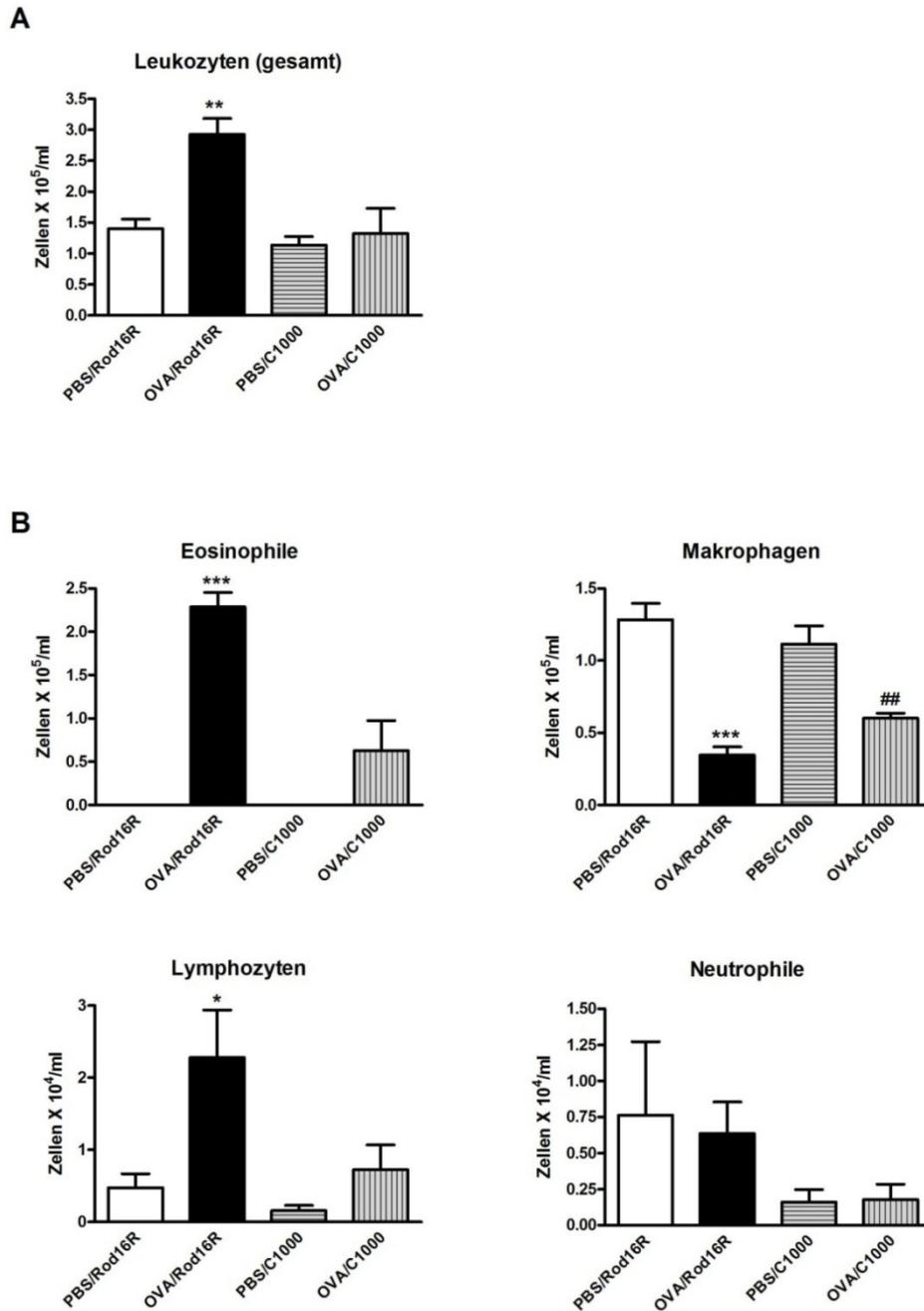


Abbildung 35: Leukozyten und Differenzierung der Leukozyten in der BAL nach Fütterung der Milchdäten

Balb/c-Mäuse ($n=8$ pro Gruppe) wurden während des Modells der akuten allergischen Atemwegsentzündung mit unterschiedlichen Diäten (Rod16R und C1000) gefüttert. Anschließend erfolgte die dreimaligen Sensibilisierung und die dreimalige Provokation mit 1% OVA-Aerosol. (A) die Bestimmung der Gesamtzahl der Leukozyten der BAL-Flüssigkeit und (B) die Differenzierung der Leukozyten in de BAL-Flüssigkeit. # Unterschied zwischen PBS- und OVA-Gruppe (C1000), * Unterschied zwischen PBS und OVA-Gruppe (Rod16R)

Des Weiteren wurde der Einfluss der Kontrolldiät auf die humorale Immunantwort untersucht. Hierfür wurden im Serum die Titer der OVA-spezifischen Immunglobuline gemessen. Unabhängig von der Fütterung der Tiere konnten im Serum der OVA-Tiere erhöhte Konzentrationen an OVA-spezifischen IgE und IgG_{2a} gegenüber den PBS-Kontrollgruppen

gemessen werden. Während die Produktion von OVA-spezifischen IgG₁ nur in den OVA-Tieren nach Fütterung der Rod16R-Diät signifikant erhöht war und nach Fütterung der Kontrolldiät nur schwach anstieg (Abbildung 36).

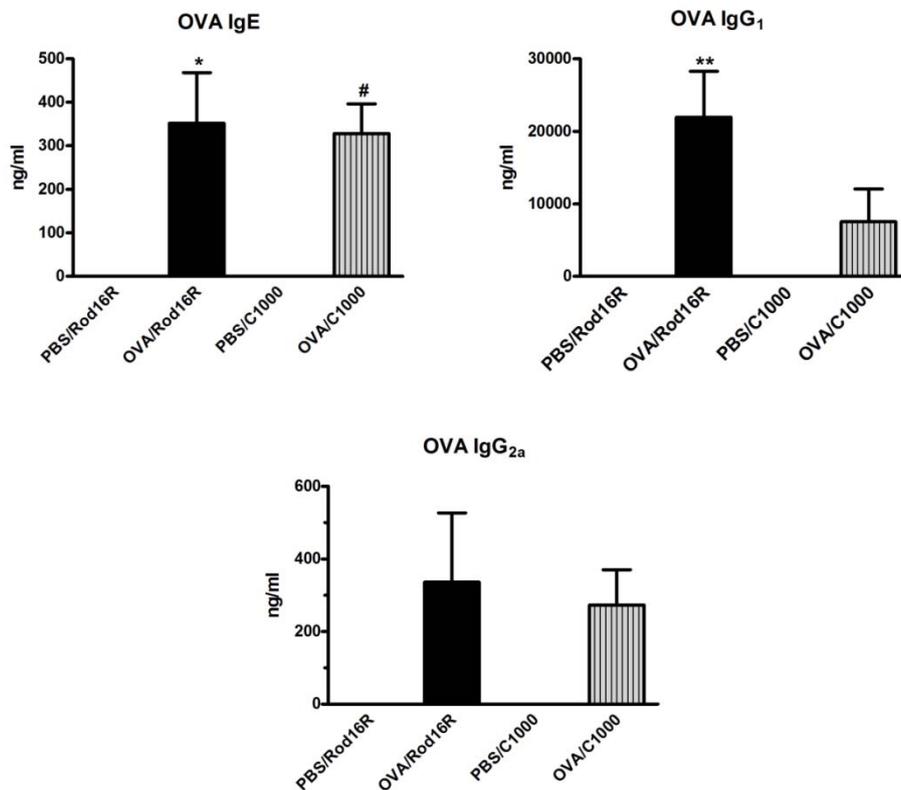


Abbildung 36 Immunglobulinstatus nach Fütterung der Milchdiäten

Balb/c-Mäuse (n=8 pro Gruppe) wurden während des Modells der akuten allergischen Atemwegsentzündung mit unterschiedlichen Diäten (Rod16R und C1000) gefüttert. Anschließend erfolgte die dreimaligen Sensibilisierung und die dreimalige Provokation mit 1% OVA-Aerosol. Die Seren wurden 48h nach der letzten OVA-Provokation entnommen. Die OVA-spezifischen-IgE, -IgG₁ und IgG_{2a} wurden mittels ELISA gemessen. # Unterschied zwischen PBS- und OVA-Gruppe (C1000), * Unterschied zwischen PBS und OVA-Gruppe (Rod16R)

Zur Überprüfung der Effekte der Milch-CLAs auf den allergischen Phänotyp im Model der akuten allergischen Atemwegsentzündung wurden die Tiere bereits vier Wochen vor Beginn des eigentlichen Protokolls mit den jeweiligen Diäten gefüttert, da sich nach vier Wochen konstanter Ernährung ein Gleichgewichtszustand (*steady state*) des Fettsäuremetabolismus der Tiere einstellt (Yaqoob et al., 2000). Anschließend wurden die weiblichen Balb/c-Mäuse dreimal gegen OVA sensibilisiert und nach zwölf Tagen an drei aufeinander folgenden Tagen mit 1 % OVA-Aerosol exponiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Atemwegsreaktivität gegenüber MCh mittel Head-Out-Body-Plethysmographie bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Fütterung der sprühgetrockneten Milchfette keine Verbesserung der Atemwegsreaktivität gegenüber der OVA-Kontrollgruppe hervorruft (Abbildung 37A). Die

Zählung und Differenzierung der Leukozyten in der BAL ergab, dass die Fütterung der Milchdiäten keine Reduzierung der Anzahl von Gesamtleukozyten, eosinophilen Granulozyten und Makrophagen in der BAL hervorruft. Die Fütterung der Diät A (Alpenmilch) führt hingegen zu einer Erhöhung der Gesamtleukozyten und eosinophilen Granulozyten im Vergleich zu der OVA-Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu kommt es zur signifikanten Reduzierungen der Lymphozytenanzahl und der neutrophilen Granulozyten in der BAL nach der Fütterung der Milchdiäten (Abbildung 37B und C).

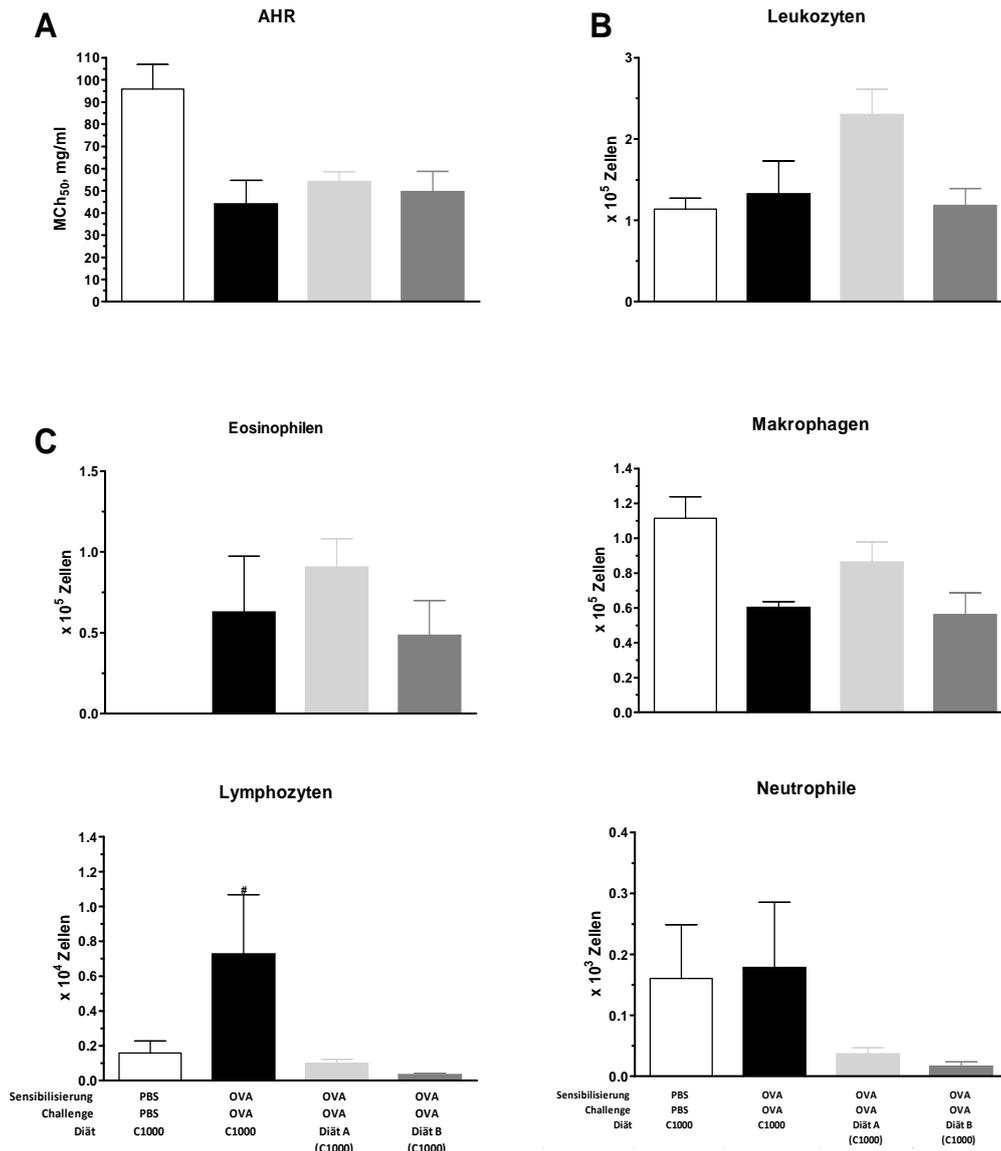


Abbildung 37: Atemwegsreaktivitätsmessung und Differenzierung der Leukozyten in der BAL nach Fütterung der Milchdiäten

Balb/c-Mäuse (n=8 pro Gruppe) wurden täglich beginnend vier Wochen vor der dreimaligen Sensibilisierung mit verschiedenen Diäten gefüttert. Anschließend erfolgte die dreimalige Provokation mit 1% OVA-Aerosol. Nach 24h erfolgte (A) die Messung der Atemwegsreaktivität mittels Head-Out-Body-Plethysmographie, (B) die Bestimmung der Gesamtzahl der Leukozyten der BAL-Flüssigkeit und (C) die Differenzierung der Leukozyten in der BAL-Flüssigkeit. # Unterschied zwischen PBS- und OVA-Gruppe (C1000), * Unterschied zwischen PBS und OVA-Gruppe (Rod16R)

Anhand der histologischen Untersuchungen des Lungengewebes (HE- und PAS-Färbung) konnte nur eine geringe Infiltration inflammatorischer Zellen und Vorhandensein mukusproduzierender Becherzellen in den OVA behandelten Mäusen im Gegensatz zur den PBS behandelten Tieren beobachtet werden. Der Vergleich der histologischen Schnitte der OVA behandelten Tiere und der mit den Milchdiäten gefütterten Mäuse zeigte keine Unterschiede in der Anzahl infiltrierender inflammatorischer Zellen und Becherzellen im Lungengewebe (Abbildung 38).

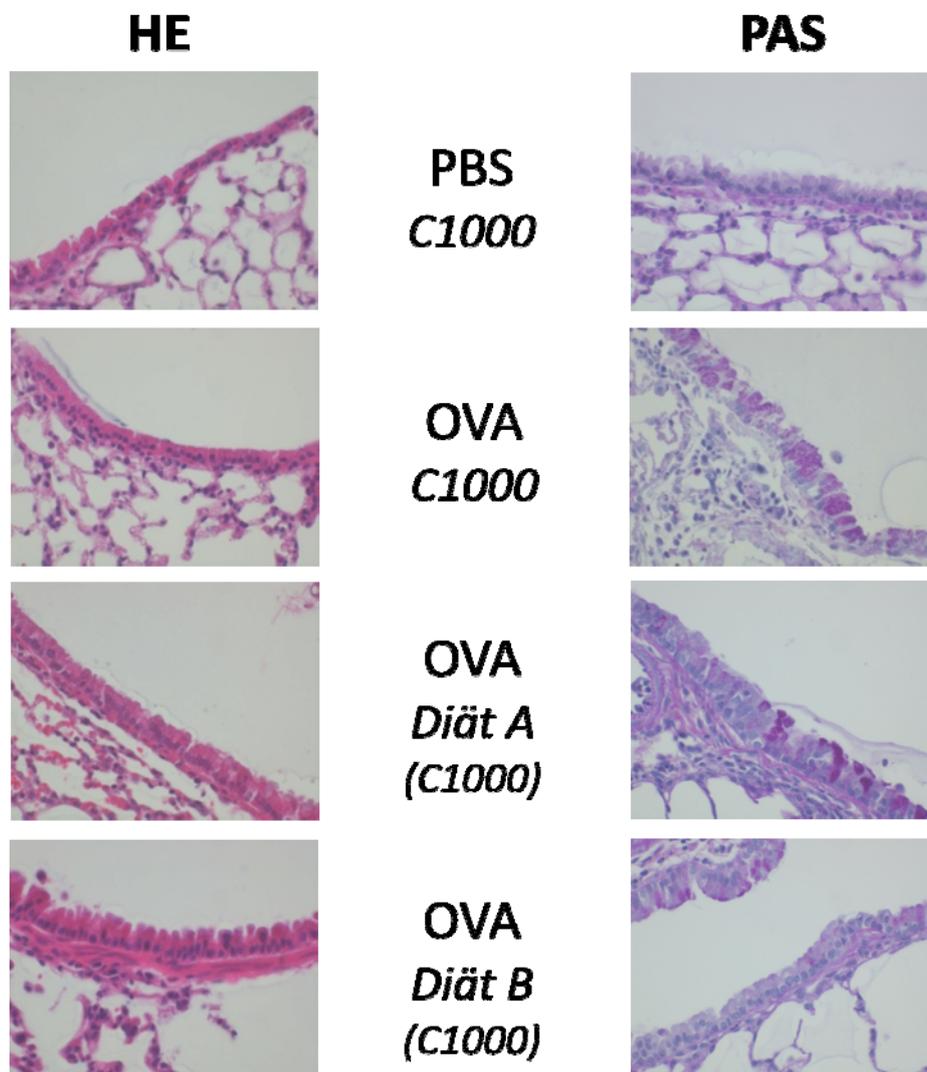


Abbildung 38: Lungenhistologie nach Fütterung der Milchdiäten

Balb/c-Mäuse (n=8 pro Gruppe) wurden täglich beginnend vier Wochen vor der dreimaligen Sensibilisierung mit verschiedenen Diäten gefüttert. Anschließend erfolgte die dreimalige Provokation mit 1% OVA-Aerosol. Die Lunge wurde in situ in Formalinlösung fixiert, Parafinschnitte wurde mit HE (Infiltration der inflammatorischen Zellen) und PAS (Becherzellenfärbung/lila) gefärbt.

Zusätzlich zu histologischen HE- und PAS-Färbung wurden die Becherzellen (Gobletzellen) und Mukusvolumen bezogen auf die Epithelfläche mit Hilfe des CAST-Systems quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass auch hier keine Unterschiede in der vorliegende Becherzellhyperplasie und Mukushypersekretion zwischen OVA behandelten und den mit den Milchdiäten gefütterten Mäuse festgestellt werden konnte (Abbildung 39).

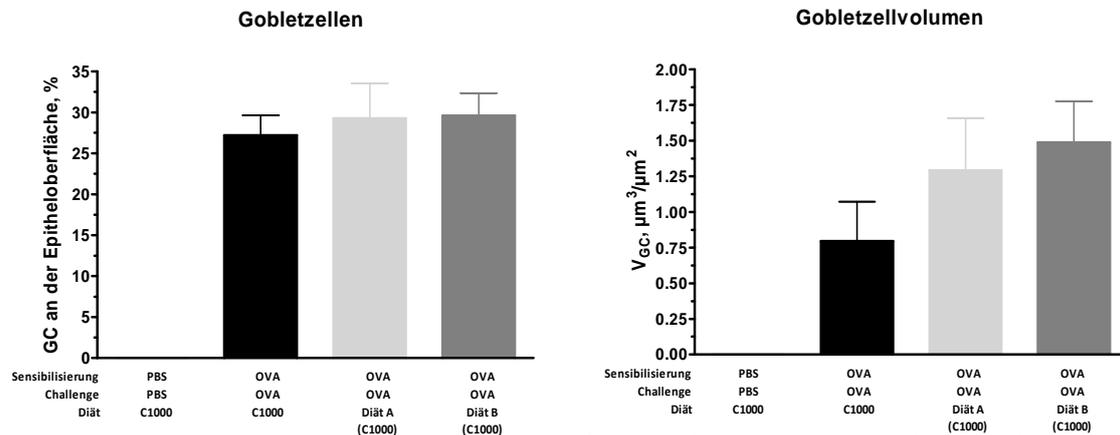


Abbildung 39: Anzahl der Gobletzellen und das Gobletzellenvolumen nach der Fütterung der Milchdiäten

Balb/c-Mäuse (n=8 pro Gruppe) wurden täglich beginnend vier Wochen vor der dreimaligen Sensibilisierung mit verschiedenen Diäten gefüttert. Anschließend erfolgte die dreimalige Provokation mit 1% OVA-Aerosol. Die Lunge wurde in situ in Formalinlösung fixiert. Die Parafinschnitte mit PAS (Becherzellenfärbung/lila) gefärbt und mittels des CAST-System ausgewertet. Dabei wurde der Anteil der Becherzellen (Gobletzellen) sowie das Mukusvolumen auf die Epithelfläche bezogen berechnet.

Die *ex vivo* OVA-Stimulierung der MNC's der lungendrainierten Lymphknoten zeigte keine Veränderung bzw. Reduzierung der Th₂-Zytokine IL-4 und IL-5. Im Gegenteil führte die Fütterung der Diät A (Alpenmilch) zur tendenziell erhöhten Produktion der beiden Zytokinen IL-4 und IL-5. Die Produktion von IL-10 wurde nicht durch die Fütterung der Milchdiäten beeinflusst, während diese zu einer erhöhten Produktion des Th₁-Zytokins Interferon- γ (IFN- γ) und IL-17a führte (Abbildung 40).

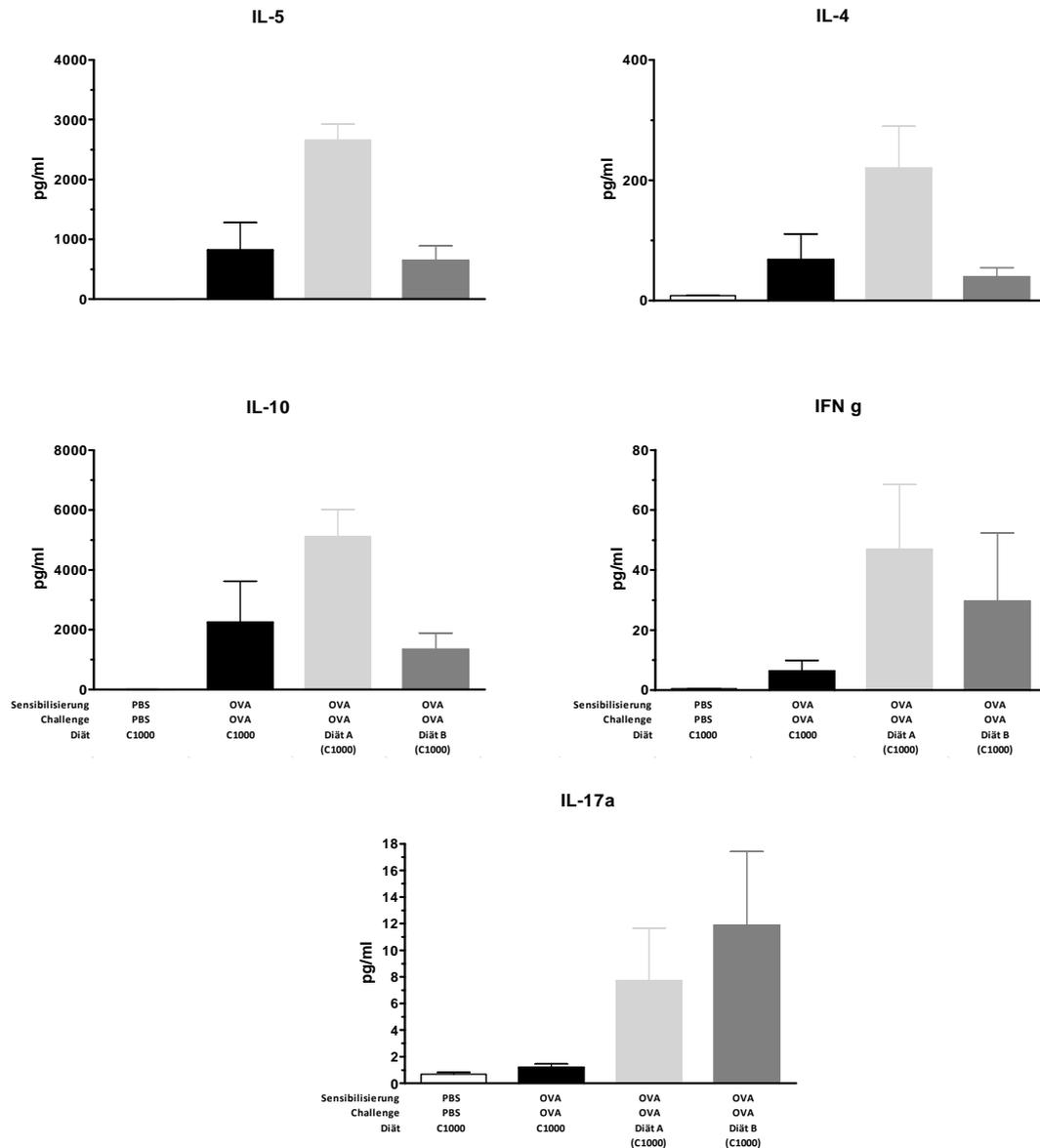


Abbildung 40: Konzentrationen der Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IFN-γ nach Fütterung der Milchdiäten

Balb/c-Mäuse (n=8 pro Gruppe) wurden täglich beginnend vier Wochen vor der dreimaligen Sensibilisierung mit verschiedenen Diäten gefüttert. Anschließend erfolgte die dreimalige Provokation mit 1% OVA-Aerosol. Anschließend wurden die MNC's der 48h nach der letzten OVA-Provokation entnommen lungendrainierenden LK 72h mit OVA stimuliert und die Zytokine mittels CBA-Flex bestimmt.

Um den Einfluss auf die humorale Immunantwort zu untersuchen, wurden die Serum-Titer der OVA-spezifischen Immunglobulinen IgE, IgG1 und IgG2a mit Hilfe von ELISA gemessen. Dabei zeigte sich kein Effekt der Milchdiäten auf die allergische Sensibilisierung bzw. humoralen Immunantwort. In den PBS-Tieren ließen sich erwartungsgemäß keine Immunglobuline detektieren (Abbildung 41).

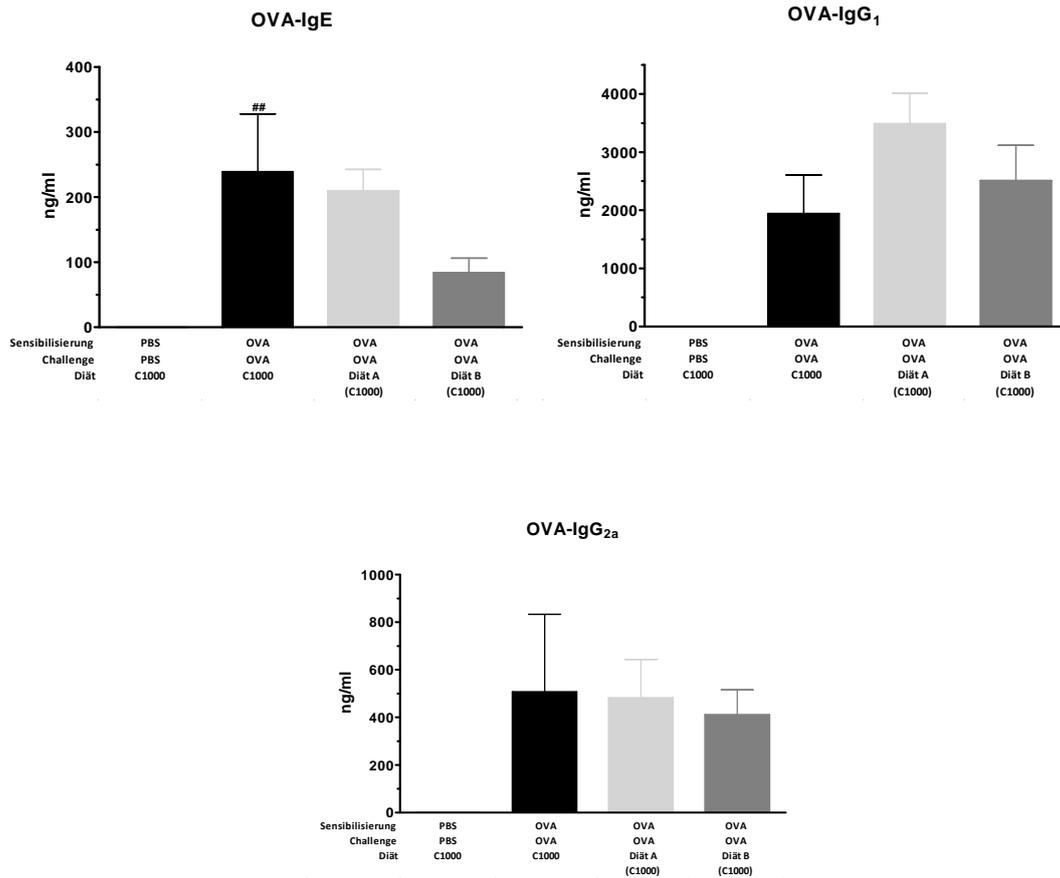


Abbildung 41: Immunglobulinstatus nach Fütterung der Milchdiäten

Balb/c-Mäuse ($n=8$ pro Gruppe) wurden täglich beginnend vier Wochen vor der dreimaligen Sensibilisierung mit verschiedenen Diäten gefüttert. Anschließend erfolgte die dreimalige Provokation mit 1% OVA-Aerosol. Die Seren wurden 48h nach der letzten OVA-Provokation entnommen. Die OVA-spezifischen-IgE, -IgG₁ und IgG_{2a} wurden mittels ELISA gemessen.

Zur weiteren Charakterisierung des asthmatischen Phänotyps wurden verschiedene der Arachidonsäure abstammenden Eicosanoide in der BAL-Flüssigkeit bestimmt. Es ist allgemein bekannt, dass Eicosanoide wie PGD₂, PGE₂ oder LTB₄ in der Pathogenese von Asthma eine zentrale Rolle einnehmen. Im Gegensatz zu Nicht-Asthmatikern können in den Atemwegen der Asthma-Patienten stark erhöhte Level der obengenannten Eicosanoide detektiert werden (Luster and Tager, 2004). Die Analysen zeigten, dass die Fütterung der Milchdiäten keine Veränderungen in der Synthese der Prostaglandinen D₂, E₂ und F_{1a} sowie des Leukotrienes B₄ hervorrief (Abbildung 42). Die zusätzlich gemessenen Analyten PGF_{2a}, TXB₂ und 5S-, 12S-, 15S-HETE lagen unterhalb ihrer Nachweisgrenze (s. Tabelle 4).

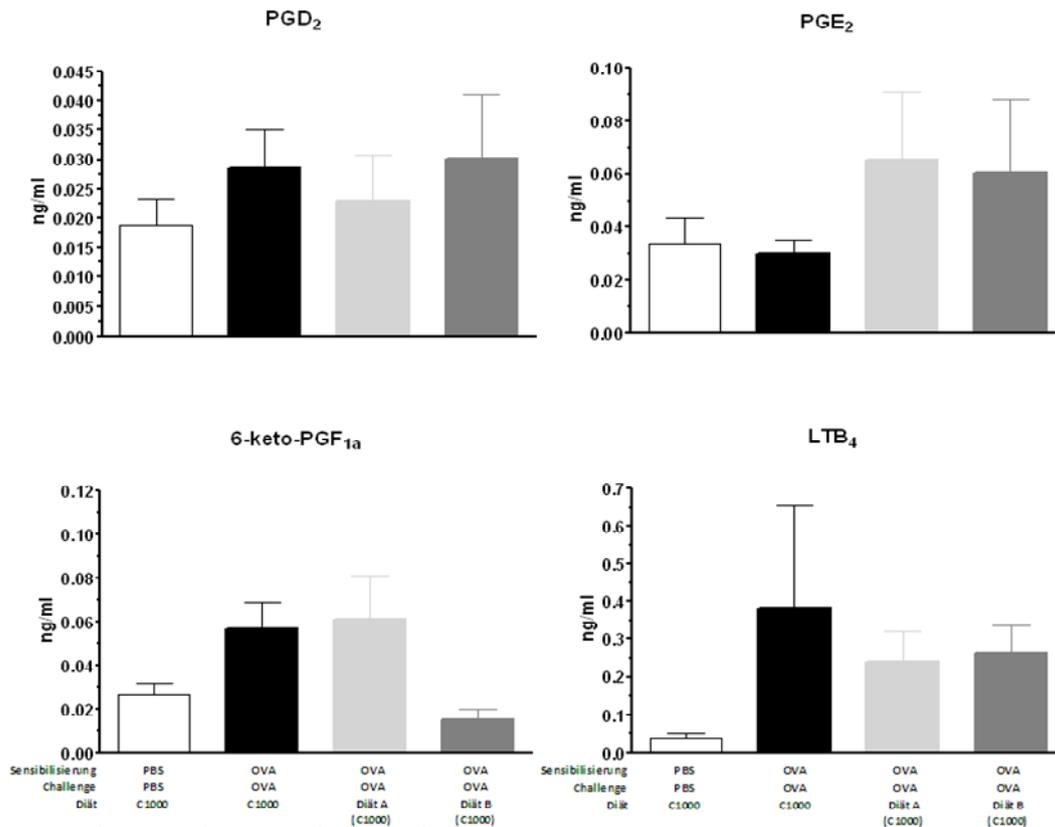


Abbildung 42: Eicosanoidkonzentrationen in der BAL nach Fütterung mit verschiedenen Diäten

Balb/c-Mäuse (n=8 pro Gruppe) wurden täglich beginnend vier Wochen vor der dreimaligen Sensibilisierung mit verschiedenen Diäten gefüttert. Anschließend erfolgte die dreimalige Provokation mit 1% OVA-Aerosol. Die BAL wurde 48h nach der letzten OVA-Provokation entnommen und die Eicosanoide mittels LC-MS/MS bestimmt.

Während den aus AA abstammenden Eicosanoiden eine pro-inflammatorische Wirkung zugesprochen, sind die aus EPA und DHA abstammenden Eicosanoiden für anti-inflammatorische Wirkung und die Resolution der Inflammation bekannt (Serhan, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit war jedoch nicht möglich diese Eicosanoide in der BAL aufgrund der nicht vorhandenen Methodik zu bestimmen. Deshalb wurden zumindest die freien Vorläufer EPA und DHA selbst in der BAL bestimmt, um möglicherweise über die EPA- und DHA-Konzentration in der BAL mögliche Schlussfolgerungen, der daraus eventuell auftretenden Veränderungen dieser Eicosanoide zu schließen. Auch diese Analysen zeigen ein ähnliches Bild wie die Analysen der Eicosanoidbestimmungen: Die Gruppen, die mit den Milchdiäten und der Kontrolldiät geführt wurden weisen geringere EPA- und DHA-Konzentrationen auf (Abbildung 43).

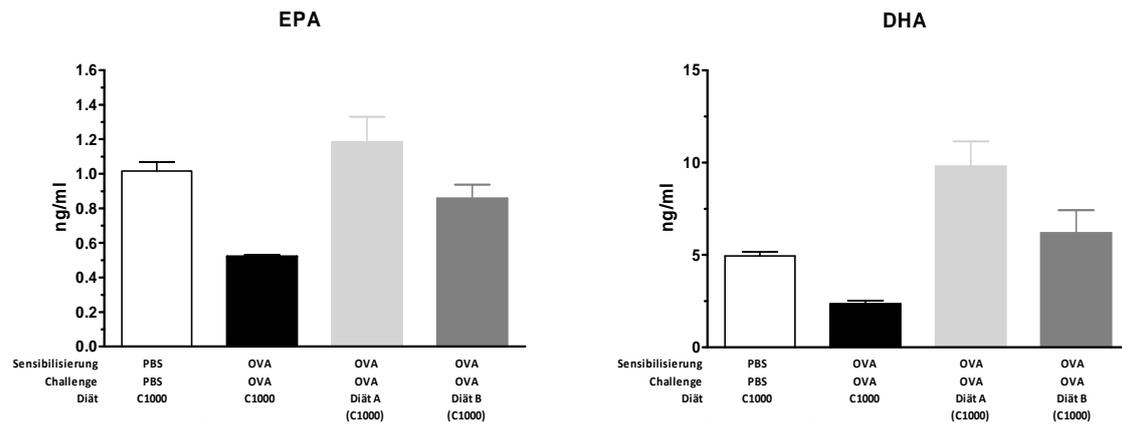


Abbildung 43: EPA und DHA Level in der BAL

Balb/c-Mäuse (n=8 pro Gruppe) wurden täglich beginnend vier Wochen vor der dreimaligen Sensibilisierung mit verschiedenen Diäten gefüttert. Anschließend erfolgte die dreimalige Provokation mit 1% OVA-Aerosol. Die BAL wurde 48h nach der letzten OVA-Provokation entnommen und die Konzentrationen von freier EPA und DHA mittels LC-MS/MS bestimmt

Zusätzlich wurden die Fettsäuremuster der unterschiedlichen Versuchsgruppen nach 40 tägiger Fütterung im Plasma und in den Erythrozytenmembranen untersucht. Dafür wurden den Mäusen während der Präparation Vollblut abgenommen und die Fettsäuren der beiden Blutkompartimente Plasma und Erythrozyten gaschromatographisch bestimmt und verglichen. Die Analysen zeigten, dass die Fütterung unterschiedlichen Diäten zur Veränderung der Fettsäuren in den Plasma- und Zellmembranen führen. Dabei sind die Fettsäuremuster der Mäuse, die mit den Milchdiäten gefüttert wurden, tendenziell vergleichbar, während sich im Gegensatz dazu deutliche Unterschiede in, mit der Kontrolldiät gefütterten Mäuse feststellen lassen, wie die Varianzanalyse mittels *One-Way ANOVA* zeigte (s. Anhang VII).

4 Diskussion

Nicht zuletzt die frühe Entwicklung der Kuhmilchwirtschaft im Neolithikum sowie die Verankerung der Laktosetoleranz im genetischen Repertoire der jungsteinzeitlichen Bauern vor ca. 7000 Jahren zeigte, dass der Konsum von Kuhmilch und die daraus entstehenden Produkte bereits damals zur täglichen Ernährung in vielen Teilen der Welt beitrug (Gerbault et al., 2011). Jedoch beschränkt sich der Konsum von Milch und Milchprodukten heutzutage beginnend mit der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts weitgehend auf den Verzehr von Milch, die zuvor pasteurisiert und homogenisiert wurde, um diese haltbar zu machen und die für Menschen teilweise gefährlichen mikrobiellen Keime abzutöten. Die Prozessierung der Milch führt allerdings zu Veränderungen von verschiedenen Milchkomponenten und das dabei entstehende Produkt weicht somit stark von der ursprünglichen Form der Rohmilch ab. Doch es gibt auch heute noch immer bestimmte Gruppen von Menschen, für die der Konsum von Rohmilch und -produkten einen wesentlichen Teil der täglichen Ernährung darstellt. Den größten Teilen dieser Menschen stellen die Bauern und ihre Familien dar, die selbst noch auf traditionell geführten Bauernhöfen leben und sich teilweise mit selbsthergestellten Produkten ernähren.

Parallel zu diesen veränderten Konsumgewohnheiten ist ein Anstieg der Allergieprävalenz im Speziellen von Asthma bronchiale innerhalb der letzten 50 Jahren zu beobachten (Masoli M 2004 #28). Die Symptome der allergischen Erkrankungen können heute zwar medikamentös stark gelindert, jedoch nicht geheilt werden und stellen somit ein weltweites Gesundheitsproblem dar. Die Entstehung von allergischen Erkrankungen erfolgt bereits im frühen Lebensalter. Es gibt zunehmend Hinweise, dass exogene Faktoren, die das Auftreten dieser Erkrankungen beeinflussen, ihren Effekt auf die Krankheitsentstehung bereits im frühen und vorgeburtlichen Lebensstadium ausüben (Alfven et al., 2006). In zahlreichen Studien konnte belegt werden, dass Kinder die auf Bauernhöfen aufwachsen, weniger häufig an Allergien und Asthma erkranken (Braun-Fahrländer C et al., 1999; Ege MJ et al., 2011). Im Rahmen dieser Studien konnte eine Vielzahl an Bauernhof-spezifischen Faktoren identifiziert werden, die invers mit dem Auftreten von allergischen Erkrankungen assoziiert werden konnten (Riedler J et al., 2001; Waser M et al., 2007). Unter anderem konnte dabei auch der Konsum von nicht abgekochter Bauernhofmilch als einer dieser Faktoren ausgemacht werden (Braun-Fahrländer and von Mutius, 2011). Interessanterweise konnte zuvor belegt werden, dass Milch neben Fleisch von Wiederkäuern eine der Hauptquelle für konjugierte Linolsäuren (CLA) in der täglichen Ernährung darstellt (Fritsche and Steinhart, 1998). Zusätzlich gibt es

vermehrt Hinweise dafür, dass CLA eine zentrale Bedeutung in der Immunmodulation und in der Auflösung von Entzündungen einnehmen (O'Shea et al., 2004; Bhattacharya et al., 2006).

Die ersten Daten in Bezug auf die Assoziation zwischen Allergie bzw. Asthma und dem Konsum von Bauernhofmilch führten hier zu der Hypothese, dass konjugierte Linolsäuren (CLA) aus der Bauernhofmilch immun-modulatorische Eigenschaften besitzen und deren Konsum daher die Entwicklung von allergischen Erkrankungen bzw. die atopische Sensibilisierung beeinflussen kann.

Zur Beantwortung der im Einleitungsteil aufgeworfenen Fragen sollte zu Beginn dieser Arbeit zunächst eine geeignete Methode zur Bestimmung der Fettsäuremuster in Serum, Erythrozytenmembranen und Kuhmilch etabliert werden. Zum Ende sollten die Ergebnisse aus den epidemiologischen Untersuchungen im Rahmen der PASTURE/EFRAIM-Studie in ein geeignetes *in vivo*-Modell translatiert werden und in einem „*Proof of concept*“-Versuch der Einfluss der Milchfettsäuren und des Milchkonsums auf Sensibilisierung und Ausprägung des allergischen Phänotyps des experimentellen Asthmas im Mausmodell untersucht werden.

4.1 Etablierung und Validierung der Fettsäureanalytik

Angesichts des positiven, gesundheitlichen Aspekts von LC-PUFAs stehen diese immer häufiger im Fokus von klinischen und epidemiologischen Studien (Calder, 2004a; Fetterman and Zdanowicz, 2009; Ruiz-Rodriguez et al., 2010). Jedoch ist die Analyse von Fettsäuren in verschiedenen Blutkompartimenten wie Plasma oder Erythrozyten im Rahmen dieser, meist umfangreichen Studien, mit zahlreichen Herausforderungen verbunden.

Eine der größten Herausforderungen stellt das häufig sehr hohe Probenaufkommen innerhalb der klinischen und epidemiologischen Studien dar. Um eine aussagekräftige sowie auch statistisch abgesicherte Aussage über Assoziationen zwischen einzelnen Fettsäuren und der Inzidenz verschiedener Erkrankungen zu ermöglichen, wird eine hohe Anzahl von Probanden für diese Studien vorausgesetzt. Die hohe Anzahl der Proben ist eng mit einem beachtlichen Zeitaufwand und einem erheblichen analytischen Aufwand verbunden. Daher sollte sich das Hauptaugenmerk bei der Entwicklung und Etablierung neuer Analysenmethoden auf die Gesamtanalysedauer und den zeitlichen Aufwand der Probenvorbereitung richten. Neben dem Faktor Zeit spielen bei einem hohen Probenaufkommen, auch die Kosten der Messung eine entscheidende Rolle. Um die Gesamtkosten der Analysen möglichst gering zu halten, sollte die Methodik relativ kosteneffektiv sein.

Eine zusätzliche Schwierigkeit liegt in den meist geringen Probenvolumina, die für die Fettsäureanalysen zur Verfügung stehen. Zum Einen liegt dies daran, dass die Zahl der zu bestimmenden Parameter innerhalb der Studien aus einer Probe sehr vielfältig und hoch ist. Zum Anderen werden immer mehr Studien bereits während der Schwangerschaft, bei der Geburt oder im frühen Kindesalter durchgeführt, also zu einem Zeitpunkt, bei dem noch nicht viel Analysematerial gewonnen werden kann. Vor diesem Hintergrund können Probleme mit der Detektion selten vorkommender Fettsäuren jenseits der Nachweisbarkeitsgrenzen auftreten. Es gilt daher einen geeigneten Kompromiss zwischen den verwendeten Probenvolumina und der Sensitivität der Methodik zu finden.

Nicht zuletzt ist die Vergleichbarkeit der Fettsäuremessungen aus verschiedenen Matrices und deren Probenvorbereitung von besonderem Interesse. Die parallele Messung von Fettsäuren aus Nahrungsmitteln und humanen oder murinen Matrices wie Serum oder Erythrozyten können zur Klärung von Zusammenhängen zwischen Nahrungsmittelaufnahme und Stoffwechselung beitragen, solange die Methodik eine Vergleichbarkeit garantiert. Eine solche Methodik ist insbesondere im Falle der Überprüfung von Fragebogenangaben bei wiederholten Ernährungserhebungen mittels Verzehrhäufigkeitsfragebögen (*englisch: food frequency questionnaires*) von hohem Nutzen. Über die Analyse von Fettsäuren in Serum oder Erythrozyten kann z.B. die Validität der Angaben durch Korrelationen mit bestimmten Fettsäurekonzentrationen überprüft werden.

Die Verteilung von Nahrungsfetten bzw. individueller Fettsäuren kann in Plasma, Serum, Cholesterolestern, Phospholipiden, Erythrozyten, Fettgewebe und anderen Geweben gemessen werden. Die besten Biomarker für das Ernährungsverhalten von Menschen sollten leicht zugänglich und sensitiv für kleine Schwankungen im Ernährungsverhalten sein sowie zeitnah in die Zellmembranen integriert werden (Willett, 1998). Aufgrund seiner geringen Umsatzraten stellt das humane Fettgewebe sicherlich den Goldstandard für die Beurteilung der Langzeiternährung dar (Baylin and Campos, 2006). Im Gegensatz dazu spiegeln die Fettsäuremuster verschiedener Blutkompartimenten wie Serum, Serumfraktionen und Erythrozyten das Kurzzeiternährungsverhalten von Tagen und Monaten wieder (Katan et al., 1997). Die Gewinnung von Fettgewebe in humanen Studien erweist sich allerdings als deutlich komplizierter und aufwendiger als die Abnahme von Blut. Die Messungen von Fettsäuren in unterschiedlichen Serumfraktionen wie Phospholipiden oder Triacylglyceriden sind aufgrund zusätzlicher prä-analytischer Schritte (z.B. Dünnschichtchromatographie) sehr zeitaufwendig.

Im Gegensatz dazu ist die Fettsäureanalyse in kompletten Lipidextrakten von großem Vorteil, da sie den schnellen Durchsatz von zahlreichen Proben ermöglicht (Stark, 2008).

Heute hat sich zur Analyse von Fettsäuren in verschiedenen humanen und biologischen Matrices die Gaschromatographie gekoppelt mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) als Standardmethode durchgesetzt (Dodds et al., 2005; Ruiz-Rodriguez et al., 2010). Die Analyse der Fettsäuren mittels Gaschromatographie erfordert je nach Anzahl der zu bestimmenden Analyten für die selektive Trennung aller natürlich vorkommenden Fettsäuren einen großen Zeitaufwand, da vor und nach der eigentlichen gaschromatographischen Messung zusätzliche prä-analytische Schritte der Probenaufarbeitung, wie z.B. Extraktions- und Transesterifizierungsschritte durchgeführt werden (Eder, 1995). Ebenso stellt die Spektrenauswertung einen nicht unerheblichen Zeitfaktor dar.

4.1.1 Praktikabilität, Selektivität und Sensitivität der Analysemethode sind gewährleistet

Um eine möglichst schnelle, reproduzierbare und vergleichbare Fettsäureanalytik in klinischen und epidemiologischen Studien zu gewährleisten, müssen die oben genannten Bedingungen erfüllt werden, in dem die Analysemethode an die zu beantwortende Fragestellung angepasst wird. Daher wurde unter Berücksichtigung der obengenannten Kriterien zu Beginn der Arbeit eine für das Biomonitoring von Fettsäuren aus der Kuhmilch und ihren Einbau in Serum und Erythrozyten geeignete Analytik entwickelt und anschließend validiert. Gleichzeitig sollte die entwickelte Methodik auch für Fettsäureanalysen von biologischen Materialien aus murinen *in vivo*-Versuchen dienen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher verschiedene Analytensäulen, Extraktions- und Derivatisierungsmethoden getestet und bei Bedarf miteinander verglichen.

In der Regel wird die Fettsäureanalytik in zwei Bereiche unterteilt in die Probenvorbereitung und in die Messung der aufbereiteten Proben im Analysesystem (GC-FID). Das Spektrum der zu bestimmenden Fettsäuren sollte in dieser Arbeit möglichst viele saturierte, einfach ungesättigte und mehrfach ungesättigte Fettsäuren beinhalten, um auch bereits kleine Veränderungen der Fettsäuremuster in Serum, Erythrozyten und Kuhmilch offenlegen zu können. Des Weiteren sollte auch die selektive Trennung und Quantifizierung von *trans* bzw. *cis* und von *cis/trans* bzw. *trans/cis*-Isomeren der einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren möglich sein. Die Selektivität einer chromatographischen Methode bzw. des Analysesystems hängt weitestgehend von der Analytensäule ab (Kromidas, 1999). Um eine möglichst hohe Selektivität der Analysemethode zu gewährleisten, wurden drei verschiedene Säulen mit unterschiedlichen Säulenmaterialien getestet und miteinander verglichen. Trotz der

Berücksichtigung einer möglichst kurzen Analysedauer zeigte sich, dass die Trennung von 46 verschiedenen Fettsäuren inkl. *cis/trans*-Isomere nur mit der 100 m langen CP-Sil 88 Säule von Varian möglich ist. Vorangegangene Vergleichsexperimente verschiedener Säulen für die Fettsäureanalytik mittels Gaschromatographie (GC) bestätigen dieses Ergebnis. Kramer et al. definierten dabei die CP-Sil 88 oder die baugleiche SP-2560 von Supleco als Goldstandard für die Analytik von C18:2 *cis/trans*-Isomeren sowie von CLAs. Insbesondere für die Fettsäureanalytik in der isomer-reichen Milch eignen sich diese hochpolaren Säulenmaterialien besonders gut (Delmonte et al.; Ratnayake et al.; Kramer JK et al., 2002). Neuste Vergleiche der CP-Sil 88 oder der SP-2550 mit einer neu entwickelten Säule (SLB-IL 11, Supleco Inc.) zeigten eine verbesserte Trennung verschiedener CLA-Isomere (Delmonte et al., 2011). Durch Optimierung des Temperaturprogramms und der Trägergasflussrate konnte die Analyse im Vergleich zu den von Kramer et al. beschriebenen Methoden auf eine Dauer von 98 min reduziert werden (Kramer et al., 2004). Auf eine weitere mögliche Reduzierung der Analysezeit durch Verwendung von Wasserstoff als Trägergas, an Stelle von Helium wurde aus Sicherheitsgründen verzichtet (Kaltenböck, 2008).

Noch vor einigen Jahren wurden die Analyse von CLAs meist in Kombination mit GC-Analysen und Silberionen-HPLC (Ag-HPLC) durchgeführt (Kramer et al., 2004). Das Prinzip der Silberionen-HPLC bedient sich der Eigenschaft von ungesättigten organischen Verbindungen Komplexe mit Übergangsmetallen, wie z.B. Silber, zu bilden und wodurch eine verbesserte Trennung erzielt wird (Christie and Han, 2010). Aufgrund der Entwicklung von bis zu 100 m langen hochselektiven Cyanopropyl-Siloxan-Kapillarsäulen und immer steigenden technischen Möglichkeiten ist die selektive Trennung von bestimmten CLA-Isomeren, wie C18:2 *c9,t11* (Rumensäure) und C18:2 *t10,c12*, mittlerweile auch ohne die Hilfe von Ag-HPLC möglich (Kramer JK et al., 2001). Demnach konnte auch in dieser Arbeit auf zusätzliche und zeitaufwendige Analyseschritte verzichtet werden.

Die Quantifizierung der Fettsäuren erfolgte mit Hilfe des Flammenionisationsdetektor (FID) und eines internen Standards (ISTD). Der FID spricht selektiv auf den organisch gebundenen Kohlenstoff in der Gruppe der Kohlenwasserstoffe an. In erster Näherung ist das Messsignal des Detektors der Anzahl der Kohlenwasserstoffe im Trägergas proportional. Dabei ist jedoch zu beachten, dass der FID abhängig von der Molekülstruktur ein unterschiedliches Ansprechverhalten besitzt (Ackman RG and Sipos JC, 1964). Um das entstandene Messsignal bzgl. dieses Ansprechverhaltens zu korrigieren, werden die theoretischen Responsefaktoren angewendet (Craske JD and Bannon CD, 1998). Die Responsefaktoren sind u.a. von Gasflüssen

und der Detektorgeometrie abhängig. Der Vergleich der empirisch für das verwendete Analysesystem ermittelten Responsefaktoren und der theoretischen Responsefaktoren wies keine Unterschiede auf. Demnach können die theoretischen Responsefaktoren zur Quantifizierung der Fettsäuren verwendet werden. Die Verwendung eines internen Standards bietet sich vor allem bei Analysemethoden an, die mehrere Schritte der Probenvorbereitung beinhalten. Dabei wird dieser bereits zu Beginn der Probenaufarbeitung hinzugegeben, um mögliche Fettsäureverluste während der Aufbereitung der Proben auszugleichen. Ein geeigneter interner Standard sollte vergleichbare chemische Eigenschaften, wie die zu bestimmenden Analyten besitzen, möglichst nicht oder nur in sehr geringen Mengen in der eigentlichen Probe natürlich vorkommen und sollte sich eindeutig in der Retentionszeit von den anderen Analyten unterscheiden (Palmquist and Jenkins, 2003; Schreiner, 2005). Alle diese Kriterien werden von dem hier verwendeten internen Standard C18:0 iso erfüllt.

Die Nachweis- (NWG, *englisch: LOD*) und die Bestimmungsgrenze (BG, *englisch: LOQ*) sind fundamentale Elemente der Methodvalidierung zur Beurteilung der Sensitivität der Analysemethode (Riley and Rosanske, 1996). Dennoch herrscht oftmals Uneinigkeit über die richtige Vorgehensweise zur Ermittlung dieser Grenzen. Die am weitesten verbreitete Herangehensweise bei chromatographischen Analysen, wie z.B. HPLC und GC, ist die Aufnahme des Signal-Rausch-Verhältnisses und die daraus folgende Berechnung der NWG und BG (Vial and Jardy, 1999). Die für die neu etablierten Methoden berechneten Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen lagen im Bereich von ppb (*englisch: parts per billion*) bzw. ppm (*englisch: parts per million*). Hervorzuheben dabei ist, dass in Erythrozytenmembranen sowohl die NWG als auch die BG für Fettsäuren niedriger waren als in Serum und Kuhmilch. Ein möglicher Grund dafür könnten die zusätzlichen Waschschriffe der Erythrozyten mit physiologischer Kochsalzlösung und dem damit verbundenen geringeren Grundrauschen der Messung sein. Ein Vergleich der NWG und BG der etablierten Methoden mit anderen Literaturwerten ähnlicher Methoden zur Fettsäureanalyse lieferte vergleichbare hohe Sensitivität (Bondia et al., 1994).

Häufig stehen in epidemiologischen oder klinischen Studien nur geringe Probenvolumina oder nur ein Aliquot der Probe für eine einmalige Analyse zur Verfügung. Sollte es nun jedoch zu Reparatur bedingten Ausfallzeiten des Analysegerätes kommen, ist die Stabilität der Analyten in den bereits aufgearbeiteten Proben von zentraler Bedeutung. Zudem liegt zwischen der Messung der ersten und letzten Probe ein möglicherweise sehr langes Zeitintervall, in dem sich die Proben nicht verändern dürfen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Überprüfung der Stabilität der bereits aufgearbeiteten Proben und folgender Lagerung bei -80°C wies eine ausreichende Stabilität der einzelnen Fettsäuren über einen Zeitraum von sechs Wochen nach. Im Normalfall sollten kleine Reparaturen und die Beschaffung der dafür erforderlichen Ersatzteile in einem Zeitraum von sechs Wochen zu bewältigen sein. Von daher dürfte die Messung der Fettsäuren bei geeigneter Lagerung (-80°C) nicht gefährdet sein.

4.1.2 Extraktion nach Hara & Radin führt ermöglicht die vollständige und quantitative Extraktion der Fettsäuren

Der erste Schritt der Probenaufarbeitung ist die Isolation der Gesamtlipide aus der Probenmatrix. Im Allgemeinen sind Lipide durch schwache hydrophobe van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbindungen oder Ionenbindung an andere zelluläre Komponenten gebunden (Christie and Han, 2010). Daher werden für die Isolation der Lipide Lösungsmittel benötigt, die nicht nur die Lipide aufnehmen, sondern auch die schwachen Bindungen zwischen den Lipiden und anderen Komponenten aufheben. In der Literatur werden verschiedene Lösungsmittel und Lösungsmittelgemische für die Isolation von Lipiden empfohlen (Folch J et al., 1957; Bligh EG and Dyer WJ, 1959; Hara A and Radin NS, 1978). Die optimale quantitative Extraktion der Lipide bzw. der einzelnen Fettsäuren konnte im Rahmen dieser Arbeit durch einen Vergleich der obengenannten Extraktionsprozeduren in unterschiedlichen Matrices (humanes Serum, Erythrozyten und Kuhmilch) im Hinblick auf die maximalen Ausbeuten sichergestellt werden. Der Vergleich der Extraktionsausbeuten der einzelnen Fettsäuren im Serum konnte keine Unterschiede in der Effizienz der unterschiedlichen Extraktionsmethoden darlegen. Trotzdem wurde die Extraktionsmethode von Hara und Radin für die Isolation bevorzugt, da die Methodik eine schnelle Probenaufarbeitung ermöglicht und im Vergleich zu den Methoden nach Folch bzw. Bligh und Dyer (Chloroform/Methanol) weniger gesundheitsschädliche und nicht toxische Lösungsmittel wie Hexan und Isopropanol verwendet werden (Folch J et al., 1957; Bligh EG and Dyer WJ, 1959; Hara A and Radin NS, 1978).

Bei der Isolation der Lipide aus Erythrozyten zeigte sich, dass die Ausbeute einiger Fettsäuren nach der Extraktion nach dem Protokoll von Folch et al. geringer war, als nach der durch Bligh und Dyer oder Hara und Radin beschriebenen Extraktion. Ein möglicher Grund dafür könnten die unterschiedlichen Polaritäten der Lösungsmittelgemische sein. Die geringe Polarität von Chloroform könnte demnach ausschlaggebend für die verstärkte Gerinnung von membrangebundenen Proteinen sein und die Extraktion der daran gebundenen Fettsäuren beeinflussen. Des Weiteren ist bekannt, dass die Ausbeuten aufgrund der unterschiedlichen

Salzkonzentrationen in den verwendeten Waschlösungen schwanken können. Eine Optimierung dieser Methode ist daher dringend erforderlich (Iverson et al., 2001). Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse und im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Methoden zur Bestimmung von Fettsäuren aus verschiedenen Matrices wurde auch für die Lipidextraktion aus Erythrozyten die Methode von Hara & Radin vorgezogen. Für die Extraktion der Lipide aus der Kuhmilch wurde dagegen kein Vergleich der unterschiedlichen Extraktionsmethoden durchgeführt, da bereits *a priori* die Methode nach Bligh und Dyer für Milchfettisolation empfohlen wird (Jensen, 2002; Tonial et al., 2009). Darüber hinaus besitzt die Methode nach Bligh und Dyer das größere Potenzial für hohen Probendurchsatz, da in dieser Methode ein geringeres Verhältnis von Lösungsmittel zu Probenvolumen von 5:1 (Bligh EG and Dyer WJ, 1959) verglichen mit anderen Methoden, wie z.B. nach Hara und Radin von 18:1 (Hara A and Radin NS, 1978), für die Extraktion benötigt wird. Diese Reduzierung des Gesamtvolumens ermöglicht somit die Extraktion im Kleinmaßstab von 15 ml.

Mittels Aufstockungsexperimenten von Serum- und Kuhmilchproben konnte aufgrund hoher Wiederfindungsraten (ca. 100 %) die Effizienz und die Praktikabilität der evaluierten Extraktionsmethoden nachgewiesen werden. Angesichts einer fehlenden Nullkontrolle der Fettsäuren in den Erythrozyten konnten keine Aufstockungsversuche in dieser Matrix durchgeführt werden. Häufig können sogenannte Matrixeffekte zu verminderten Wiederfindungsraten der aufgestockten Analyten führen (Matuszewski et al., 2003; Matuszewski, 2006). Die Berechnungen und der Vergleich der Wiederfindungsraten verschiedener Aufstockungsmengen bzw. -konzentrationen und die Überprüfung der Methodenlinearität lässt es jedoch bei Serum und Kuhmilch zu, mögliche signifikante Matrixeffekte auszuschließen. Neben einer guten Linearität der unterschiedlichen Methoden, konnte ebenfalls die Anfälligkeit bzw. Robustheit der jeweiligen Extraktionsmethoden mittels schrittweiser Reduzierung des Verhältnisses von Extraktionsreagenz zu Probenvolumen, durch Erhöhung des jeweiligen Probenvolumens nachgewiesen werden. Trotz der Reduzierung des Extraktionsreagenz blieben die absoluten extrahierten Mengen der einzelnen Fettsäuren konstant, sodass damit die maximale Extraktion nachgewiesen werden konnte.

4.1.3 Die Kombination von basen- und säure-katalysierten Methylierungsreagenzien führt zur erfolgreichen Derivatisierung der Fettsäuren

Bevor die Fettsäuren der Lipidextrakte mittels Gaschromatographie analysiert werden können, müssen diese in nicht-polare Derivate mit geringer molekularer Masse, wie Fettsäuremethylester (FAME), umgewandelt werden. Ferner ist ebenso die Auswahl einer geeigneten Derivatisierungsmethode für den Erfolg der Fettsäureanalyse von großer

Bedeutung. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf die Bedingungen des Methylierungsprozesses, wie die Temperatur und Auswahl des Methylierungsreagenz, gelegt werden (Christie and Han, 2010). Die Auswahl nicht geeigneter Reagenzien, Temperaturen und Inkubationszeiten fördern insbesondere die Isomerisierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie CLAs sowie die Bildung von Methoxyartefakten (Kramer JK et al., 1997). Es gibt zwei Möglichkeiten der Methylierung: die basen-katalysierte und die säure-katalysierte Methylierung (Eder, 1995). Im Allgemeinen gilt die basen-katalysierte Methylierung (z.B. NaOCH₃ oder TMG in Methanol) als verlässlichste Methode, da diese bei geringen Temperaturen weder Isomerisierung der Fettsäuren noch die Bildung von Methoxyartefakten hervorruft (Kramer et al., 1997; Park SJ et al., 2002). Im Gegensatz dazu führt die säure-katalysierte Methylierung (z.B. BF₃ oder HCl in Methanol) bereits bei geringen Temperaturen und langen Inkubationszeiten zur Isomerisierung sowie zur Bildung von Artefakten (Chen J et al., 2007). Allerdings ist es nicht möglich, freie Fettsäuren mit basischen Methylierungsreagenzien zu derivatisieren. Demzufolge wird häufig eine Kombination beider Verfahren angewendet. Dabei ist darauf zu achten, die Dauer und die Temperatur des säure-katalysierten Methylierungsschrittes möglichst gering zu halten (Ruiz-Rodriguez et al., 2010). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Vollständigkeit der Derivatisierung der verschiedenen Lipidfraktionen bzw. ihren Fettsäuren, zu ihren entsprechenden Fettsäuremethylestern unter den gewählten Bedingungen bestätigt werden. Um möglicher Isomerisierung und Methoxyartefaktbildung insbesondere von CLA vorzubeugen, wurde auf die schonende Kombination von basen- und säure-katalysierter Methylierung nach Park et al. zurückgegriffen (Park SJ et al., 2002).

4.1.4 Die Überprüfung der Mess- und Methodenpräzision bestätigt die Reproduzierbarkeit der Analyseergebnisse

Die Reproduzierbarkeit einer analytischen Methode beschreibt die Wiederholbarkeit der Analyseergebnisse und wird prinzipiell durch zwei Faktoren bestimmt. Zum Einen durch die Präzision des Analysesystems und zum Anderen durch die Präzision der Methode selbst. Die Methodenpräzision umfasst die Beurteilung aller Schritte der Methode (von Probenaufarbeitung bis Probenmessung), während die Gerätepräzision nur die Reproduzierbarkeit der eigentlichen Messung beschreibt. Deshalb wird die Validierung einer Methode meist in die Validierung des Analysesystems und die Evaluation der kompletten Methode, die alle Analyseschritte beinhaltet, unterteilt (Kromidas, 1999).

Die Überprüfung der Messpräzision und Messlinearität des Analysesystems zeigte, dass das GC-System nur geringe Schwankungen in den Ergebnissen der Wiederholungsmessung aufwies

und zudem über den überprüften Bereich von 0-1 mg FS/ml eine hohe Linearität zeigte. Damit konnte sichergestellt werden, dass das verwendete Analysesystem reproduzierbare und valide Ergebnisse liefert und somit für die Analyse großer Mengen an Studienproben geeignet ist.

Mit Hilfe der Bestimmung der Methodenpräzision konnte die Reproduzierbarkeit und Reliabilität der etablierten Methoden für die Analyse von Fettsäuren in Serum, Erythrozyten und Kuhmilch nachgewiesen werden. Die Methodenpräzision dient als Maß für die zufällige Streuung der Analyseergebnisse und lässt sich in die Präzision in Serie (Intra-Assay) und von Tag zu Tag (Inter-Assay) unterteilen (Kromidas, 1999). Die Variationskoeffizienten die im Kontext dieser Überprüfung berechnet wurden, schwankten unabhängig von der Natur der Proben zwischen 1 % und 14 % und weisen verglichen mit entsprechenden anderen Analysemethoden oder Normwerten eine sehr gute Reproduzierbarkeit auf (Firestone and Horwitz, 1979; Horwitz, 1982).

4.1.5 Fazit

Zur Überprüfung der Qualität der neu etablierten Methodik wurden folgende Parameter zur Validierung herangezogen: Selektivität, Reproduzierbarkeit, Robustheit, Präzision, Linearität und Sensitivität. Zur Gewährleistung dieser Parameter bzw. Eigenschaften der Methode wurde ein Validierungsplan entwickelt und abgearbeitet. Die Qualität einer analytischen Methode wird prinzipiell durch zwei Faktoren bestimmt. Zum Einen durch die Qualität des Analysesystems und zum Anderen durch die Methode selbst.

Nach Beurteilung aller Ergebnisse der Methodenentwicklung und -validierung lässt sich zusammenfassen, dass die neu etablierten Analysemethoden für Fettsäuren in humanen Serum- und Erythrozytenproben sowie in Nahrungsquellen wie der Kuhmilch, sehr gut für Analysen innerhalb einer epidemiologischen Studie geeignet sind. Die Praktikabilität und Reproduzierbarkeit der Methode konnte auch im Hinblick auf den Zeitaufwand, die Kosten und Trainingsaufwand nachgewiesen werden. Demnach ist es im ersten Teil dieser Arbeit erstmals gelungen eine vergleichbare Methodik für die Bestimmung verschiedener Fettsäuren, inklusive konjugierter Linolsäuren (CLA) in verschiedenen biologischen und diätetischen Quellen aus epidemiologischen Studien zu etablieren. Die entwickelten Analysemethoden ermöglichen neben der Beantwortung zahlreicher einzelner Fragestellungen auch das Biomonitoring von Nahrungsfetten und deren Einbau in biologische Membranen. Dieses Biomonitoring eignet sich besonders gut zur Untersuchung verschiedener Assoziationen zwischen Fettsäuren aus Nahrungsquellen, Fettsäuremustern in humanem Blut und allergischen Erkrankungen. Aufgrund der geringen benötigten Probenvolumina können mit dieser Methodik auch

Blutproben und Gewebeproben aus murinen *in vivo*-Studien sowie Proben *aus in vitro*-Versuchen auf ihre Fettsäureverteilung untersucht werden.

4.2 CLA-reiche Bauernhofmilch beeinflusst die Entwicklung von frühen Asthmasymptomen

In epidemiologischen Studien (ALEX- und PARSIFAL-Studie) konnte gezeigt werden, dass der Konsum von Milch auf traditionellen alpinen Bauernhöfen, vor allem im Kleinkindalter, mit der Protektion vor allergischen Erkrankungen einschließlich des Asthma bronchiale assoziiert ist (Riedler J et al., 2001; Waser M et al., 2007). Dabei konnte insbesondere die zentrale Bedeutung des Konsums von nicht abgekochter Rohmilch hervorgehoben werden. Auch außerhalb alpiner Regionen konnte der protektive Effekt von Bauernhofmilch nachgewiesen werden. Studien in ländlichen Gegenden auf Kreta (Barnes et al., 2001), in England (Perkin MR and Strachan DP, 2006b) sowie in Neuseeland (Wickens K et al., 2002) konnten die inversen Assoziationen zwischen dem Konsum von Bauernhofmilch oder -produkten und Allergie, Asthma oder atopischem Ekzem bestätigen. Die Gesamtheit aller Studien zeigte, dass der protektive Effekt des Konsums nicht abgekochter Bauernhofmilch unabhängig von anderen Bauernhofexpositionen ist. Zusätzlich gibt es erste Hinweise, dass die Route der Exposition durch die Aufnahme über den Gastrointestinaltrakt (von Mutius E and Vercelli, 2010) sowie der Zeitpunkt der Bauernhofexposition (Riedler J et al., 2001; Ege MJ et al., 2006) von zentraler Bedeutung sein könnten. Gerade die pränatale Phase ist häufig von essentieller Bedeutung als Zeitfenster („*windows-of-opportunity*“) für die Beeinflussung durch exogene Faktoren. Es gibt jedoch noch keine eindeutigen Hinweise darauf, welche der Milchfraktionen für die Schutzvermittlung verantwortlich ist oder ob es sich dabei um einen Synergismus mehrerer Makro- oder Mikrobestandteile der Milch handelt.

Nachdem im ersten Teil dieser Arbeit eine Analyseverfahren zur Bestimmung von Fettsäuren in verschiedenen biologischen und diätetischen Proben etabliert und validiert wurde, konnte nun im zweiten Teil der Arbeit die Messung und der Vergleich von Fettsäuremustern in Serum von Bauern- und Nicht-Bauern sowie in Bauernhof- und Molkereimilch innerhalb der PASTURE/Efrain-Kohorte durchgeführt werden. Hier stellte sich konkret die Frage, ob sich die Fettsäureprofile der Bauernhof- und Molkereimilch unterscheiden und ob der Konsum dieser unterschiedlichen Milch einen Einfluss auf die Entwicklung von allergischen Erkrankungen hat.

4.2.1 Assoziation zwischen Konsum von Bauernhofmilch und frühen Asthmasymptomen

Im Rahmen der im zweiten Teil dieser Arbeit durchgeführten epidemiologischen Analysen konnte zunächst gezeigt werden, dass auch in der PASTURE/EFRAIM-Studie der Konsum von Bauerhofmilch im Vergleich zum Konsum von Molkereimilch invers mit dem Auftreten von Asthmasymptomen assoziiert werden kann.

Um herauszufinden, ob der kindliche Konsum von Bauernhofmilch im Vergleich zum Konsum von Molkereimilch tatsächlich zum Schutz vor der Entwicklung von frühen Asthmasymptomen beiträgt, wurde vier Jahre nach Beginn der Studie eine Fall-Kontroll-Studie (FKS) (n=160) in die laufende Studie eingebettet. Dafür wurde neben der Fallgruppe auch eine Vergleichsgruppe, die diese frühen Asthmasymptome nicht aufweist, mit gleicher Anzahl (n=80) ausgewählt. Alle ausgewählten Teilnehmer der FKS stammten aus der PASTURE-Kohorte. Demnach spricht man hier von einer populationsbasierten Fall-Kontroll-Studie. Um Zentrumsffekte (*Confounder*) auszuschließen, wurde auch eine Gleichverteilung der Zentren und des Bauernstatus herbeigeführt. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass die Hälfte der Probanden in der FKS Bauern und die andere Hälfte Nicht-Bauern waren, die in einem vergleichbaren Umfeld leben. Normalerweise stellt die eigenständige Auswahl der Kontrollgruppe einer FKS einen möglichen Selektionsbias dar. Dieser kann jedoch durch gemeinsame Ein- und Ausschlusskriterien der Fälle und Kontrollen, wie sie bei der vorangegangenen Auswahl der Population der PASTURE-Kohorte berücksichtigt wurden, minimiert werden. Ein großer Vorteil der FKS ist die schnelle Verfügbarkeit ihrer Ergebnisse, da die Untersucher die Fälle unabhängig von der natürlichen Häufigkeit der Krankheit rekrutieren können und trotzdem einen Vergleich anstellen können. Des Weiteren sind dadurch, dass deutlich weniger Analysen als in einer großen Kohorte notwendig sind, die Kosten und der Zeitaufwand der Studie deutlich reduziert (Fletcher et al., 1999).

Allerdings ist bei der Beurteilung der hier erhobenen Ergebnisse zu beachten, dass es zum Zeitpunkt der Auswahl der Fälle und Kontrollen noch keine Kinder mit ärztlicher Asthmadignose innerhalb der PASTURE-Kohorte gab. Zuverlässig lässt sich Asthma frühestens im Alter von etwa sechs Jahren klinisch diagnostizieren (Asher et al., 2006; Ring, 2010). Daher wurde für die Auswahl der Kinder in der Fallgruppe eine Asthmavariablen deklariert, die mehrere frühe Krankheitszeichen wie z.B. das Auftreten von Giemen oder von Bronchitisanfällen sowie die ärztlich angeordnete Behandlung des Kindes mit einem Asthmamedikament vereinte. Diese gelten als Indikatoren für die spätere Entwicklung von Asthma. (Holgate ST, 2008).

Zu Beginn der Analysen wurde eine detaillierte Charakterisierung der Studienpopulation durchgeführt, um alle wichtigen Unterschiede der Fall- und Kontrollgruppe zu identifizieren und somit bei der Auswertung unter Kontrolle zu halten. Dies ist notwendig wenn man zeigen möchte, dass ein bestimmter protektiver Faktor von anderen unabhängig und deshalb eine mögliche Ursache ist. Diese Verteilungsanalysen zeigten, dass zu beiden Zeitpunkten der Milchsammlung signifikant weniger Bauernhofmilchproben von den Familien, deren Kinder an frühen Asthmasymptomen leiden, abgegeben wurden, als von den Familien der Kinder in der Kontrollgruppe. Zudem befinden sich signifikant mehr Jungen als Mädchen in der Fallgruppe. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch mit Erkenntnissen anderer Studien. Demnach weisen Mädchen sowie Frauen eine höhere Prävalenz an Asthma zu erkranken auf (McHugh et al., 2009; Ring, 2010).

In beiden Gruppen der FKS war es zunächst notwendig zu untersuchen, ob bei den Kindern vor oder zum Zeitpunkt der Analysen überhaupt eine Exposition gegenüber Milch vorhanden war. Die vorangegangene Exposition ist die Voraussetzung für eine mögliche Schutzvermittlung und muss für die Berechnung der Assoziation zwischen Bauernhofmilch und Asthmasymptomen zuvor auf Gewährleistung überprüft werden. Zur Berechnung dieser Assoziation wurden zwei Zeitpunkte der Studie (zwei Monate und viereinhalb Jahre) ausgewählt. Für den Zeitpunkt von viereinhalb Jahren konnte gezeigt werden, dass alle Kinder entweder Bauernhof- oder Molkereimilch konsumierten und somit exponiert waren. Im Gegensatz dazu wurden zum Zeitpunkt von zwei Monaten nur fünf Kinder mit Kuhmilch gefüttert. Jedoch lässt sich mutmaßen, dass gerade in diesen traditionell geführten Familien aus ländlichen Gegenden der Großteil der Kinder nach der Geburt gestillt wurde und damit indirekt über die Muttermilch den Milchkomponenten exponiert war. Im Rahmen dieser Analysen konnte diese Annahme durch die Berechnung der Anzahl der Kinder, die bis zu ihrem sechsten Lebensmonat der Kinder gestillt wurden, bestätigt werden. Zu diesem Zeitpunkt wurden mehr als die Hälfte der Kinder gestillt und es ist davon auszugehen, dass im Alter von zwei Monaten der Anteil der gestillten Kinder noch deutlich höher war. Ein großer Vorteil des hiesigen Studiendesigns ist, dass die Eltern während der Milchsammlung die Anweisung bekamen, die Milch abzugeben, die ihre Kinder oder sie selbst auch tatsächlich täglich trinken. Diese Gegebenheit lässt die Annahme zu, dass die Wahrscheinlichkeit der tatsächlichen Exposition gegenüber mit der zu diesem Zeitpunkt gesammelten und analysierten Milch vorhanden war.

Hoppu et al. bekräftigte die Annahme, dass sich die Ernährung bzw. die Fettsäureaufnahme über die tägliche Ernährung in den Fettsäuremustern der Muttermilch widerspiegeln lässt

(Hoppu et al., 2011). Der weitere Transfer der Fettsäuren aus der Milch zum Kind wurde ebenfalls erst kürzlich in einem Übersichtsartikel von Lauritzen und Carlson (Lauritzen and Carlson, 2011) beschrieben. Eine weitere Möglichkeit des Fettsäuretransfers zwischen Mutter und Kind kann bereits *in utero* stattfinden. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass Fettsäuren, insbesondere auch LC-PUFAs, plazentagängig sind (Blümer and Renz, 2007; Koletzko et al., 2007). Im Rahmen der epidemiologischen Analysen dieser Arbeit konnte dies durch die hohe Korrelation verschiedener Fettsäuregruppen in mütterlichem und kindlichem Serum bestätigt werden. Die Serumfettsäuren im mütterlichen Serum und dem Nabelschnurblut weisen eine für biologische Verhältnisse sehr hohe Korrelation auf. Ebenso war die Korrelationen der Fettsäuren zwischen den mütterlichen Serumfettsäuren und den Serumfettsäuren der Kinder nach dem ersten Lebensjahr der Kinder immer noch sehr hoch. Die einzige Verbindung zwischen Mutter und Kind im ersten Lebensjahr ist das Stillen der Kinder. Somit dürfte ein kausaler Zusammenhang zwischen mütterlicher Ernährung und den kindlichen Fettsäuren gewährleistet sein. Diese Beobachtungen bekräftigt die Annahme, dass die von der Mutter über den Konsum von Milch zu sich genommen Fettsäuren, durch das Stillen an die Kinder weitergeben werden. Insofern scheint auch die mütterliche Ernährung während der Schwangerschaft und in den ersten Monaten nach der Geburt eine wichtige Rolle in der Protektion vor allergischen Erkrankungen zu spielen (Devereux, 2008; Willers et al., 2008). Unlängst konnte in einer Arbeit von Thijs et al. zur KOALA-Studie gezeigt werden, dass Fettsäuren in der Muttermilch invers mit dem Auftreten des atopischen Ekzems oder der atopischen Sensibilisierung assoziiert werden können (Thijs et al., 2011).

4.2.2 Die Fettsäureprofile von Bauernhof- und Molkereimilch unterscheiden sich hauptsächlich im CLA-Gehalt

Aufgrund der vorangegangenen Analysen und zuvor durchgeführten Studien (Riedler J et al., 2001; Waser M et al., 2007) stellte sich nun die Frage, was die Bauernhofmilch von der gewöhnlichen Molkereimilch unterscheidet und welche Komponenten der Milch für diesen beobachteten Effekt verantwortlich sind. Um mögliche protektive Bestandteile der Milch zu identifizieren und die protektive Milch genauer zu charakterisieren, wurden die Fettsäuremuster der Bauernhof- und Molkereimilch bestimmt und verglichen. Dieser erstmalige Vergleich von Bauernhof- und Molkereimilch im Rahmen eines in Kap. 2.2.1 beschriebenen Studiendesigns zeigte, dass sich die Bauernhof- und Molkereimilch aus beiden Milchsammlungen signifikant im Gehalt von CLAs unterscheiden. Die Gruppe der CLAs beinhaltet in diesem Fall die am häufigsten natürliche vorkommenden Isomere C18:2 c9,t11 (Rumensäure) und C18:2 t10,c12. In den letzten Jahren wurden diese Isomere verstärkt mit

der Protektion vor chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie Diabetis, Krebs, Arthritis (Lee et al., 1994; O'Shea et al., 2004; Kelley et al., 2007) oder aber auch Asthma bronchiale in Verbindung gebracht (Macredmond and Dorscheid, 2011). Zudem konnte im Rahmen einer klinischen Studie die Wirksamkeit und Verträglichkeit von CLA als Ernährungszusatz bei übergewichtigen Patienten mit schwachem Asthma bekräftigt werden. Die Behandlung mit CLAs führte zur Verbesserung der Atemwegsreaktivität und gleichzeitig zur Veränderung des Body-Mass-Index (BMI) (Macredmond et al., 2010).

Zusätzlich zum unterschiedlichen CLA-Gehalt wies die Bauernhofmilch geringere Menge an n6-Fettsäuren auf. Dieser Unterschied war jedoch nur für die Bauernhofmilch aus der ersten Milchsammlung statistisch signifikant. Dieser geringere Anteil an n6-Fettsäuren in Bauernhofmilch führte folgerichtig auch zur Reduzierung des n6/n3-Ratio und des n6/n3-Index und demnach zu einem signifikanten Unterschied dieser beiden Verhältnisse in Bauernhof- und Molkereimilch. Die Verteilung der n6-Fettsäuren in der täglichen Ernährung ist nicht ausschließlich auf den Konsum von Milch zurückzuführen, während Milch als Hauptquelle für die CLA-Zufuhr in der täglichen Ernährung bekannt ist (Fritsche and Steinhart, 1998), wurden die weiteren Analysen auf den Gehalt von CLAs beschränkt.

Der Vergleich des CLA-Gehalt in der Milch der unterschiedlichen Studienzentren wies auf eine stark heterogene Verteilung der CLA-reichen und -armen Milchproben hin. Aus diesem Grund wurden alle durchgeführten Analysen auf die jeweiligen Zentren adjustiert, um mögliche Heterogenitätseffekte auf die Ergebnisse auszuschließen. Zudem zeigten diese Analysen, dass die meisten CLA-reichen Proben aus der Schweiz und die Milchproben mit dem niedrigsten CLA-Gehalt aus Finnland kamen. Daraufhin stellte sich die Frage was bzw. welche Faktoren den CLA-Gehalt in der Bauernhofmilch beeinflussen und für den deutlichen Unterschied zwischen Bauernhof- und Molkereimilch verantwortlich sind.

Ähnlich wie bei dem Vergleich von Bauernhof- und Molkereimilch konnte auch ein höherer CLA-Gehalt in den Milchproben nachgewiesen werden, die von den Bauernfamilien stammen, als die die von Nicht-Bauernfamilien abgegeben wurden. Demnach konnte scheinbar erstmals nachgewiesen werden, dass der erhöhte CLA-Gehalt eine charakteristische Eigenschaft von Bauernhofmilch aus der PASTURE-Kohorte ist. Es bleibt jedoch die Frage offen, welche Faktoren für diesen erhöhten CLA-Gehalt verantwortlich sind. Zur Beantwortung dieser Frage sollten die parallel zu der Probensammlung erhobenen Daten bzgl. der Herkunft der Milch, der Tierhaltung der Milch etc. herangezogen werden. Eine Studie von Ellis et al. (2006) zum Vergleich des PUFA-Gehalt von organisch und konventionell hergestellter Milch lieferte

detaillierte Hinweise für den Einfluss von unterschiedlichen Bauernhofsystemen (extensiv oder intensiv geführte Landwirtschaft) (Ellis et al., 2006). Dabei wurden folgenden Einflussfaktoren auf den PUFA-Gehalt identifiziert: Saison, Weidehaltung, Fütterungsstrategie und Kuhrasse.

Wie bereits erste Analysen darlegten, gibt es deutliche regionale Unterschiede im CLA-Gehalt der Milchproben. Collomb et al. (2002) zeigte, dass der CLA-Gehalt der Milch mit zunehmender geographischer Höhe ansteigt (Collomb et al., 2002). Dabei wurden verschiedene Milchproben in den Niederungen (600-650 m), in den Bergen (900-1210 m) und im Hochland (1275-2120 m) gesammelt und die Fettsäureprofile mit Hilfe von Gaschromatographie bestimmt und miteinander verglichen. Diese Beobachtungen konnten in einer ähnlichen Studie von Bartl. et al in Peru bestätigt werden (Bartl et al., 2008). Zudem zeigte der Vergleich von alpiner Butter mit Margarine, dass der CLA-Gehalt in alpiner Butter deutlich höher ist als in der Margarine (Bertschi et al., 2005). Eine entscheidende Rolle scheint demnach weniger die Region als die geographische Höhe zu spielen. Diese Ergebnisse scheinen übereinstimmend mit den Beobachtungen innerhalb der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen sein. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Milchproben aus alpinen Regionen wie z.B. in der Schweiz im Vergleich zu denen aus flacheren Regionen in Finnland einen deutlich höheren CLA-Gehalt aufweisen. Eine genaue Aussage über diesen Zusammenhang konnte leider nicht getroffen werden, da keine Angaben zur geographischen Höhe der gesammelten Milchproben vorhanden waren.

Des Weiteren ist der Einfluss der Jahreszeit (Saison) auf den CLA-Gehalt in Milch bekannt. Thorsdottir et al. untersuchten in einer Studie in den skandinavischen Ländern Dänemark, Norwegen, Island, Finnland und Schweden die Variation des CLA-Isomer C18:2 c9,t11 (Rumensäure) (Thorsdottir et al., 2004). Dabei war die Konzentration der Rumensäure in Milchproben aus dem Sommer im Vergleich zur Milch aus den Wintermonaten um bis zu 40 % erhöht. Die Beobachtungen konnten ebenfalls in einer Studie von de la Fuente et al. (2009) in Sommer- und Wintermilch bestätigt werden (De La Fuente LF et al., 2009). Im Rahmen dieser Studie wies die Milch, die im Frühling bzw. Sommer gesammelt wurde ebenfalls bis zu 40 % höhere CLA-Konzentrationen auf. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die im Sommer gesammelte Milch im Gegensatz zur Wintermilch deutlich mehr CLAs besitzt.

Der saisonale Effekt auf den CLA-Gehalt der Milch beinhaltet gleichzeitig den Faktor Weidehaltung der Milchkühe. Im Sommer werden die Milchkühe auf extensiv geführten Bauernhöfen, im Vergleich zum Winter, verstärkt auf der Weide gehalten. Die Milchkühe auf intensiv bewirtschafteten Höfen werden jedoch auch während des Sommers im Stall gehalten.

Diese unterschiedliche Haltungsform der Tiere scheinen den CLA-Gehalt der Milch zu beeinflussen. Eng verbunden mit der Weidehaltung ist der kontinuierliche Zugang der Kühe zu frischem Gras. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigten signifikante Unterschiede des CLA-Gehalts in Milch von Kühen, die während der ersten Milchsammlung (2 Monate) auf der Weide gehalten wurden, im Vergleich zu Milch von Kühen die im Stall gehalten wurden. Zwar war auch der Gehalt der CLAs in der Milch der zweiten Sammlung erhöht, jedoch erreichte dieser Unterschied keine statistische Signifikanz. Erst kürzlich zeigten auch Morales-Amaráz et al. (2010), dass eine Fütterung der Kühe in Kombination mit frischem Gras zur Verbesserung der Milchfettqualität und zur Erhöhung des CLA-Gehalts führt (Morales-Almaráz et al., 2010). Die Unabhängigkeit der Effekte der Saison und der Weidehaltung auf den CLA-Gehalt konnte in einem Modell der gegenseitigen Adjustierung verifiziert werden.

Die zuvor publizierten Einflüsse der Fütterung der Kühe und der Rasse der Milchkühe auf den CLA-Gehalt der Milch konnten im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen nicht bestätigt werden (Kelsey et al., 2003; Kraft et al., 2003; Renna et al., 2010). Die Berechnung der Einflüsse durch die Fütterung der Kühe mit Silage und Maische ergab keinen signifikanten Unterschied im CLA-Gehalt der Bauernhofmilch. Weitere Berechnungen zum Effekt verschiedener Kuhrasen (z.B. Holstein-Friesian, Rotbund, Prinzgauer etc.) auf den CLA-Gehalt der Milch konnten nicht durchgeführt werden, da die Angaben in den Fragebögen nicht vollständig ausgefüllt wurden.

4.2.3 CLAs aus Bauernhofmilch sind biologisch verfügbar und wirksam

Die Voraussetzung für mögliche Effekte der CLAs ist deren biologische Verfügbarkeit nach der Aufnahme über CLA-haltige Milch. Die Aufnahme der CLAs aus der Milch erfolgte meist in Form von Triglyzeriden. Diese werden zunächst im Magen in ihre Einzelbestandteile zerlegt und in Form von Mizellen über passiven Transport in die Mukosazellen aufgenommen. Dort werden sie wieder zu Triglyzeriden zusammengebaut und durch die Bindung dieser Triglyzeride an Lipoproteine entstehen Chylomikronen, welche über die Vesikel des Golgi-Apparates durch Exozytose in das zentrale lymphatische System ausgeschieden werden (Berg et al., 2007). Der größte Teil der CLAs wird daraufhin in die biologischen Zellmembranen des menschlichen Körpers eingebaut.

Diese Aufnahme bzw. Einbau ist für die Gewährleistung der ständigen biologischen Verfügbarkeit der CLAs für immunologische Prozesse, wie z.B. die Beeinflussung der Eicosanoidsynthese oder die Veränderung der Eigenschaften der Zellmembranen von immunologischen Zellen (DCs, T-Helfer-Zellen oder auch anderer in die Immunantwort

involvierter Zellen) notwendig (Sugano et al., 1998; Whigham et al., 2001; Whigham et al., 2002). Verschiedene Zellkulturstudien zeigten, dass die Supplementation von CLA zur Reduzierung der Bildung der pro-inflammatorischen Zytokinen IL-4, IL-6, TNF- α oder IL-1 β führt Zellen (Calder, 2003; Russo, 2009). Als eine mögliche Ursache für eine veränderte Zytokinausschüttung wird oftmals die durch den Einbau der CLAs veränderte Fluidität der Zellmembranen diskutiert (Bhattacharya et al., 2006). Es sind jedoch auch noch andere immunmodulatorische Eigenschaften der CLAs bekannt, wie die Regulation der Genexpression oder der entzündlichen Antwort durch direkten Kontakt mit Kernrezeptoren wie PPAR- γ (Daynes and Jones, 2002; Jump, 2002) sowie die kompetitive Hemmung der Enzyme der COX- und LOX-Familie (Belury and Kempa-Steczko, 1997; Banni et al., 1999). Für diese immunologischen Effekte ist der Einbau der CLAs in die Zellmembranen nicht zwingend erforderlich, da für diese Effekt auch physiologisch verfügbare freie CLAs in Frage kommen könnten.

Im Rahmen weiterer Analysen konnte nachgewiesen werden, dass sich Kinder aus Bauernfamilien durch signifikant erhöhte CLA-Serumspiegel im Alter von viereinhalb Jahren von den Kindern aus Nicht-Bauernfamilien unterscheiden. Diese Beobachtung trifft ebenso für die CLA-Serumkonzentration deren Mütter zu. Ferner lässt sich auch in den Erythrozyten der Bauern ein Trend der erhöhten CLA-Mengen im Vergleich zu den CLA in Erythrozyten von Nicht-Bauern erkennen. Es stellt sich daraufhin die Frage, ob der Konsum CLA-reicher Bauernhofmilch für diese Unterscheide verantwortlich sein könnte. Die Berechnung der Korrelation zwischen dem CLA-Gehalt der Milchproben und des CLA-Gehalt im Serum der Kinder, die zuvor genau diese Milch konsumierten, zeigte, dass im Alter von zwei Monaten etwa die Hälfte der im Serum vorhandenen CLAs auf die über die Milch aufgenommenen CLAs zurückzuführen ist. Dieser Anteil der aus der Milch aufgenommenen CLAs sinkt in Serum der Kinder im Alter von viereinhalb Jahren auf etwa ein Drittel, was höchst wahrscheinlich die Folge einer vielfältigeren Ernährung ist. Des Weiteren zeigten die Analysen, dass Kinder, die CLA-reiche Bauernhofmilch tranken höhere CLA-Serumspiegel aufwiesen und die durch die Milch aufgenommenen CLAs biologisch verfügbar waren.

4.2.4 CLA-reiche Bauernhofmilch beeinflusst die Entwicklung von frühen Asthmasymptomen bei Kindern aus der PASTURE/Efraim-Kohorte

Nachdem die Bedeutung des Konsums von Bauernhofmilch in der Protektion von Asthma auch in der momentan laufenden PASTURE-Efraim-Studie unterstrichen werden konnte, stellte sich die Frage, welcher Bestandteil der Bauernhofmilch für diesen Schutz verantwortlich ist. Ein Vergleich der Bauernhof- und Molkereimilch zeigte einen signifikant erhöhten CLA-Gehalt in Bauernhofmilch. Weitere Analysen im Serum von Bauern und Nicht-Bauern zeigten ebenso

einen erhöhten CLA-Anteil im Serum der Bauern. Daher stellt sich nun die Frage, ob diese Unterschiede im CLA-Gehalt bzw. die CLAs selbst für den „Bauernhofmilch-Effekt“ verantwortlich sind. Bis dahin konnte noch keine Studie einen direkten Zusammenhang zwischen CLAs aus der Kuhmilch und Asthma nachweisen. Zusätzlich zur Assoziation zwischen CLA aus Milch und Asthma sollten im Rahmen dieser Arbeit weitere mögliche Assoziationen zu Heuschnupfen, Atopischer Dermatitis (AD) und der atopischen Sensibilisierung untersucht werden. Zudem stellte sich die Frage, ob es sich bei einem möglichen Effekt der CLAs auf die Entwicklung von allergischen Erkrankungen um einen direkten oder indirekten Effekt der CLAs aus der Bauernhofmilch handelt.

Die Ergebnisse der Assoziationsanalysen zeigten, dass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen direkten Effekt der CLAs aus der Milch handelt, da ein erhöhter CLA-Gehalt der Bauernhofmilch mit dem Schutz von Asthmasymptomen assoziiert werden konnte. Im Gegensatz dazu verringerte ein erhöhter CLA-Gehalt im Serum der Mutter und der Kinder im Alter von zwei und viereinhalb Jahren nicht die Chancen an den frühen Asthmasymptomen zu erkranken. Ein weiteres Indiz für die Ursachen-Wirkung-Beziehung des CLA-Gehalts der Bauernhofmilch und dem Auftreten der Asthmasymptome ist, dass die Assoziation zwischen dem CLA-Gehalt der Milchproben aus der ersten Sammlung (zwei Monate) und dem Auftreten der Asthmasymptome signifikant ist, während diese für den CLA-Gehalt der Milchproben aus der 4,5-Jahressammlung keine statistische Signifikanz erreicht, jedoch auch einen klaren Trend aufweist. Wie zuvor durchgeführte Analysen zeigten, ist der CLA-Gehalt der Milchproben aus der ersten Sammlung deutlich höher und somit der Unterschied zwischen Bauernhof- und Molkereimilch größer. Bei Milchproben der ersten Sammlung handelte es sich hauptsächlich um Proben, die im Sommer gesammelt wurden und somit, wie zuvor gezeigt, höhere CLA-Konzentrationen aufweisen.

4.2.5 Fazit

Bei zusammenfassender Betrachtung liefern die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zum ersten Mal einen direkten Hinweis darauf, dass der erhöhte Gehalt von CLAs in der Bauernhofmilch gegenüber Molkereimilch einer der entscheidenden Faktoren für die Protektion von der Entwicklung von Asthmasymptomen zu sein scheint. Natürlich gilt es bei der Beurteilung der Ergebnisse zu beachten, dass es sich hierbei nicht um die endgültige klinische Diagnose von Asthma bronchiale, sondern um das Auftreten von frühen Asthmasymptomen handelt. Die Grundsteinlegung für die Entstehung von allergischer Erkrankung, wie Asthma bronchiale wird jedoch bereits im frühen Lebensalter gelegt. Dabei

gelten das vermehrte Auftreten von nächtlichem Giemen sowie das Auftreten von Bronchitisanfällen im frühen Kindesalter als charakterliche Indikatoren für die spätere Manifestation von Asthma im fortgeschrittenen Alter des Kindes Holgate ST 2008 #16}{Kay AB, 2001). Des Weiteren ist bei der Interpretation der Ergebnisse epidemiologischer Analysen zu berücksichtigen, dass sich epidemiologische Studien nicht für Aussagen für einen kausalen Zusammenhang eignen. Sie dienen letztendlich dazu Hypothesen zu überprüfen oder Thesen für neue Forschungsansätze zu generieren (Beaglehole et al., 1997).

Allerdings sollten die Ergebnisse der hier durchgeführten Analysen nicht unterbewertet werden, da mit den konjugierten Linolsäuren (CLA) erstmals ein möglicher Bestandteil der Milch für den „Bauernhofmilch-Effekt“ verantwortlich gemacht werden konnte und mit dem Schutz vor Asthma assoziiert werden konnte. Jedoch bleibt die offene Frage, ob die CLAs selbst für die Protektion verantwortlich sind oder als möglicher Biomarker für die protektive Bauernhofmilch selbst in Frage kommen. Zur Beantwortung dieser Frage bedarf es noch weiterer Forschung. Diese neuen Forschungsansätze sollten verstärkt aus neuen *in vivo*- und *in vitro*-Studien zur Aufklärung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen bestehen. Ohne die Durchführung dieser zusätzlichen Studien stellt es eine schwierige Herausforderung dar, Schlussfolgerungen auf einen spezifischen Mechanismus zu ziehen. Neue Ansatzpunkte für diese Studien zum Nachweis der immun-modulatorischen Eigenschaften der CLAs in allergischen Erkrankungen und anderen chronisch-entzündlichen Erkrankungen gibt es aufgrund der neuen Erkenntnisse der letzten Jahre genügend (O'Shea et al., 2004; Bhattacharya et al., 2006; Macredmond and Dorscheid, 2011).

Nach der momentanen Datenlage liegt die Rolle der CLAs als möglicher Biomarker für die protektive Bauernhofmilch sehr nahe. Wie in zahlreichen Analysen im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, wird der CLA-Gehalt der Milch durch zahlreiche meist Bauernhof-spezifische Faktoren bestimmt. Demnach könnte der erhöhte CLA-Gehalt auch ein Marker für eine bestimmte Landwirtschaftform, wie z.B. die extensive Fütterung und Haltung von Milchkühen sein. Dies könnte bedeuten, dass nur die Kuhmilch von Bauernhöfen, auf denen eine extensive Bewirtschaftung gewährleistet ist, vor der Entstehung von Allergien und Asthma schützt. Es wäre demzufolge auch vorstellbar, dass der CLA-Gehalt mit einer bisher noch nicht charakterisierten protektiven Fraktion oder einer einzelnen Substanz in der Milch korrelieren könnte oder, dass eine synergistische Wirkung mehrere Mikro- und Makrobestandteile der Milch für die Protektion verantwortlich sein könnte. Ähnlich wie für den Nachweis eines kausalen Effekts der CLAs selbst, bedarf es auch hier zusätzlicher Studien und Untersuchungen

zur weiteren Charakterisierung der Unterschiede von Bauernhof- und Molkereimilch, um diese Hypothesen zu belegen. Zahlreiche Milchfraktionen wie die Proteine, Zucker, niedermolekulare Milchbestandteile oder mikrobielle Komponenten könnten ebenfalls zur Protektion vor der Entwicklung von allergischen Erkrankungen beitragen (Perkin MR and Strachan DP, 2006b; Lands et al., 2010; Sprong et al., 2010).

Die erneute Bestätigung der Bedeutung des Konsums von Bauernhofmilch in Rahmen des „Bauernhofeffekts“ und der damit einhergehenden Allergieprotektion sowie erste Einblicke in mögliche zugrunde liegende Milchbestandteile bieten viele Ansatzpunkte für das Langzeit-Ziel, das hinter der Erforschung der allergie- und asthma-protectiven Effekte der Bauernhofmilch steht. Für die Entwicklung eines allergie-protectiven Produktes müssen jedoch zunächst die weiteren Fraktionen der Bauernhofmilch charakterisiert werden. Zudem müssen die erforderlichen zugrunde liegenden Mechanismen eingehend untersucht und aufgeklärt werden, um dieses Produkt später effektiv und effizient zum Allergie- und Asthmaschutz einsetzen zu können.

4.3 Die Rolle von Milch-CLA auf den asthmatischen Phänotyp im Tiermodell der akuten Atemwegsentszündung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowie in zahlreichen epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass der Konsum von Bauernhofmilch auf traditionellen Bauernhöfen mit der Protektion vor allergischen Erkrankungen einschließlich des Asthma bronchiale assoziiert ist (Aberg N, 1993; Riedler J et al., 2001; Waser M et al., 2007; Braun-Fahrländer and von Mutius, 2011). Dieser Effekt wurde bisher noch nie im Rahmen eines *in vivo*-Modell der Atemwegsentszündung überprüft oder bestätigt. Daher sollten nun, ähnlich wie zuvor bei der asthma-protectiven bäuerlichen bakteriellen Exposition, auch die Protektion durch den Konsum von Bauernhofmilch in Tiermodell nachgestellt werden. Debarry et al. (2007) konnten zeigen, dass die im Rahmen von vorgegangenen epidemiologischen Studien (ALEX, PARISFAL und PASTURE/Efrain) identifizierten und später isolierten Keime (*A. lwoffi* F78 und *L.lactis* G121) nach intra-nasaler Exposition asthma-protective Eigenschaften im Tiermodell aufweisen (Debarry et al., 2007).

Im dritten Teil dieser Arbeit sollte aufbauend auf einem bereits innerhalb der Arbeitsgruppe entwickelten Modell der akuten Atemwegsentszündung ein geeignetes Mausmodell etabliert werden konnten (Conrad et al., 2009a). Mithilfe dessen sollte der Effekt der Bauernhofmilch und vor allem der darin enthaltenen CLAs bestätigt und die Untersuchung möglicher zugrunde liegender molekularer Mechanismen ermöglicht werden. Da bisher noch keine vergleichbaren

experimentellen Ansätze zur Verabreichung von Milch im murinen *in vivo*-Modellen publiziert wurde, stellte sich zunächst die Frage nach eventuellen Milchunverträglichkeiten in der Maus, mögliche tägliche Verabreichungsmengen, der besten Verabreichungsform und dem notwendigen Zeitraum der Verabreichung.

4.3.1 Translation der epidemiologischen Ergebnisse in ein murines *in vivo*-Modell der akuten Atemwegsentszündung

Im Mittelpunkt der Vorversuche zur Überprüfung des „Bauernhofmilch-Effekts“ in einem *in vivo*-Mausmodell standen die Auswahl einer geeigneten Modellmilch und deren Verabreichungsform. Zuletzt konnte zuvor gezeigt werden, dass die Milchfettqualität von zahlreichen Faktoren wie z.B. der Tierhaltung und der Saison der Milchsammlung abhängig ist (Kraft et al., 2003; Leiber et al., 2005; De La Fuente LF et al., 2009). Daher wurde die Milch für die Tierversuche im Sommer auf Bauernhöfen der PASTURE/Efracim-Studien im bayrischen Voralpenland gesammelt, um einen möglichst hohen CLA-Gehalt zu garantieren. Für die Sammlung der sogenannten „Vergleichsmilch“ wurde zum gleichen Zeitpunkt ein Bauernhof in Mittelhessen ausgewählt. Ein Vergleich der Fettsäureprofile zeigte den erwarteten Unterschied in der CLA-Menge. Dabei wies die in Bayern gesammelte Milch signifikant höhere CLA-Mengen auf.

Um die *in vivo*-Studie möglichst nahe an die Erkenntnisse der zuvor durchgeführten Analysen im Rahmen der PASTURE/Efracim-Studie anzupassen, wurden die Tiere mit unbehandelter Milch gefüttert. Dieses Vorhaben war jedoch mit zahlreichen Problemen verbunden:

Erstens die Haltbarkeit der unbehandelten Milch: Da unbehandelte Milch durch die enthaltene mikrobielle Flora leicht verderblich ist, müsste täglich frische Milch gesammelt werden. Eine tägliche Milchsammlung ist aufgrund logistischer Probleme von vornherein auszuschließen. Des Weiteren könnte bei täglicher Milchsammlung über einen Zeitraum von acht Wochen keine einheitliche Milchfettqualität gewährleistet sein. Dies wiederum würde zu Problemen der Standardisierung der Durchführung der Versuche führen. Auch das Einfrieren von Aliquots der Milch, um eine längere Haltbarkeit zu gewährleisten, war nicht möglich, da die Kristallbildung während des Gefrierens der Milch zu Veränderungen bzw. Beschädigungen der Fettmizellen aber auch anderen Milchbestandteile führt (Töpel, 2004).

Ein weiteres Problem ist die nicht einheitliche Größe der Fettmizellen, da die Milch nicht homogenisiert wurde. Insofern führt bereits eine kurze Standzeit der Milch zur Ausbildung einer Phasentrennung, wobei sich die großen Fettkügelchen an der Oberfläche absetzen und somit den Rahm bilden. Zudem konnte im Rahmen eines Pilotversuchs die Unverträglichkeit

der Mäuse gegenüber unbehandelter Bauernhofmilch nachgewiesen werden. Die Fütterung der unbehandelten Bauernhofmilch führt dabei zur Dehydrierung der Mäuse, welche sich durch struppiges Fell bemerkbar machte, und ebenso kam es zur Bildung von Abszessen im Bereich der Lymphknoten (Daten nicht gezeigt). Diese Abszesse sind sehr wahrscheinlich auf Entzündungsprozesse, die auf die noch lebenden pathogenen Keime in der Rohmilch, zurückzuführen. Eine Laktoseintoleranz der Mäuse konnte jedoch ausgeschlossen werden, da keine entsprechenden Symptome wie Diarrhoe festgestellt werden konnten. Ferner konnten He et al. (2005) die Laktase-Aktivität in Balb/c-Mäusen nachweisen (He et al., 2005).

Im Gegensatz zur unbehandelten Bauernhofmilch konnte nach der täglichen Fütterung von pasteurisierter Bauernhofmilch keine Unverträglichkeiten gegenüber dieser Milch beobachtet werden. Die Pilotversuche zeigten dennoch, dass täglich nur eine intragastrische Fütterung mit 200 µl Milch möglich war, da eine zweimalige Fütterung morgens und abends zum Gewichtsverlust und zur Dehydrierung der Mäuse führte. Diese geringen verabreichten Mengen an Milch schienen jedoch keinen Effekt auf den asthmatischen Phänotyp der Mäuse zu haben. Retrospektive Berechnungen der verabreichten CLA-Mengen wiesen daraufhin, dass die Mäuse zu geringe Mengen an Milch erhielten, um eine Veränderung der CLA-Anteile im Serum oder den Erythrozyten der Tiere festzustellen (Daten nicht gezeigt). Dies könnte ein Anzeichen dafür gewesen sein, dass die einmalige tägliche Fütterung von 200 µl Milch nur zu kleinen Anteil der Gesamtdiät der Mäuse darstellte. Die retrospektive Berechnung der verabreichten Fettsäuremengen und der Vergleich mit in anderen Studien verabreichten CLA-Mengen, konnte diese Annahme bestätigen. Jaudszus et al. verabreichten über den gleichen Zeitraum von 40 Tagen eine um ein Drittel erhöhte Menge an CLAs (Jaudszus et al., 2008). Auch der Vergleich der verabreichten n3-Fettsäuren EPA und DHA mit den von der WHO empfohlenen Tagesmengen (RDA) für Erwachsene (500 mg/Tag) ergab, dass die Mäuse nur in etwa 2,6 % dieser empfohlenen Gesamtmenge über die Milch zu nehmen. Es stellte sich nun die Frage, wie man die verabreichte Fettsäuremenge erhöhen kann, ohne die täglich gefütterte Menge der Milch zu erhöhen. Um eine konzentriertere Verabreichung zu ermöglichen, wurde daraufhin Milchpulver aus der pasteurisierten Bauernmilch mittels Sprühtrocknung hergestellt und dieses anstelle der gewöhnlichen Fettfraktion (meist Pflanzenöle) in eine Standard-Mausdiät integriert. Die vorherige Bestimmung des Fettgehalts des Milchpulvers ermöglichte die Einstellung des Fettgehalts der Mausdiät auf 5 %. Damit war gleichzeitig die Vergleichbarkeit mit einer gebräuchlichen Standardmausdiät gegeben. Der Vergleich der Fettsäurezusammensetzung der unbehandelten Bauernhofmilch und der aus dieser Milch hergestellten Mausdiät zeigte, dass weder die Pasteurisierung noch einer der anderen

Prozessierungsschritte die Fettsäurezusammensetzung der Ausgangsmilch signifikant verändert hat.

Die Kinetik über die CLA-Aufnahme im Serum und den Erythrozytenmembranen konnte bestätigen, dass sich bereits nach etwa vier Wochen ein Gleichgewicht in der Fettsäureverteilung in Plasma und Erythrozyten einstellt, welche der Fettsäurezusammensetzung der verabreichten Diäten entsprach (Yaqoob et al., 2000). In zuvor durchgeführten Studien konnten ähnliche Veränderungen der Fettsäureprofile in den Erythrozyten von Mäusen, hervorgerufen durch veränderte Fütterung der Tiere, mit den pathologischen Zuständen verschiedener Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (Risé et al., 2007). Darüber hinaus konnte im Rahmen weiterer Studien belegt werden, dass zum Beispiel die Konzentration von n3-Fettsäuren in den Erythrozyten einen guten Index für den n3-Fettsäurestatus in anderen Geweben liefert (Harris et al., 2004).

Alle der bisherigen Beobachtungen zeigten, dass die biologische Verfügbarkeit der Fettsäuren aus der modifizierten Mausdiät auch im *in vivo*-Modell gewährleistet werden konnte und die über die Milch aufgenommen Fettsäuren damit für mögliche Effekte auf sowohl immunologische als auch physiologische Prozesse der allergischen Atemwegsentzündung zur Verfügung stehen. Demnach sollte das modifizierte Modell der akuten allergischen Atemwegsentzündung dafür geeignet sein, um zu überprüfen ob auch die pasteurisierte Bauernhofmilch und die darin enthaltenen CLAs einen Effekt auf die Entwicklung von allergischen Erkrankung und im Speziellen auf Asthma bronchiale hat.

4.3.2 Die Verabreichung von pasteurisierter Milch ruft keine Veränderung des asthmatischen Phänotyps hervor

Zur Ermittlung des Einflusses von pasteurisierter Bauernhofmilch und der darin enthaltenen CLAs wurden Mäuse zunächst vor der Sensibilisierung und Provokation mit OVA vier Wochen lang mit modifizierten Milchdiäten gefüttert. Trotz des Nachweises der biologischen Verfügbarkeit der Fettsäuren aus der Milch vor allem der CLAs nach der Fütterung der Tiere, resultierte diese nicht in einer Reduzierung des asthmatischen Phänotyps

Im Tiermodell des experimentellen Asthmas führt die Sensibilisierung mit OVA bekanntlich zu hohen Titern von OVA-spezifischen-IgE und -IgG₁ und zu niedrigen Spiegeln von OVA-spezifischen IgG_{2a} (Geha et al., 2003; Barnes, 2008). Die pasteurisierte Milch beeinflusste jedoch weder die allergische Sensibilisierung noch die allergische Entzündung der Atemwege selbst. Infolge der Fütterung der Milchdiäten kam es nicht zu der erwarteten Reduzierung der

OVA-spezifischen-IgE und -IgG₁-Titern und damit nicht zur Verhinderung der allergischen Sensibilisierung.

Bekanntlich sind die Mukushypersekretion (Gobletzellhyperplasie) und die Entzündung der Atemwege charakteristische pathophysiologische Kennzeichen von Asthma (Izuhara et al., 2009; Lai and Rogers, 2010). Die Quantifizierung der Entzündung und der Gobletzellen in den Atemwegen nach der Fütterung mit den modifizierten Mausdiäten zeigte weder eine Reduzierung der Atemwegsentzündung, noch der Anzahl an mukus-produzierenden Gobletzellen. Ein möglicher Grund dafür könnte die unveränderte Th1/Th2-Balance sein, da die Überprüfung der Th1/Th2-Zytokinproduktion keine signifikanten Veränderungen der Th1- und Th2-Zytokinen aufzeigen konnte (Colavita et al., 2000).

Auch die Hypothese, dass der vermehrte Einbau von LC-PUFAs im Speziellen von CLAs in die Phospholipide der Zellmembranen, zur veränderten Produktion von Lipidmediatoren wie Leukotrienen und Prostaglandinen führen könnte, konnte im Rahmen der Arbeit durchgeführten Studien nicht bestätigt werden (Levy et al., 2001; Luster and Tager, 2004; Harizi et al., 2008; Stables and Gilroy, 2011). Die Analyse von Arachidonsäure-abstammenden Eicosanoide in der BAL zeigte keine Veränderung der Eicosanoidmuster nach der Fütterung mit pasteurisierter Bauernhofmilch.

4.3.3 Fazit

Zusammenfassend scheint der protektive Effekt der Bauernhofmilch durch den Vorgang der Pasteurisierung verloren zu gehen. Diese Daten unterstützen damit das Konzept, dass der unveränderte Zustand der Bauernhofmilch von zentraler Bedeutung für die Schutzvermittlung ist und die darin vorhandenen protektiven Makro- oder Mikrobestandteile durch Pasteurisierung ihre allergie- und asthma-protektiven Eigenschaften verlieren. Des Weiteren unterstützen diese Ergebnisse die Annahme, dass es sich bei den CLAs in der Bauernhofmilch um einen möglichen Biomarker für die Milch mit protektiven Eigenschaften handelt, oder dass für die Protektion weitere noch nicht charakterisierte Bestandteile der Milch notwendig sind.

Die nähere Betrachtung der Ergebnisse zeigte, dass identisch mit den Erkenntnissen aus den epidemiologischen Analysen, die biologische Verfügbarkeit der CLAs aus der Bauernhofmilch in Plasma bzw. Serum und in den Erythrozyten zwar gegeben ist, aber keinen Beitrag zur Protektion vor Allergie und Asthma durch den Konsum von Bauernhofmilch liefert. Ebenso scheinen die CLAs, wie die epidemiologischen Studien bereits vermuten ließen, keinen direkten Effekt auf die allergische Sensibilisierung zu haben. Dagegen konnte in einer

vorhergehenden Studie im murinen Modell des experimentellen Asthmas, der Effekt einer mit Rumensäure (C18:2 c9,t11) angereicherten Diät auf die atopische Sensibilisierung nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich jedoch um ein synthetisch hergestelltes CLA-Isomer (Jaudszus et al., 2008). Außerdem war in diesem Versuch, die durch die Diät verabreichte Gesamtmenge der Rumensäuren, deutlich höher als in der Studie, die im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde. In einer weiteren Studie von Kanwar et al. (2007) wurden Mäuse ebenfalls mit einer durch Milchfett angereicherten Diät gefüttert (Kanwar et al., 2008). Dabei wurde der Gehalt der Rumensäure (RA) und der trans-Vaccensäure (C18:1 t11, t-VA) des Milchfettes durch die Supplementierung des Futters der Kühe mit Fisch- und Sonnenblumenöl angereichert. Diese Anreicherung der Kuhmilch resultierte in einer erhöhten Milchfettqualität, vor allem aber in einem erhöhten RA- bzw. t-VA-Gehalt der Milch. Gleichzeitig konnte eine Abschwächung der allergischen Atemwegsentzündung, nach der Fütterung des angereicherten Milchfettes, im Vergleich zu normalem Milchfett mit nur einem Fünftel des Gehalts an RA und t-VA nachgewiesen werden. Verglichen mit den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen, waren auch in diesem Experiment die CLA-Mengen deutlich höher als in den Modellen der vorliegenden Arbeit, was folgerichtig die unterschiedlichen Auswirkungen auf den asthmatischen Phänotyp erklären könnte. Die Wirkung von unbehandelter Milch, die das vermeintliche Verum enthalten könnte, was beim Erhitzen scheinbar zerstört wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit aufgrund zahlreicher zuvor beschriebenen Schwierigkeiten nicht überprüft werden.

Bei zusammenfassender Betrachtung aller in dieser Arbeit gesammelten Erkenntnisse scheint die Milchfettqualität von unbehandelter Bauernhofmilch einen potenziellen Nutzen für die Therapie von Asthma bronchiale im Menschen zu besitzen. Allerdings muss bis zur tatsächlichen klinischen Anwendung noch eine Vielzahl von offenen Fragen beantwortet werden. Von besonderer Bedeutung ist es dabei herauszufinden in welcher Form die Bauernmilch und die darin enthaltenen Mikro- und Makrobestandteile verabreicht werden müssen, um eine erfolgreiche Protektion vor Allergie und Asthma zu ermöglichen. Dabei bleibt auch die Frage offen, ob der gesundheitliche Benefit durch den Konsum von Bauernhofmilch einer isolierten Einzelsubstanz zugeordnet werden kann oder ob ein Lebensmittel, wie die Milch mit ihren unterschiedlichen Bestandteilen im Ganzen betrachtet werden muss. Wie die Ergebnisse der vorliegenden Analyse offenbaren, scheint der Verzehr insbesondere im Kleinkindalter eine bedeutende Rolle zu spielen. Die vorliegende Arbeit zeigte aber auch, dass die Datenlage von *in vivo*-Studien zur Protektion vor allergischen Erkrankungen und Asthma durch den Verzehr von Milchfetten noch sehr undurchsichtig ist und nicht immer

übereinstimmend ist. Zur Aufklärung der protektiven Eigenschaften von CLAs und weiterer Milchbestandteile im Menschen erfordert es in jeden Fall der Testung von Milch oder der aus Milch stammenden CLAs in klinischen Studien.

5. Zusammenfassung

5.1. Zusammenfassung

Im Laufe des letzten Jahrzehnts konnte in zahlreichen Studien die allergeo-protective Eigenschaft von Bauernhofmilch, die auf traditionell geführten Bauernhöfen konsumiert wird, nachgewiesen werden. Im Besonderen der Konsum von unbehandelter Bauernhofmilch konnte vermehrt mit der Protektion vor Asthma bronchiale, Heuschnupfen oder der allergischen Sensibilisierung assoziiert werden. Eine zentrale Rolle wird dabei spezifische Milchfettsäuren, die insbesondere in traditioneller Bauernhofmilch vermehrt vorhanden sind, zugesprochen. Der Konsum dieser Fettsäuren wurde zudem zuvor immer wieder mit einem gesundheitlichen Benefit im Menschen assoziiert.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die allergeo-protective Eigenschaften dieser Kuhmilch-spezifischen Fettsäuren zu untersuchen und bestimmte protective Fettsäuregruppen in dieser Bauernhofmilch zu charakterisieren. Dafür sollten mögliche Unterschiede in der Verteilung dieser Fettsäuren in Bauernhof- und Molkereimilchproben sowie in Serumproben von Bauern und Nicht-Bauern aus der PASTURE/Efrain-Studie untersucht werden und deren Aufnahme in die Zellmembranen, der Konsumenten dieser Milch nachgewiesen werden. Im ersten Teil der Arbeit wurde für diese Untersuchungen zunächst eine Analyse-methode zur Bestimmung der Fettsäuremuster in verschiedenen humanen Blutkompartimenten und Milch etabliert. Diese Methodik ermöglichte u.a. auch das Biomonitoring der über die Milch zugenommen Fettsäuren im menschlichen Körper wie z.B. in humanen Zellmembranen.

Die Analysen der Fettsäuremuster von Bauernhof- und Molkereimilchproben zeigten, dass Bauernhofmilch im Vergleich zu Molkereimilch einen signifikant erhöhten CLA-Gehalt besitzt. Dieser Gehalt wird jedoch sehr stark durch den Zeitpunkt (Saison) der Milchsammlung und der Weidehaltung der Milchkühe beeinflusst. Zudem konnten ebenso erhöhte CLA-Mengen im Serum von Bauern festgestellt werden und durch die Berechnung der Korrelation zwischen dem CLA-Gehalt der Milch und im Serum die Bioverfügbarkeit der über die Milch aufgenommenen CLAs bestätigt werden. Mithilfe der Berechnung von Odds Ratios konnte der Konsum von CLA-reicher Bauernhofmilch, jedoch nicht der erhöhte CLA-Serumspiegel der Bauern selbst, mit einem verminderten Risiko an Asthmasymptomen zu erkranken, aber nicht mit einem verminderten allergen-spezifischen IgE-Level, assoziiert werden. Im dritten Teil der Arbeit konnten die Ergebnisse der epidemiologischen Analysen

in ein murines *in vivo*-Modell der akuten allergischen Atemwegsentzündung translatiert werden, um dort den Effekt auf die allergie- und asthma-protectiven Eigenschaften von pasteurisierter Bauernhofmilch und der darin enthaltenen CLAs zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurde ein bereits bestehendes *in vivo*-Modell und die Verabreichungsform der Milch modifiziert, um die möglichst realitätsnahen Umstände des „Bauernhofmilch-Effekts“ im Mausmodell zu ermöglichen. Die spätere Charakterisierung des asthmatischen Phänotyps zeigte, dass die Pasteurisierung der Bauernmilch anscheinend die allergeo-protectiven Komponenten der Milch so verändert, dass der Schutz vor der Entwicklung von Allergie und Asthma in diesen Studien aufgehoben wurde.

Die hier erhaltenen Daten liefern somit erstmals einen Hinweis, dass der CLA-Gehalt der Bauernhofmilch entscheidend für den Schutz vor Allergie und Asthma ist. Es scheint jedoch, dass es sich dabei nicht um einen kausalen Zusammenhang zwischen den CLAs selbst und dem Schutz vor Allergie und Asthma handelt, sondern als ob es sich beim CLA-Gehalt der Milch um einen Marker für die Bauernhofmilch mit allergeo-protectiven Eigenschaften handelt.

5.2. Summary

Recent studies have demonstrated that farm milk from traditional farm settings possesses allergeo-protective properties. Highly prevalent fatty acids in farm milk have been proposed to be one of responsible factors for allergy protection. Moreover, it has previously observed an association between the consumption of these fatty acids and benefit to human health.

The aim of this work was the investigation of the allergeo-protective properties of specific milk fatty acids and to identify and characterize potential single protective fatty acid groups in farm milk. To this end the differences in the fatty acid distribution between farm and shop milk, and serum samples from farmers and non-farmers of the PASTURE/Efraim study group were examined. A single protocol was therefore first established and then verified, which enabled the analysis of the fatty acid patterns in milk and also in different human blood compartments (serum and erythrocytes).

The analyses of the fatty acid profile in farm milk and shop milk samples revealed that farm milk samples contained higher levels of conjugated linoleic acids (CLA) than shop-bought milk. The presence of CLA was significantly influenced by season of collection and the animal husbandry. A comparison of the fatty acid profiles in serum samples from farmers and non-

farmers showed significantly increased CLA levels in farmers' serum. In addition a strong correlation between the CLA content in milk and serum was found, indicating the bioavailability of the milk fatty acids in humans after milk consumption. Milk rich in CLAs was found to be inversely associated with symptoms of early asthma. No association with allergen specific IgE was found. The findings of the epidemiological data were then translated into a murine *in vivo* model of acute allergic airway inflammation to specifically investigate the effects of pasteurization on the allergeo-protective properties of farm milk and its CLA content. An established mouse model of experimental asthma was modified to mimic the conditions of farm milk consumption in mice. Analysis of the asthmatic phenotype revealed no amelioration due to the consumption of pasteurized farm milk. The results indicate that pasteurization of the milk alters the protective components in milk and thereby removes the allergeo-protective properties of the farm milk.

These data provide first evidence that the CLA content of the farm milk is very important for the protection against the development of allergy and asthma. However, it seems that there is no explanation for a causal association between the milk CLAs itself and asthma symptoms in early childhood. However, CLA may be considered a good indicator (biomarker) for farm milk with allergeo-protective properties.

6. Literaturverzeichnis

Aberg N (1993). Familial occurrence of atopic disease: genetic versus environmental factors. *Clin Exp Allergy* 23, 829-834.

Abilleira, E., Collomb, M., Schlichtherle-Cerny, H., Virto, M., Renobales, M. de, and Barron, L.J. (2009). Winter/spring changes in fatty acid composition of farmhouse Idiazabal cheese due to different flock management systems. *J Agric Food Chem* 57, 4746-4753.

Ackman RG, and Sipos JC (1964). Flame ionization detector response for the carbonyl carbon atom in the carboxyl group of fatty acids and esters. *J Chromatogr* 16, 298-305.

Alfven, T., Braun-Fahrlander C, Brunekreef B, von Mutius E, Riedler J, Scheynius A, van Hage M, Wickman, M., Benz MR, and Budde, J., et al. (2006). Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle--the PARSIFAL study. *Allergy* 61, 414-421.

Allerberger, F., Friedrich, A.W., Grif, K., Dierich, M.P., Dornbusch, H.J., Mache, C.J., Nachbaur, E., Freilinger, M., Rieck, P., and Wagner, M., et al. (2003). Hemolytic-uremic syndrome associated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H infection and consumption of unpasteurized cow's milk. *Int J Infect Dis* 7, 42-45.

Alm JS, Swartz J, Lilja, G., Scheynius A, and Pershagen G (1999). Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle. *Lancet* 353, 1485-1488.

Almqvist, C., Garden, F., Xuan, W., Miharshahi, S., Leeder, S.R., Oddy, W., Webb, K., and Marks, G.B. (2007). Omega-3 and omega-6 fatty acid exposure from early life does not affect atopy and asthma at age 5 years. *J. Allergy Clin. Immunol* 119, 1438-1444.

Anandan C, Nurmatov U, van Schayck OC, and Sheikh A (2010). Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies. *Allergy* 65, 152-167.

Anandan, C., Nurmatov, U., and Sheikh, A. (2009). Omega 3 and 6 oils for primary prevention of allergic disease: systematic review and meta-analysis. *Allergy* 64, 840-848.

Asher, M.I., Montefort, S., Björkstén, B., Lai, C.K.W., Strachan, D.P., Weiland, S.K., and Williams, H. (2006). Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* 368, 733-743.

Banni, S., Angioni, E., Casu, V., Melis, M.P., Carta, G., Corongiu, F.P., Thompson, H., and Ip, C. (1999). Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid. *Carcinogenesis* 20, 1019-1024.

Barnes, M., Cullinan, P., Athanasaki, P., MacNeill, S., Hole, A.M., Harris, J., Kalogeraki, S., Chatzinikolaou, M., Drakonakis, N., and Bibaki-Liakou, V., et al. (2001). Crete: does farming explain urban and rural differences in atopy? *Clin. Exp. Allergy* 31, 1822-1828.

Barnes, P.J. (2008). Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat. Rev. Immunol* 8, 183-192.

Bartl, K., Gomez, C.A., García, M., Aufdermauer, T., Kreuzer, M., Hess, H.D., and Wettstein, H.-R. (2008). Milk fatty acid profile of Peruvian Criollo and Brown Swiss cows in response to different diet qualities fed at low and high altitude. *Arch Anim Nutr* 62, 468-484.

Baylin, A., and Campos, H. (2006). The use of fatty acid biomarkers to reflect dietary intake. *Curr. Opin. Lipidol* 17, 22-27.

- Beaglehole, R., Bonita, R., and Kjellström, T. (1997). Einführung in die Epidemiologie (Bern ;, Göttingen ;, Toronto ;, Seattle: Huber).
- Beasley R, Pekkanen J, and Pearce N (2001). Has the role of atopy in the development of asthma been over-emphasized? *Pediatr Pulmonol Suppl* 23, 149-150.
- Belury, M.A., and Kempa-Steczko, A. (1997). Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. *Lipids* 32, 199-204.
- Belury, M.A. (2002). Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanisms of action. *J. Nutr* 132, 2995-2998.
- Berg, J.M., Stryer, L., and Tymoczko, J.L. (2007). Biochemie (Heidelberg [u.a.]: Elsevier, Spektrum, Akad. Verl.).
- Bertschi, I., Collomb, M., Rist, L., Eberhard, P., Sieber, R., Bütikofer, U., Wechsler, D., Folkers, G., and Mandach, U. von (2005). Maternal dietary Alpine butter intake affects human milk: fatty acids and conjugated linoleic acid isomers. *Lipids* 40, 581-587.
- Bhattacharya, A., Banu, J., Rahman, M., Causey, J., and Fernandes, G. (2006). Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J Nutr Biochem* 17, 789-810.
- Black, P.N., and Sharpe, S. (1997). Dietary fat and asthma: is there a connection? *Eur Respir J* 10, 6-12.
- Bligh EG, and Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917.
- Blümer, N., and Renz, H. (2007). Consumption of omega3-fatty acids during perinatal life: role in immuno-modulation and allergy prevention. *J Perinat Med* 35 Suppl 1, S12-8.
- Bolte, G., Kompauer, I., Fobker, M., Cullen, P., Keil, U., Mutius, E., and Weiland, S.K. (2006). Fatty acids in serum cholesteryl esters in relation to asthma and lung function in children. *Clin. Exp. Allergy* 36, 293-302.
- Bondia, E.M., Castellote, A.I., Lopez, M.C., and Rivero, M. (1994). Determination of plasma fatty acid composition in neonates by gas chromatography. *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl* 658, 369-374.
- Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J, and Godard P, et al. (1990). Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med* 323, 1033-1039.
- Bradding P, Okayama Y, Howarth PH, Church MK, and Holgate ST (1995). Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *J Immunol* 155, 297-307.
- Braun-Fahrlander C, Gassner, M., Grize, L., Neu, U., Sennhauser, F.H., Varonier, H.S., Vuille, J.C., and Wuthrich, B. (1999). Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. *Clin Exp Allergy* 29, 28-34.
- Braun-Fahrländer, C., and Mutius, E. von (2011). Can farm milk consumption prevent allergic diseases? *Clinical & Experimental Allergy* 41, 29-35.
- Brenneis, C., Coste, O., Altenrath, K., Angioni, C., Schmidt, H., Schuh, C.-D., Zhang, D.D., Henke, M., Weigert, A., and Brüne, B., et al. (2011). Anti-inflammatory role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in a model of neuroinflammation. *J. Biol. Chem* 286, 2331-2342.
- Busse WW, and Lemanske RF Jr (2001). Asthma. *N Engl J Med* 344, 350-362.

- Busse WW, and Sedgwick JB (1994). Eosinophil eicosanoid relations in allergic inflammation of the airways. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 22, 241-249.
- Calder, P.C., and Grimble, R.F. (2002). Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr* 56, S14.
- Calder, P.C. (2003). N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic. *Lipids* 38, 343-352.
- Calder, P.C. (2004a). n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin. Sci* 107, 1-11.
- Calder, P.C. (2004b). n-3 fatty acids, inflammation, and immunity--relevance to postsurgical and critically ill patients. *Lipids* 39, 1147-1161.
- Celedon JC, Wright, R.J., Litonjua AA, Sredl, D., Ryan, L., Weiss ST, and Gold DR (2003). Day care attendance in early life, maternal history of asthma, and asthma at the age of 6 years. *Am J Respir Crit Care Med* 167, 1239-1243.
- Chen J, Cao Y, Gao H, Yang L, and Chen ZY (2007). Isomerization of conjugated linolenic acids during methylation. *Chem Phys Lipids* 150, 136-142.
- Chen, W., Esselman, W.J., Jump, D.B., and Busik, J.V. (2005). Anti-inflammatory effect of docosahexaenoic acid on cytokine-induced adhesion molecule expression in human retinal vascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 4342-4347.
- Chow Kuang, C. (2008). *Fatty acids in foods and their health implications* (Boca Raton: CRC Press).
- Christie, W.W., and Han, X. (2010). *Lipid analysis. Isolation, separation, identification and lipidomic analysis* (Bridgwater, England: Oily Press, an imprint of PJ Barnes & Associates).
- Christophersen SW, and Glass LR (1969). Preparation of milk fat methyl esters by alcoholysis in an essentially nonalcoholic solution. *Journal of Dairy Science*, 1289-1290.
- Colavita, A.M., Reinach, A.J., and Peters, S.P. (2000). Contributing factors to the pathobiology of asthma. The Th1/Th2 paradigm. *Clin. Chest Med* 21, 263-77, viii.
- Collins DS, Dupuis R, Gleich GJ, Bartemes KR, Koh YY, Pollice M, Albertine KH, Fish JE, and Peters SP (1993). Immunoglobulin E-mediated increase in vascular permeability correlates with eosinophilic inflammation. *Am Rev Respir Dis* 147, 677-683.
- Collomb, M., Butikofer, U., Sieber, R., Bosset, O., and Jeangros, B. (2001). Conjugated linoleic acid and trans fatty acid composition of cows' milk fat produced in lowlands and highlands. *J Dairy Res* 68, 519-523.
- Collomb, M., Bisig, W., Butikofer, U., Sieber, R., Bregy, M., and Etter, L. (2008). Fatty acid composition of mountain milk from Switzerland: Comparison of organic and integrated farming systems. *International Dairy Journal* 18, 976-982.
- Collomb, M., Bütikofer, U., Sieber, R., Jeangros, B., and Bosset, J.-O. (2002). Composition of fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland using high-resolution gas chromatography. *International Dairy Journal* 12, 649-659.
- Conrad, M.L., Yildirim, A.O., Sonar, S.S., Kilic, A., Sudowe, S., Lunow, M., Teich, R., Renz H, and Garn, H. (2009a). Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clin Exp Allergy* 39, 1246-1254.
- Conrad, M.L., Ferstl, R., Teich, R., Brand, S., Blumer N, Yildirim, A.O., Patrascan, C.C., Hanuszkiewicz, A., Akira, S., and Wagner, H., et al. (2009b). Maternal TLR signaling is required

- for prenatal asthma protection by the nonpathogenic microbe *Acinetobacter lwoffii* F78. *J Exp Med* 206, 2869-2877.
- Cookson WO (2002). Asthma genetics. *Chest* 121, 7S-13S.
- Craske JD, and Bannon CD (1998). *Journal of American Oil Chemistry Society*, 1190-1191.
- D'Amato G, Liccardi G, and D'Amato M (2000). Environmental risk factors (outdoor air pollution and climatic changes) and increased trend of respiratory allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 10, 123-128.
- Das, U.N. (2005). Long-chain polyunsaturated fatty acids, endothelial lipase and atherosclerosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 72, 173-179.
- Daynes, R.A., and Jones, D.C. (2002). Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol* 2, 748-759.
- De La Fuente LF, Barbosa, E., Carriedo, J.A., Gonzalo, C., Arenas, R., Fresno, J.M., and San, P.F. (2009). Factors influencing variation of fatty acid content in ovine milk. *J Dairy Sci* 92, 3791-3799.
- De Monchy JG, Kauffman HF, Venge P, Koeter GH, Jansen HM, Sluiter HJ, and De Vries K (1985). Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis* 131, 373-376.
- Debarry, J., Garn, H., Hanuszkiewicz, A., Dickgreber, N., Blümer, N., Mutius, E. von, Bufe, A., Gattermann, S., Renz, H., and Holst, O., et al. (2007). *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis* strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. *J. Allergy Clin. Immunol* 119, 1514-1521.
- Delmonte, P., Kia, A.-R.F., Hu, Q., and Rader, J.I. Review of methods for preparation and gas chromatographic separation of trans and cis reference fatty acids. *J AOAC Int* 92, 1310-1326.
- Delmonte, P., Fardin Kia, A.-R., Kramer, J.K.G., Mossoba, M.M., Sidisky, L., and Rader, J.I. (2011). Separation characteristics of fatty acid methyl esters using SLB-IL111, a new ionic liquid coated capillary gas chromatographic column. *J Chromatogr A* 1218, 545-554.
- Devereux G (2006). The increase in the prevalence of asthma and allergy: food for thought. *Nat Rev Immunol* 6, 869-874.
- Devereux, G. (2008). Maternal diet during pregnancy: an emerging risk factor for childhood asthma. *Expert Rev Clin Immunol* 4, 663-668.
- Dodds, E.D., McCoy, M.R., Rea, L.D., and Kennish, J.M. (2005). Gas chromatographic quantification of fatty acid methyl esters: flame ionization detection vs. electron impact mass spectrometry. *Lipids* 40, 419-428.
- Dooper, M.M., van Riel, B., Graus, Y.M., and M'Rabet, L. (2003). Dihomo-gamma-linolenic acid inhibits tumour necrosis factor-alpha production by human leucocytes independently of cyclooxygenase activity. *Immunology* 110, 348-357.
- Eder, K. (1995). Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl* 671, 113-131.
- Eder, K., and Ringseis, R. (2010). Metabolism and actions of conjugated linoleic acids on atherosclerosis-related events in vascular endothelial cells and smooth muscle cells. *Mol Nutr Food Res* 54, 17-36.
- Ege MJ, Mayer, M., Normand, A.C., Genuneit J, Cookson WO, Braun-Fahrlander C, Heederik, D., Piarroux, R., and von Mutius E (2011). Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N Engl J Med* 364, 701-709.

- Ege MJ, Bieli C, Frei R, van Strien, R.T., Riedler J, Ublagger E, Schram-Bijkerk D, Brunekreef B, van Hage M, and Scheynius A, et al. (2006). Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. *J Allergy Clin Immunol* *117*, 817-823.
- Ege MJ, Frei R, Bieli C, Schram-Bijkerk D, Waser M, Benz MR, Weiss G, Nyberg F, van Hage M, and Pershagen G, et al. (2007). Not all farming environments protect against the development of asthma and wheeze in children. *J Allergy Clin Immunol* *119*, 1140-1147.
- Ellis, K.A., Innocent, G., Grove-White, D., Cripps, P., McLean, W.G., Howard, C.V., and Mihm, M. (2006). Comparing the fatty acid composition of organic and conventional milk. *J. Dairy Sci* *89*, 1938-1950.
- Ferris, B.G. (1978). Epidemiology Standardization Project (American Thoracic Society). *Am. Rev. Respir. Dis* *118*, 1-120.
- Fetterman, J.W., and Zdanowicz, M.M. (2009). Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease. *Am J Health Syst Pharm* *66*, 1169-1179.
- Firestone, D., and Horwitz, W. (1979). IUPAC gas chromatographic method for determination of fatty acid composition: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* *62*, 709-721.
- Fletcher, R.H., Fletcher, S.W., Wagner, E.H., and Haerting, J. (1999). *Klinische Epidemiologie. Grundlagen und Anwendung* (Wiesbaden: Ullstein Medical).
- Floistrup H, Swartz J, Bergstrom A, Alm JS, Scheynius A, van Hage M, Waser M, Braun-Fahrlander C, Schram-Bijkerk D, and Huber M, et al. (2006). Allergic disease and sensitization in Steiner school children. *J Allergy Clin Immunol* *117*, 59-66.
- Folch J, Lees M, and Sloane Stanley GH (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* *226*, 497-509.
- Fritsche, J., and Steinhart, H. (1998). Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in German foods and evaluation of daily intake. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* *206*, 77-82.
- Galli SJ, Tsai M, and Piliponsky AM (2008). The development of allergic inflammation. *Nature* *454*, 445-454.
- Galli, C., and Calder, P.C. (2009). Effects of fat and fatty acid intake on inflammatory and immune responses: a critical review. *Ann. Nutr. Metab* *55*, 123-139.
- Geha, R.S., Jabara, H.H., and Brodeur, S.R. (2003). The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat. Rev. Immunol* *3*, 721-732.
- Gehring, U., Spithoven, J., Schmid, S., Bitter, S., Braun-Fahrlander, C., Dalphin, J.-C., Hyvärinen, A., Pekkanen, J., Riedler, J., and Weiland, S.K., et al. (2008). Endotoxin levels in cow's milk samples from farming and non-farming families - the PASTURE study. *Environ Int* *34*, 1132-1136.
- Gerbault, P., Liebert, A., Itan, Y., Powell, A., Currat, M., Burger, J., Swallow, D.M., and Thomas, M.G. (2011). Evolution of lactase persistence: an example of human niche construction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci* *366*, 863-877.
- Gleich GJ, Adolphson CR, and Leiferman KM (1993). The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu Rev Med* *44*, 85-101.
- Greiff L, Erjefalt I, Svensson C, Wollmer P, Alkner U, Andersson M, and Persson CG (1993). Plasma exudation and solute absorption across the airway mucosa. *Clin Physiol* *13*, 219-233.

- Griinari, J.M., Corl, B.A., Lacy, S.H., Chouinard, P.Y., Nurmela, K.V., and Bauman, D.E. (2000). Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. *J. Nutr* 130, 2285-2291.
- Halwani R, Al-Muhsen S, and Hamid Q (2010). Airway remodeling in asthma. *Curr Opin Pharmacol* 10, 236-245.
- Hamid Q, and Tulic M (2009). Immunobiology of asthma. *Annu Rev Physiol* 71, 489-507.
- Hammad H, and Lambrecht BN (2008). Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol* 8, 193-204.
- Hara A, and Radin NS (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal Biochem* 90, 420-426.
- Harizi, H., Corcuff, J.-B., and Gualde, N. (2008). Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol Med* 14, 461-469.
- Harris, W.S., Sands, S.A., Windsor, S.L., Ali, H.A., Stevens, T.L., Magalski, A., Porter, C.B., and Borkon, A.M. (2004). Omega-3 fatty acids in cardiac biopsies from heart transplantation patients: correlation with erythrocytes and response to supplementation. *Circulation* 110, 1645-1649.
- Hauswirth, C.B., Scheeder, and Beer, J.H. (2004). High omega-3 fatty acid content in alpine cheese: the basis for an alpine paradox. *Circulation* 109, 103-107.
- He, W., Lü, B., and Huang, C. (2005). [Lactase and its gene regulation in BALB/c mice at different ages]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 36, 516-518.
- Heinrich, J., Hoelscher, B., Frye, C., Meyer, I., Wjst, M., and Wichmann, H.E. (2002). Trends in prevalence of atopic diseases and allergic sensitization in children in Eastern Germany. *Eur Respir J* 19, 1040-1046.
- Heinzmann A, Blattmann S, Forster J, Kuehr J, and Deichmann KA (2000). Common polymorphisms and alternative splicing in the ILT3 gene are not associated with atopy. *Eur J Immunogenet* 27, 121-127.
- Hoffjan S, Nicolae D, and Ober C (2003). Association studies for asthma and atopic diseases: a comprehensive review of the literature. *Respir Res* 4, 14.
- Holgate ST (2004). The epidemic of asthma and allergy. *J R Soc Med* 97, 103-110.
- Holgate ST (2008). Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 38, 872-897.
- Hoppu, U., Isolauri, E., Laakso, P., Matomäki, J., and Laitinen, K. (2011). Probiotics and dietary counselling targeting maternal dietary fat intake modifies breast milk fatty acids and cytokines. *European journal of nutrition*.
- Horwitz, W. (1982). Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Anal. Chem* 54, 67-76.
- Humbert M (2000). L'asthme "intrinseque" existe-t-il? *Rev Mal Respir* 17, 245-254.
- Ip, C., Chin, S.F., Scimeca, J.A., and Pariza, M.W. (1991). Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res* 51, 6118-6124.
- Iverson JL, and Sheppard AJ (1975). Programmed temperature gas chromatographic analysis of esters of fatty acids. *J Chromatogr Sci* 13, 505-508.
- Iverson, S.J., Lang, S.L., and Cooper, M.H. (2001). Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids* 36, 1283-1287.

- Izuhara, K., Ohta, S., Shiraishi, H., Suzuki, S., Taniguchi, K., Toda, S., Tanabe, T., Yasuo, M., Kubo, K., and Hoshino, T., et al. (2009). The mechanism of mucus production in bronchial asthma. *Curr. Med. Chem* *16*, 2867-2875.
- Jahreis, G. (1999). The potential anticarcinogenic conjugated linoleic acid, cis-9,trans-11 C18:2, in milk of different species: Cow, goat, ewe, sow, mare, woman. *Nutrition Research* *19*, 1541-1549.
- Jaudszus, A., Krokowski, M., Möckel, P., Darcan, Y., Avagyan, A., Matricardi, P., Jahreis, G., and Hamelmann, E. (2008). Cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid inhibits allergic sensitization and airway inflammation via a PPARgamma-related mechanism in mice. *J. Nutr* *138*, 1336-1342.
- Jensen, R.G. (1995). *Handbook of milk composition* (San Diego: Academic Press).
- Jensen, R.G. (2002). The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J. Dairy Sci* *85*, 295-350.
- Jump, D.B. (2002). Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr. Opin. Lipidol* *13*, 155-164.
- Kaltenböck, K. (2008). *Chromatographie für Einsteiger* (Weinheim, Bergstr: Wiley-VCH).
- Kanwar, R.K., Macgibbon, A.K., Black, P.N., Kanwar, J.R., Rowan, A., Vale, M., and Krissansen, G.W. (2008). Bovine milk fat enriched in conjugated linoleic and vaccenic acids attenuates allergic airway disease in mice. *Clin. Exp. Allergy* *38*, 208-218.
- Katan, M.B., Deslypere, J.P., van Birgelen, A.P., Penders, M., and Zegwaard, M. (1997). Kinetics of the incorporation of dietary fatty acids into serum cholesteryl esters, erythrocyte membranes, and adipose tissue: an 18-month controlled study. *J. Lipid Res* *38*, 2012-2022.
- Kay AB (2001). Allergy and allergic diseases. Second of two parts. *N Engl J Med* *344*, 109-113.
- Kay AB (2005). The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol Med* *11*, 148-152.
- Kelley, N.S., Hubbard, N.E., and Erickson, K.L. (2007). Conjugated linoleic acid isomers and cancer. *J. Nutr* *137*, 2599-2607.
- Kelsey, J.A., Corl, B.A., Collier, R.J., and Bauman, D.E. (2003). The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *J. Dairy Sci* *86*, 2588-2597.
- Kepler, C.R., and Tove, S.B. (1967). Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. 3. Purification and properties of a linoleate delta-12-cis, delta-11-trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem* *242*, 5686-5692.
- Koletzko, B., Larqué, E., and Demmelmair, H. (2007). Placental transfer of long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA). *J Perinat Med* *35 Suppl 1*, S5-11.
- Kraft S, and Kinet JP (2007). New developments in FcepsilonRI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol* *7*, 365-378.
- Kraft, J., Collomb, M., Mockel, P., Sieber, R., and Jahreis, G. (2003). Differences in CLA isomer distribution of cow's milk lipids. *Lipids* *38*, 657-664.
- Kramer JK, Cruz-Hernandez C, and z'Zhou J (2001). Conjugated linoleic acids and octadecanoic acids: Analysis by GC. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 600-609.
- Kramer JK, Fellner, V., Dugan, M.E., Sauer, F.D., Mossoba, M.M., and Yurawecz, M.P. (1997). Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids* *32*, 1219-1228.

- Kramer JK, Blackadar CB, and Zhou J (2002). Evaluation of two GC columns (60-m SUPELCOWAX 10 and 100-m CP Sil 88) for analysis of milkfat with emphasis on CLA, 18:1, 18:2 and 18:3 isomers, and short- and long-chain FA. *Lipids* 37, 823-835.
- Kramer, J.K., Fellner, V., Dugan, M.E., Sauer, F.D., Mossoba, M.M., and Yurawecz, M.P. (1997). Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids* 32, 1219-1228.
- Kramer, J.K.G., Cruz-Hernandez, C., Deng, Z., Zhou, J., Jahreis, G., and Dugan, M.E.R. (2004). Analysis of conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomers in synthetic and animal products. *Am. J. Clin. Nutr* 79, 1137S-1145S.
- Kritchevsky, D., Tepper, S.A., Wright, S., Tso, P., and Czarnecki, S.K. (2000). Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression of atherosclerosis in rabbits. *J Am Coll Nutr* 19, 472S-477S.
- Kromidas, S. (1999). *Validierung in der Analytik* (Weinheim: Wiley-VCH).
- Kromidas, S. (2006). *HPLC richtig optimiert. Ein Handbuch für Praktiker* (Weinheim: Wiley-VCH).
- Kuiper S, Muris JW, Dompeling E, Kester AD, Wesseling G, Knottnerus JA, and van Schayck CP (2007). Interactive effect of family history and environmental factors on respiratory tract-related morbidity in infancy. *J Allergy Clin Immunol* 120, 388-395.
- Lai, H.Y., and Rogers, D.F. (2010). Mucus hypersecretion in asthma: intracellular signalling pathways as targets for pharmacotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 10, 67-76.
- Lands, L.C., Iskandar, M., Beaudoin, N., Meehan, B., Dauletbaev, N., and Berthiaume, Y. (2010). Dietary supplementation with pressurized whey in patients with cystic fibrosis. *J Med Food* 13, 77-82.
- Larche M, Akdis CA, and Valenta R (2006). Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 6, 761-771.
- Lauritzen, L., and Carlson, S.E. (2011). Maternal fatty acid status during pregnancy and lactation and relation to newborn and infant status. *Matern Child Nutr* 7 Suppl 2, 41-58.
- Lee, K.N., Kritchevsky, D., and Pariza, M.W. (1994). Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 108, 19-25.
- Leff AR (1994). Inflammatory mediation of airway hyperresponsiveness by peripheral blood granulocytes. The case for the eosinophil. *Chest* 106, 1202-1208.
- Leiber, F., Kreuzer, M., Nigg, D., Wettstein, H.R., and Scheeder (2005). A study on the causes for the elevated n-3 fatty acids in cows' milk of alpine origin. *Lipids* 40, 191-202.
- Lemanske RF (2004). Viral infections and asthma inception. *J Allergy Clin Immunol* 114, 1023-1026.
- Lemanske RF Jr (2002). The childhood origins of asthma (COAST) study. *Pediatr Allergy Immunol* 13 Suppl 15, 38-43.
- Levy, B.D., Clish, C.B., Schmidt, B., Gronert, K., and Serhan, C.N. (2001). Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat. Immunol* 2, 612-619.
- Linke, B., Pierre, S., Coste, O., Angioni, C., Becker, W., Maier, T.J., Steinhilber, D., Wittpoth, C., Geisslinger, G., and Scholich, K. (2009). Toponomics Analysis of Drug-Induced Changes in Arachidonic Acid-Dependent Signaling Pathways during Spinal Nociceptive Processing. *J. Proteome Res* 8, 4851-4859.

- Litonjua AA, Carey VJ, Burge HA, Weiss ST, and Gold DR (1998). Parental history and the risk for childhood asthma. Does mother confer more risk than father? *Am J Respir Crit Care Med* 158, 176-181.
- Lloyd CM, and Hessel EM (2010). Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol* 10, 838-848.
- Lohoff M, and Mak TW (2005). Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 5, 125-135.
- Luster, A.D., and Tager, A.M. (2004). T-cell trafficking in asthma: lipid mediators grease the way. *Nat. Rev. Immunol* 4, 711-724.
- Ly NP, and Celedon JC (2007). Family history, environmental exposures in early life, and childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 120, 271-272.
- Macaubas, C., Klerk, N.H. de, Holt, B.J., Wee, C., Kendall, G., Firth, M., Sly, P.D., and Holt, P.G. (2003). Association between antenatal cytokine production and the development of atopy and asthma at age 6 years. *Lancet* 362, 1192-1197.
- Macredmond, R., Singhera, G., Attridge, S., Bahzad, M., Fava, C., Lai, Y., Hallstrand, T.S., and Dorscheid, D.R. (2010). Conjugated linoleic acid improves airway hyper-reactivity in overweight mild asthmatics. *Clin. Exp. Allergy* 40, 1071-1078.
- Macredmond, R., and Dorscheid (2011). Conjugated linoleic acid (CLA): Is it time to supplement asthma therapy? *Pulm Pharmacol Ther.*
- Marshall JS (2004). Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol* 4, 787-799.
- Masoli M, Fabian D, Holt S, and Beasley R (2004). The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 59, 469-478.
- Matuszewski, B.K. (2006). Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 830, 293-300.
- Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., and Chavez-Eng, C.M. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 75, 3019-3030.
- McHugh, M.K., Symanski, E., Pompeii, L.A., and Delclos, G.L. (2009). Prevalence of asthma among adult females and males in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 2001-2004. *J Asthma* 46, 759-766.
- Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, Depner M, von Berg A, Bufe A, and Rietschel E, et al. (2007). Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature* 448, 470-473.
- Molina, D.M., Wetterholm, A., Kohl, A., McCarthy, A.A., Niegowski, D., Ohlson, E., Hammarberg, T., Eshaghi, S., Haeggström, J.Z., and Nordlund, P. (2007). Structural basis for synthesis of inflammatory mediators by human leukotriene C4 synthase. *Nature* 448, 613-616.
- Morales-Almaráz, E., Soldado, A., González, A., Martínez-Fernández, A., Domínguez-Vara, I., La Roza-Delgado, B. de, and Vicente, F. (2010). Improving the fatty acid profile of dairy cow milk by combining grazing with feeding of total mixed ration. *J. Dairy Res* 77, 225-230.
- Morr, C.V., and Ha, E.Y. (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Crit Rev Food Sci Nutr* 33, 431-476.

- Moya-Camarena, S.Y., Vanden Heuvel, J.P., Blanchard, S.G., Leesnitzer, L.A., and Belury, M.A. (1999). Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPARalpha. *J. Lipid Res* 40, 1426-1433.
- Nicolosi, R.J., Rogers, E.J., Kritchevsky, D., Scimeca, J.A., and Huth, P.J. (1997). Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery* 22, 266-277.
- Nowak D, Heinrich, J., Jorres, R., Wassmer, G., Berger, J., Beck, E., Boczor, S., Claussen, M., Wichmann, H.E., and Magnussen H (1996). Prevalence of respiratory symptoms, bronchial hyperresponsiveness and atopy among adults: west and east Germany. *Eur Respir J* 9, 2541-2552.
- Ober C, and Moffatt MF (2000). Contributing factors to the pathobiology. The genetics of asthma. *Clin Chest Med* 21, 245-261.
- Oliver, S.P., Boor, K.J., Murphy, S.C., and Murinda, S.E. (2009). Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Pathog Dis* 6, 793-806.
- O'Shea, M., Bassaganya-Riera, J., and Mohede, I.C. (2004). Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. *Am J Clin Nutr* 79, 1199S-1206S.
- Palmquist, D.L., and Jenkins, T.C. (2003). Challenges with fats and fatty acid methods. *J. Anim. Sci* 81, 3250-3254.
- Park SJ, Park CW, Kim SJ, Kim JK, Kim YR, Park KA, Kim JO, and Ha YL (2002). Methylation methods for the quantitative analysis of conjugated linoleic acid (CLA) isomers in various lipid samples. *J Agric Food Chem* 50, 989-996.
- Perkin MR, and Strachan DP (2006a). Which aspects of the farming lifestyle explain the inverse association with childhood allergy? *J Allergy Clin Immunol* 117, 1374-1381.
- Perkin MR, and Strachan DP (2006b). Which aspects of the farming lifestyle explain the inverse association with childhood allergy? *J Allergy Clin Immunol* 117, 1374-1381.
- Pfefferle PI, Buchele G, Blumer N, Roponen M, Ege MJ, Krauss-Etschmann S, Genuneit J, Hyvarinen A, Hirvonen MR, and Lauener R, et al. (2010). Cord blood cytokines are modulated by maternal farming activities and consumption of farm dairy products during pregnancy: the PASTURE Study. *J Allergy Clin Immunol* 125, 108-15.e1-3.
- Prandini, A., Sigolo, S., and Piva, G. (2009). Conjugated linoleic acid (CLA) and fatty acid composition of milk, curd and Grana Padano cheese in conventional and organic farming systems. *J Dairy Res* 76, 278-282.
- Rabe KF, Munoz NM, Vita AJ, Morton BE, Magnussen H, and Leff AR (1994). Contraction of human bronchial smooth muscle caused by activated human eosinophils. *Am J Physiol* 267, L326-34.
- Ratnayake, W.M.N., Plouffe, L.J., Pasquier, E., and Gagnon, C. Temperature-sensitive resolution of cis- and trans-fatty acid isomers of partially hydrogenated vegetable oils on SP-2560 and CP-Sil 88 capillary columns. *J AOAC Int* 85, 1112-1118.
- Ratnayake, W.M., and Galli, C. (2009). Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. *Ann Nutr Metab* 55, 8-43.
- Renna, M., Collomb, M., Munger, A., and Wyss, U. (2010). Influence of low-level supplementation of grazing dairy cows with cereals or sugar beet pulp on the concentrations of CLA isomers in milk. *J. Sci. Food Agric* 90, 1256-1267.

- Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, Carr D, Schierl R, Nowak D, and von Mutius E (2001). Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 358, 1129-1133.
- Riley, C.M., and Rosanske, T.W. (1996). Development and validation of analytical methods (Tarrytown, N.Y: Pergamon).
- Ring, J. (2010). Weissbuch Allergie in Deutschland (München: Springer Medizin).
- Risé, P., Eligini, S., Ghezzi, S., Colli, S., and Galli, C. (2007). Fatty acid composition of plasma, blood cells and whole blood: relevance for the assessment of the fatty acid status in humans. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 76, 363-369.
- Rivera J, and Gilfillan AM (2006). Molecular regulation of mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 117, 1214-25; quiz 1226.
- Robinson D, Hamid Q, Bentley A, Ying S, Kay AB, and Durham SR (1993). Activation of CD4+ T cells, increased TH2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 92, 313-324.
- Romagnani S (2004). Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J Allergy Clin Immunol* 113, 395-400.
- Rosenwasser LJ, Klemm DJ, Dresback JK, Inamura H, Mascali JJ, Klinnert M, and Borish L (1995). Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. *Clin Exp Allergy* 25 Suppl 2, 74-8; discussion 95-6.
- Ruiz-Rodriguez, A., Reglero, G., and Ibañez, E. (2010). Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids. *J Pharm Biomed Anal* 51, 305-326.
- Russo, G.L. (2009). Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem. Pharmacol* 77, 937-946.
- Schreiner M, and Hulan HW (2004). Determination of the carbon deficiency in the flame ionization detector response of long-chain fatty acid methyl esters and dicarboxylic acid dimethyl esters. *J Chromatogr A* 1045, 197-202.
- Schreiner, M. (2005). Quantification of long chain polyunsaturated fatty acids by gas chromatography. Evaluation of factors affecting accuracy. *J Chromatogr A* 1095, 126-130.
- Seaton, A., Godden, D.J., and Brown, K. (1994). Increase in asthma: a more toxic environment or a more susceptible population? *Thorax* 49, 171-174.
- Serhan, C.N. (2008). Controlling the resolution of acute inflammation: a new genus of dual anti-inflammatory and proresolving mediators. *J. Periodontol* 79, 1520-1526.
- Sheikh A, and Strachan DP (2004). The hygiene theory: fact or fiction? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 12, 232-236.
- Simopoulos, A.P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 233, 674-688.
- Simopoulos, A.P. (2009). Evolutionary aspects of the dietary omega-6:omega-3 fatty acid ratio: medical implications. *World Rev Nutr Diet* 100, 1-21.
- Skadhauge LR, Christensen K, Kyvik KO, and Sigsgaard T (1999). Genetic and environmental influence on asthma: a population-based study of 11,688 Danish twin pairs. *Eur Respir J* 13, 8-14.

- Sprong, R.C., Schonewille, A.J., and van der Meer, R. (2010). Dietary cheese whey protein protects rats against mild dextran sulfate sodium-induced colitis: role of mucin and microbiota. *J. Dairy Sci* 93, 1364-1371.
- Stables, M.J., and Gilroy, D.W. (2011). Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Prog. Lipid Res* 50, 35-51.
- Stark, K.D. (2008). The percentage of n-3 highly unsaturated fatty acids in total HUFA as a biomarker for omega-3 fatty acid status in tissues. *Lipids* 43, 45-53.
- Strachan DP (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299, 1259-1260.
- Strachan DP (2000). Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* 55 Suppl 1, S2-10.
- Stubbs, C.D., and Smith, A.D. (1984). The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim. Biophys. Acta* 779, 89-137.
- Stulnig, T.M., and Zeyda, M. (2004). Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: impact on T-cell signaling. *Lipids* 39, 1171-1175.
- Sugano, M., Tsujita, A., Yamasaki, M., Noguchi, M., and Yamada, K. (1998). Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulins in rats. *Lipids* 33, 521-527.
- Suhren G, H.H.H.W.S.J. (1986). Evaluation of liposaccharide (LPS) content as determined by the limulus test in milk and milk products II: raw milk and influences of technological procedures. *Milchwissenschaft*, 156-160.
- Sumi Y, and Hamid Q (2007). Airway remodeling in asthma. *Allergol Int* 56, 341-348.
- Sun, X., Zhang, J., Macgibbon, A.K., Black, P., and Krissansen, G.W. (2011). Bovine milk fat enriched in conjugated linoleic and vaccenic acids attenuates allergic dermatitis in mice. *Clin Exp Allergy*.
- Thijs, C., Müller, A., Rist, L., Kummeling, I., Snijders, B.E.P., Huber, M., van Ree, R., Simões-Wüst, A.P., Dagnelie, P.C., and van den Brandt, P.A. (2011). Fatty acids in breast milk and development of atopic eczema and allergic sensitisation in infancy. *Allergy* 66, 58-67.
- Thorsdottir, I., Hill, J., and Ramel, A. (2004). Seasonal variation in cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid content in milk fat from Nordic countries. *J. Dairy Sci* 87, 2800-2802.
- Tonial, I.B., Matsushita, M., Souza, N.E. de, Perini, J.A.L. de, Morais, D.R. de, Bani, F.A., and Visentainer, J.V. (2009). Avaliação de diferentes métodos de extração lipídica sobre a composição de ácidos graxos poliinsaturados em leite de vaca. *Arch Latinoam Nutr* 59, 78-81.
- Töpel, A. (2004). *Chemie und Physik der Milch. Naturstoff - Rohstoff - Lebensmittel* (Hamburg: Behr).
- Turpeinen, A.M., Ylönen, N., Willebrand, E. von, Basu, S., and Aro, A. (2008). Immunological and metabolic effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid in subjects with birch pollen allergy. *Br. J. Nutr* 100, 112-119.
- Valenta R, Ball T, Focke M, Linhart B, Mothes N, Niederberger V, Spitzauer S, Swoboda I, Vrtala S, and Westritschnig K, et al. (2004). Immunotherapy of allergic disease. *Adv Immunol* 82, 105-153.
- van der Pouw Kraan TC, van Veen A, Boeije LC, van Tuyl SA, de Groot ER, Stapel SO, Bakker A, Verweij CL, Aarden LA, and van der Zee JS (1999). An IL-13 promoter polymorphism associated with increased risk of allergic asthma. *Genes Immun* 1, 61-65.

- Vanden Berghe, W., Vermeulen, L., Delerive, P., Bosscher, K. de, Staels, B., and Haegeman, G. (2003). A paradigm for gene regulation: inflammation, NF-kappaB and PPAR. *Adv. Exp. Med. Biol* 544, 181-196.
- Vesa, T.H., Marteau, P., and Korpela, R. (2000). Lactose intolerance. *J Am Coll Nutr* 19, 165S-175S.
- Vial, J., and Jardy, A. (1999). Experimental Comparison of the Different Approaches To Estimate LOD and LOQ of an HPLC Method. *Anal. Chem* 71, 2672-2677.
- Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, and Bonsignore G (2003). Airway remodeling in asthma. *Chest* 123, 417S-22S.
- von Mutius E, and Schmid S (2006). The PASTURE project: EU support for the improvement of knowledge about risk factors and preventive factors for atopy in Europe. *Allergy* 61, 407-413.
- von Mutius E, Martinez FD, Fritzsche C, Nicolai T, Roell G, and Thiemann HH (1994). Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med* 149, 358-364.
- von Mutius E, and Vercelli, D. (2010). Farm living: effects on childhood asthma and allergy. *Nat Rev Immunol* 10, 861-868.
- Von Pirquet C (1946). Allergie. *Ann Allergy* 4, 388-390.
- Wahn U, Lau S, Bergmann R, Kulig M, Forster J, Bergmann K, Bauer CP, and Guggenmoos-Holzmann I (1997). Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life. *J Allergy Clin Immunol* 99, 763-769.
- Waser M, Michels KB, Bieli C, Floistrup H, Pershagen G, von Mutius E, Ege M, Riedler J, Schram-Bijkerk D, and Brunekreef B, et al. (2007). Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe. *Clin Exp Allergy* 37, 661-670.
- Wenzel SE (2006). Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet* 368, 804-813.
- Whigham, L.D., Cook, E.B., Stahl, J.L., Saban, R., Bjorling, D.E., Pariza, M.W., and Cook, M.E. (2001). CLA reduces antigen-induced histamine and PGE(2) release from sensitized guinea pig tracheae. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 280, R908-12.
- Whigham, L.D., Higbee, A., Bjorling, D.E., Park, Y., Pariza, M.W., and Cook, M.E. (2002). Decreased antigen-induced eicosanoid release in conjugated linoleic acid-fed guinea pigs. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 282, R1104-12.
- Wickens K, Lane JM, Fitzharris P, Siebers R, Riley G, Douwes J, Smith T, and Crane J (2002). Farm residence and exposures and the risk of allergic diseases in New Zealand children. *Allergy* 57, 1171-1179.
- Wijga, A.H., Smit, H.A., Kerkhof, M., Jongste, J.C. de, Gerritsen, J., Neijens, H.J., Boshuizen, H.C., and Brunekreef B (2003). Association of consumption of products containing milk fat with reduced asthma risk in pre-school children: the PIAMA birth cohort study. *Thorax* 58, 567-572.
- Willers, S.M., Wijga, A.H., Brunekreef, B., Kerkhof, M., Gerritsen, J., Hoekstra, M.O., Jongste, J.C. de, and Smit, H.A. (2008). Maternal food consumption during pregnancy and the longitudinal development of childhood asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 178, 124-131.
- Willett, W. (1998). *Nutritional epidemiology* (New York: Oxford University Press).
- Wills-Karp, M., Santeliz, J., and Karp, C.L. (2001). The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol* 1, 69-75.

Woodruff, C.W. (1976). Milk intolerances. *Nutr. Rev* 34, 33-37.

Woods, R.K., Raven, J.M., Walters, E.H., Abramson, M.J., and Thien, F.C.K. (2004). Fatty acid levels and risk of asthma in young adults. *Thorax* 59, 105-110.

Wu T, Boezen HM, Postma DS, Los H, Postmus PE, Snieder H, and Boomsma DI (2010). Genetic and environmental influences on objective intermediate asthma phenotypes in Dutch twins. *Eur Respir J* 36, 261-268.

Yaqoob, P., Pala, H.S., Cortina-Borja, M., Newsholme, E.A., and Calder, P.C. (2000). Encapsulated fish oil enriched in alpha-tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. *Eur. J. Clin. Invest* 30, 260-274.

Ying S, Durham SR, Corrigan CJ, Hamid Q, and Kay AB (1995). Phenotype of cells expressing mRNA for TH2-type (interleukin 4 and interleukin 5) and TH1-type (interleukin 2 and interferon gamma) cytokines in bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies from atopic asthmatic and normal control subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12, 477-487.

8. Verzeichnis der akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren bzw. Privat-Dozenten in Gießen und in Marburg:

Adamkewitz, Alter, Bauer, Breckow, Brehm, Cemic, Czermak, Garn, Geck, Gokorsch, Heimrich, Hemberger, Kirschbaum, Kitzrow, Kleinöder, Metz, Nietert, Renz, Röhricht, Runkel, Stadlbauer, Subke, Zink, Zirn

9. Publikationen

Originalarbeiten:

Böcking, C., Nockher, W.A., Schreiner, M., Renz H., Pfefferle, P.I.: Development and validation of a combined method for the biomonitoring of omega-3/-6 fatty acids and conjugated linoleic acids in different matrices from human and nutritional sources. *Clin Chem Lab Med*, 48(12):1757-63 (2010)

Böcking, C., Büchele, G., Genuneit, J., Braun-Fahrländer, C., von Mutius, E., Renz, H., Pfefferle, P.I.: Farm milk rich in conjugated linoleic acids affects early symptoms of asthma but not atopic sensitization in children of the PASTURE/Efraim study. (in Vorbereitung)

Böcking, C., Harb, H., Zehethofer, N., Lindner, B., Nüsing, R., Kulozik, U., Renz, H., Pfefferle, P.I.: Milk-CLA does not affect the asthma phenotype in a murine model of experimental asthma. (in Vorbereitung)

Eingeladener Editorial:

Pfefferle P.I., **Böcking, C.,** Renz H.: Maternal cytokine profiles during pregnancy – predictors for later allergy or just reading the tea leaves? *Allergy* (in Druck)

Veröffentlichte Abstracts und Kongressbeiträge:

Böcking, C., Köllisch, G., Pfefferle, P.I., Renz, H., Fettsäuren aus der Kuhmilch zur Allergieprävention in frühem Kindesalter. *Allergo J.*, 18(1) (2009) – Mainzer Allergie Workshop 2009

Böcking, C., Harb, H., Büchele, G., Renz, H., Pfefferle, P.I., Die protektive Rolle von Bauernhofmilch in der Entwicklung von experimentellem Asthma im akuten Mausmodell. *Allergo J.*, 20(1) (2011) – Mainzer Allergie Workshop 2011

Harb, H., **Böcking, C.,** Pfefferle, P.I., Renz, H., Garn, H., *Staphylococcus sciuri* as a protective factor against experimental murine allergic airway disease. *Allergo J.*, 20(1) (2011) – Mainzer Allergie Workshop 2011

Böcking, C., Harb, H., Büchele, G., Renz, H., Pfefferle, P.I., The protective role of alpine farm milk in the development in experimental asthma. *Posterbeitrag EAACI 2011 Istanbul*

10. Danksagung

Allen voran gilt der Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Harald Renz und Leiter des Instituts für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik für die Bereitstellung des interessanten Themas und seine fachliche Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Dr. Petra Ina Pfefferle für die außerordentliche Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Promotion. Besonderer Dank gebührt ihrer ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei jeglicher Art von Problemen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Gise Büchele, Prof. Dr. Erika von Mutius und Dr. Jon Genuneit für Ihre tatkräftige Unterstützung bei den epidemiologischen Auswertungen und zahlreichen Diskussionen zu sämtlichen epidemiologischen und statistischen Anliegen.

Weiterer Dank gilt PD Dr. Andreas Nockher, PD Dr. Holger Garn und vor allem meinem Kollegen und Freund Hani Harb für ihre wissenschaftliche Anregungen und Diskussionen sowie die hervorragende Kooperationsbereitschaft.

Ich bedanke mich auch bei Prof. Dr. Mathias Schreiner, der mir den Aufenthalt an der BOKU Wien ermöglichte und für seine nicht selbstverständige Hilfe und unzählige Diskussionen zur Fettsäureanalytik. Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Rolf Nüsing seine Kooperationsbereitschaft bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt ebenso unseren technischen Mitarbeitern für die praktische Unterstützung und stete Hilfsbereitschaft. Vielen Dank an: Lydia, Sophia, Thomas, Anja, Britta, Nicole, Wilma, unseren Azubis und alle anderen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe.

Schlussendlich möchte ich gerne allen meinen Freunden danken, die mich während der gesamten Zeit unterstützt haben und wenn es notwendig war auch mal für Abwechslung gesorgt haben. Außerdem möchte ich mich bei Lars Hajdu für die Durchsicht des Manuskripts bedanken. Ganz besonderer Dank gilt meiner Partnerin Caren für ihre ausdauernde Geduld und Unterstützung!

Der größte Dank gilt jedoch meiner Mutter, die mich unermüdlich und liebevoll unterstützte und mir meinen akademischen Werdegang erst ermöglichte. Von ihr habe ich gelernt, dass man mit Ehrgeiz, Fleiß und Vertrauen in sich selbst viel erreichen kann!

DANKE!

Anhang

I. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Österreich
Abb.	Abbildung
Ag-HPLC	Silberionen-HPLC
ALEX	Allergien und Endotoxin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BAL	Broncho-alveoläre Lavage
BfArM	Bundesamt für Arzneimittel
BG	Bestimmungsgrenze
BHT	Butylhydroxytoluol
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Konzentration
C	Schweiz
CBA	Cytometric Bead Array
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	copy DNA
CE	Cholesterolester
CED	chronisch-entzündliche Darmentzündung
CLA	Konjugierte Linolsäure
COX	Cyclooxygenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DC	Dendritische Zelle o. Dünnsichtchromatographie
DHA	Docosahexaensäure
ECRHS	European Community Respiratory Health Survey
EFRAIM	Mechanisms of Early Protective Exposures on Allergy Development
EHEC	Enterohämorrhagische Escherichia coli
ELISA	Enzyme-linked Immunoabsorbant Assay
EPA	Eicosapentaensäure
F	Frankreich
FACS	Flourescence Activated Cell Sorting
FAME	Fettsäuremethylester
Fc	Fc-Fragment
FcεRI	IgE-Rezeptor
FDA	Food and Drug Administration
FID	Flammenionisationsdetektor
G	Deutschland
FKS	Fall-Kontroll-Studie
GC	Gaschromatographie
ggf.	gegebenfalls

GINA	Globale Initiative für Asthma
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
h	Stunde
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
i.g.	intra-gastrisch
i.p.	intra-peritoneal
IFN-γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobuline
IL	Interleukin
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood
ISTD	Interner Standard
kg	Kilogramm
L	Liter
LA	Linolsäure
LC	Flüssigchromatographie
LOX	Lipoxygenase
m	milli
M	Molar
MCh	Metacholin
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaHSO ₄ H ₂ O	Natriumhydrogensulfat-Monohydrat
NaOH	Natriumhydroxid
NaSO ₄	Natriumsulfat
NWG	Nachweisgrenze
OVA	Ovalbumin
p	Wahrscheinlichkeit
PARSIFAL	Prevention of Allergy - Risk Factors for Sensitization Related to Farming and Anthroposopic lifestyle
PAS	Periodsäure-Schiff
PASTURE	Protection against Allergy - Study in Rural Enviroments
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pg	pikogramm
PL	Phospholipid
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PPAR	Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptoren
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäure

R ²	Bestimmtheitsmaß
RA	Rumensäure
RDA	empfohlene Tagesmenge
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSV	Respiratorischen Synzytial-Virus
RT	Raumtemperatur
RV	Rhinovirus
S	Finnland
s.	siehe
s.c.	subkutan
SCARPOL	Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution, Climate and Pollen
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SFA	saturierte Fettsäuren
SFB/TR22	Sonderforschungsbereich/Transregio 22
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SRV	Signal-Rausch-Verhältnis
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zellrezeptor
TG	Triglycerid
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TMG	Tetramethylguanidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRF	theoretische Responsefaktoren
TX	Thromboxan
UV	Ultraviolett
V _k	Variationskoeffizient
WHO	Weltgesundheitsorganisation
α-LA	alpha-Linolensäure
ω	Omega

II. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

II.I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Allergische Sensibilisierung (modifiziert nach Galli SJ et al., 2008)	3
Abbildung 2: Sofortreaktion (modifiziert nach Galli SJ et al., 2008)	4
Abbildung 3: Spätreaktion (modifiziert nach Galli SJ et al., 2008)	5
Abbildung 4: Asthma-Prävalenz (Arztdiagnose) und Trendentwicklung zwischen 1990-2008 (Anandan C et al., 2010).....	6
Abbildung 5: Strukturformel von Linolsäure (LA), Rumensäure (RA) und t10, c12-CLA	17
Abbildung 6: Agilent 7980A-System	26
Abbildung 7: Studiendesign der PASTURE/Efrain-Studie (modifiziert nach Habilitationsschrift Pfefferle).....	33
Abbildung 8: Protokoll zur Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung.....	36
Abbildung 9: Protokolle zur Modellierung der allergischen Atemwegsentzündung durch die Verabreichung von Kuhmilch	36
Abbildung 10: Prozessschema der Mausdiätherstellung	46
Abbildung 11: GC/FID-Analyse von 37 FAME Standard Mischung auf der DB-WAX Säule von Agilent	49
Abbildung 12: GC/FID-Analyse von 37 FAME Standard Mischung auf der CP-Select FAME Säule von Varian	49
Abbildung 13: GC/FID-Analyse von 37 FAME Standard Mischung plus neun weitere Standards auf der CP-Sil Säule von Varian	50
Abbildung 14: Kalibrationskurven und Bestimmtheitsmaße R^2 für C14:0 und C16:0 in Hexan.....	52
Abbildung 15: Vergleich von theoretischen Responsefaktoren (trf) mit empirischen Responsefaktoren (erf).....	53
Abbildung 16: Dünnschichtchromatographie von unbehandelten (links) und transmethylierten (rechts) Lipidextrakten aus (A) Serum, (B) Erythrozytenmembranen und (C) Kuhmilch	56
Abbildung 17: Lineare Regression der Wiederfindung (n=4) für C20:4 n6 und C16:0 in Serum.....	59
Abbildung 18: Lineare Regression der Wiederfindung (n=4) für C20:4 n6 und C16:0 in Serum.....	60
Abbildung 19: Präzision von Tag zu Tag in Serum für (A) C18:0, (B) C18:2 c9,c12, (C) C18:3 n3, (D) C20:4 n6 und (E) C22:6 n3	62
Abbildung 20: Präzision von Tag zu Tag in Erythrozytenmembranen für (A) C18:0, (B) C18:2 c0,c12, (C) C18:3 n3, (D) C20:4 n6 und (E) C22:6 n3	64
Abbildung 21: Präzision von Tag zu Tag in Kuhmilch für (A) C18:0, (B) C18:2 c9,c12, (C) C18:3 n3, (D) C20:4 n6 und (E) C22:6 n3	66
Abbildung 22: Methodenlinearität (A) Serum, (B) Erythrozytenmembranen und (C) Kuhmilch.....	68
Abbildung 23: Stabilität der aufgearbeiteten Fettsäuremethylester (FAME)	70
Abbildung 24: Auswahl der Fälle und Kontrollen für die Fall-Kontroll-Studie (FKS)	71
Abbildung 25: Assoziationen zwischen dem Konsum von Bauernhofmilch vs. Molkereimilch und dem Auftreten von Asthmasymptomen.....	73
Abbildung 26: Zentren bedingte Unterschiede des CLA-Gehalt in Bauernhofmilch.....	75
Abbildung 27: Zentren bedingte Unterschiede des CLA-Gehalt im Serum von Bauernkinder	78
Abbildung 28: Assoziationen zwischen CLA-Gehalt von Milch- bzw. Serum und dem Auftreten von Asthmasymptomen	82
Abbildung 29: Prozentuale Gewichtsveränderungen nach Milchverabreichung.....	86

Abbildung 30: Atemwegsreaktivität nach Milchverabreichung.....	87
Abbildung 31: Leukozyten in der BAL nach 40-tägiger Milchfütterung im Model der allergischen Atemwegsentzündung	87
Abbildung 32: Immunoglobulinstatus nach 40-tätiger Milchfütterung im akuten Model der allergischen Atemwegsentzündung	88
Abbildung 33: Kinetik der CLA-Aufnahme in Zellmembranen	90
Abbildung 34: Prozentuale Gewichtszunahme der unterschiedlich gefütterten Versuchsgruppen	91
Abbildung 35: Leukozyten und Differenzierung der Leukozyten in der BAL nach Fütterung der Milchdiäten	93
Abbildung 36 Immunoglobulinstatus nach Fütterung der Milchdiäten	94
Abbildung 37: Atemwegsreaktivitätsmessung und Differenzierung der Leukozyten in der BAL nach Fütterung der Milchdiäten	95
Abbildung 38: Lungenhistologie nach Fütterung der Milchdiäten.....	96
Abbildung 39: Anzahl der Gobletzellen und das Gobletzellenvolumen nach der Fütterung der Milchdiäten	97
Abbildung 40: Konzentrationen der Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IFN- γ nach Fütterung der Milchdiäten	98
Abbildung 41: Immunoglobulinstatus nach Fütterung der Milchdiäten	99
Abbildung 42: Eicosanoidkonzentrationen in der BAL nach Fütterung mit verschiedenen Diäten	100
Abbildung 43: EPA und DHA Level in der BAL	101

II.II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Milchbestandteile modifiziert nach (Jensen, 1995)	12
Tabelle 2: Verdünnungsreihe der C14:0 und C22:0 Stocklösungen	30
Tabelle 3: AK-Konzentrationen und Verdünnungsfaktoren für Ig-ELISA.....	44
Tabelle 4: Nachweisgrenzen (NWG) für Eicosanoide	45
Tabelle 5: Evaluierte GC-Säule für die Bestimmung von Fettsäuremethylester (FAME)	48
Tabelle 6: Bestimmung der Gerätepräzision mit Hilfe zehn zufällig ausgewählter FAME (n=10).....	51
Tabelle 7: Vergleich verschiedener Lipidextraktionsmethoden in Serum ($\mu\text{g}/\text{ml}$) und Erythrozytenmembranen ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	55
Tabelle 8: Physiologischen Fettsäurekonzentrationen in Serum und Kuhmilch	57
Tabelle 9: Aufstockungsmengen von C20:4 n6 und C16:0 in Serum.....	57
Tabelle 10: Wiederfindungsraten (n=4) von C20:4 n6 und C16:0 in Serum.....	58
Tabelle 11: Aufstockungsmengen von C20:4 n6 und C18:0 in Kuhmilch	59
Tabelle 12: Wiederfindungsraten (n=4) von C20:4 n6 und C18:0 in Kuhmilch	60
Tabelle 13: Präzision in Serie in Serum	61
Tabelle 14: Präzision von Tag zu Tag in Serum und Trendtest nach Neumann	63
Tabelle 15: Präzision in Serie in Erythrozytenmembranen	63
Tabelle 16: Präzision von Tag zu Tag in Erythrozytenmembranen und Trendtest nach Neumann	65
Tabelle 17: Präzision in Serie in Kuhmilch	65
Tabelle 18: Präzision von Tag zu Tag in Kuhmilch und Trendtest nach Neumann	67
Tabelle 19: Nachweis- (NWG) und Bestimmungsgrenzen (BG) in Serum, Erythrozytenmembranen und Kuhmilch.....	69

Tabelle 20: Charakterisierung der Fall-Kontroll-Studiengruppen	72
Tabelle 21: Unterschiede im Fettsäuremuster von Bauernhof- und Molkereimilch	74
Tabelle 22: Einflussfaktoren auf die CLA-Verteilung in Bauernhofmilch	77
Tabelle 23: Unterschiede im Fettsäuremuster von Bauern und Nicht-Bauern.....	79
Tabelle 24: Korrelationen zwischen mütterlicher und kindlicher Fettsäureverteilung im Serum.....	80
Tabelle 25: Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung der Erythrozyten von Bauern und Nicht-Bauern	81
Tabelle 26: Assoziationen zwischen CLA-Gehalt in der Milch bzw. Serum und allergen-spezifischen IgE	83
Tabelle 27: Vergleich der Fettsäuremuster der Alpen- und Hessenmilch sowie der Vergleich der Fettsäuremuster der Milch und der daraus hergestellten Diäten	84
Tabelle 28: Futterkonsum der verschiedenen Versuchsgruppen	91

III. Gaschromatographische Bedingungen

GC-System:	Aglient 7890 GC
Inlet:	Split/Splitless
Detektor:	FID
Auto-Sampler:	Agilent 7683 B
Liner:	Split-Liner
Säule:	CP-Sil 88 + Vorsäule (Silica, 5 m, ID 0,53 mm)

Experimentelle Konditionen GC-FID:

Inlettemperatur:	280 °C
Injektionsvolumen:	2 µl
Split ratio:	1/50
Trärgas:	Helium
Head pressure:	31,479 psi
Fluss:	0,830 ml/min
Ofentemperatur:	120°C für 5.7 min, 4.4°C/min bis 170° für 47.8 min, 8.8°C/min bis 205°C für 12.5 min, 4.4°C/min bis 210°C für 19.0 min
Detektortemperatur:	250°C
Detektorgase:	H ₂ -Fluss: 33 ml/min Luft-Fluss: 400 ml/min Makeup flow (He): 29,17 ml/min

IV. Theoretische Responsefaktoren (TRF) nach Craske und Bannon (1998)

Die vorliegenden Responsefaktoren auf 18:0 relativiert, C18:0 hat nach Definition einen Faktoren von 1,0000. Da die Responsefaktoren von der Anzahl der Kohlenstoffatome, die an Wasserstoff gebunden sind abhängig ist, sind jeweils nur ein Faktor für alle Positions- und geometrischen Isomere sowie für die verzweigte Fettsäuremethylester ist angegeben.

FAME	TRF	FAME	TRF
SFA		MUFA	
C4:0	1,5396	C14:1	1,0354
C6:0	1,3084	C15:1	1,0027
C8:0	1,1927	C16:1	1,0117
C9:0	1,1542	C17:1	1,0019
C10:0	1,2330	C18:1	1,0032
C11:0	1,0981	C20:1	0,9785
C12:0	1,0771	C22:1	0,9664
C13:0	1,0593	C24:1	0,9564
C14:0	1,0440	PUFA	
C15:0	1,0308	C18:2	0,9865
C16:0	1,0193	C18:3	0,9797
C17:0	1,0091	C18:4	0,9730
C18:0	1,0000	C20:2	0,9724
C19:0	,09919	C20:3	0,9663
C20:0	0,9846	C20:4	0,9603
C21:0	0,9780	C20:5	0,9452
C22:0	0,9720	C22:2	0,9609
C23:0	0,9665	C22:5	0,9443
C24:0	0,9614	C22:6	0,9305

V. Variationskoeffizienten V_K (Intra-Assay) aller gemessen Fettsäuren

Fettsäure	RT	Serum		Erythrozyten		Kuhmilch	
		MV	V_K	MV	V_K	MV	V_K
SFA							
C6:0	12.89	0.11	9.28	0.05	8.56	1.63	6.64
C8:0	14.83	0.13	8.91	0.05	11.57	1.53	10.22
C10:0	17.63	0.08	7.75	0.06	10.63	2.89	1.28
C11:0	19.50	0.26	8.03	0.03	10.47	0.06	3.84
C12:0	21.37	0.42	7.50	0.09	9.43	3.60	1.15
C13:0	23.67	0.14	7.15	0.05	7.89	0.11	2.78
C14:0	26.18	2.25	7.23	0.12	9.82	12.22	1.09
C15:0	29.28	0.39	7.61	0.05	9.90	1.24	1.10
C16:0	33.08	25.98	1.90	19.48	4.36	34.30	0.98
C17:0	37.76	0.49	8.68	0.43	9.40	0.17	2.12
C18:0	43.88	8.07	5.77	14.22	7.78	11.48	0.68
C19:0	51.63	0.10	7.40	0.13	7.51	0.65	8.43
C20:0	62.13	0.06	8.65	0.11	8.55	0.01	11.09
C21:0	69.55	0.02	9.41	0.15	9.69	0.03	5.38
C22:0	74.95	0.09	6.85	0.05	7.55	0.01	7.55
C23:0	80.20	0.03	12.47	0.05	9.98	0.01	10.41
C24:0	85.70	0.05	11.48	0.07	9.60	nd	nd
MUFA							
C14:1	28.73	0.11	8.77	nd	nd	0.54	2.11
C15:1	32.77	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C16:1	36.22	2.75	4.36	0.42	4.51	1.79	1.03
C17:1	41.47	0.29	6.62	0.05	9.42	nd	nd
C18:1 c9	48.16	23.43	3.42	16.53	5.66	22.96	7.87
C20:1	67.39	0.63	6.23	0.03	13.76	0.53	1.58
C22:1	77.64	0.19	9.60	0.10	6.09	0.03	10.30
C24:1	86.63	0.24	9.10	0.16	3.39	0.02	10.83
PUFA							
Omega 3							
C18:3	67.17	0.04	6.23	0.55	5.01	0.14	6.33
C18:4	70.79	0.07	12.17	0.07	9.24	0.02	5.38
C20:3	77.46	0.11	10.23	0.11	4.89	0.02	8.11
C20:4	81.25	0.13	6.13	0.07	8.86	0.03	7.06
C20:5	84.87	0.41	4.08	0.64	6.06	0.06	4.52
C22:5	97.01	0.57	8.26	3.18	6.07	0.10	4.05
C22:6	100.62	0.94	4.15	4.34	5.13	0.05	7.75
Omega 6							
C18:2	56.23	20.01	2.44	10.25	7.08	1.69	1.02
C18:3	63.42	0.32	7.11	0.08	8.25	0.14	6.32
C20:2	71.97	0.04	10.16	0.05	7.16	0.02	4.75
C20:3	75.31	1.46	5.42	2.09	4.41	0.10	6.78
C20:4	77.98	4.84	4.34	20.00	6.55	0.16	8.88
C22:2	82.59	nd	nd	0.08	6.01	nd	nd
C22:4	89.73	0.45	7.52	4.90	5.37	0.02	8.17
C22:5	92.57	1.48	5.78	0.70	7.56	0.02	7.84
trans FA							
C18:1 t9	46.83	0.12	12.08	0.07	9.86	0.21	2.69
C18:1 t11	47.24	1.75	2.74	0.13	9.24	1.66	0.97
C18:2 t9,12	52.67	0.03	11.40	0.03	13.06	0.01	8.09
CLA							
18:2 c9,t11	68.36	0.21	11.09	0.13	5.42	0.67	3.70
18:2 t10,c12	69.14	0.04	7.18	0.05	6.87	0.01	11.94

RT Retentionszeit; nd nicht detektiert; V_K Variationskoeffizient

VI. Variationskoeffizienten V_K (Inter-Assay) aller gemessenen Fettsäuren

Fettsäure	RT	Serum		Erythrozyten		Kuhmilch	
		MV	V_K	MV	V_K	MV	V_K
SFA							
C6:0*	12.89	0.11	9.71	tr	tr	2.63	3.65
C8:0*	14.83	0.13	11.04	tr	tr	1.90	3.07
C10:0*	17.63	0.09	9.57	0.03	12.93	4.48	4.21
C11:0	19.50	0.26	9.85	tr	tr	0.48	6.53
C12:0*	21.37	0.43	8.90	0.03	11.66	0.02	10.28
C13:0*	23.67	0.14	9.40	0.02	10.60	nd	nd
C14:0*	26.18	2.29	9.27	0.03	12.22	0.02	9.34
C15:0*	29.28	0.43	9.23	0.04	6.36	1.00	6.22
C16:0*	33.08	26.11	4.08	8.29	7.24	35.73	2.70
C17:0*	37.76	0.50	11.06	0.08	3.72	1.04	2.88
C18:0*	43.88	8.19	6.41	3.45	3.17	14.18	2.66
C19:0	51.63	0.12	7.40	0.05	13.23	0.15	4.17
C20:0*	62.13	0.06	11.60	0.07	6.60	0.24	2.86
C21:0	69.55	0.02	12.07	0.02	7.85	0.04	7.74
C22:0*	74.95	0.11	6.45	0.03	8.18	0.11	8.10
C23:0*	80.20	0.03	5.20	0.03	11.02	0.06	4.43
C24:0*	85.70	0.06	12.50	0.02	5.40	0.08	9.25
MUFA							
C14:1*	28.73	0.11	7.09	nd	nd	0.02	10.66
C15:1*	32.77	nd	nd	nd	nd	0.01	12.01
C16:1*	36.22	2.89	5.78	0.15	5.83	2.35	2.37
C17:1*	41.47	0.29	9.93	nd	nd	nd	nd
C18:1 c9*	48.16	23.45	12.94	8.59	7.80	28.24	2.76
C20:1*	67.39	0.64	8.94	0.05	5.38	0.09	7.95
C22:1*	77.64	0.20	10.92	0.02	14.00	0.02	7.51
C24:1*	86.63	0.26	7.45	0.04	11.20	0.02	10.28
PUFA							
Omega 3							
C18:3*	67.17	0.02	11.38	0.10	4.28	0.96	8.25
C18:4	70.79	0.08	12.61	0.02	6.03	0.02	10.15
C20:3	77.46	0.12	12.04	0.03	9.03	0.02	7.23
C20:4*	81.25	0.13	7.72	0.05	7.56	0.06	4.57
C20:5*	84.87	0.43	5.72	0.25	4.93	0.09	3.46
C22:5	97.01	0.55	8.42	2.02	10.24	0.15	3.97
C22:6 *	100.62	0.93	5.45	2.24	7.48	0.02	6.56
Omega 6							
C18:2*	56.23	19.93	4.23	4.16	6.71	2.25	2.50
C18:3 *	63.42	0.39	5.00	0.03	6.86	0.96	8.85
C20:2*	71.97	0.04	11.39	0.14	7.16	0.03	8.10
C20:3*	75.31	1.44	7.08	0.03	9.03	0.02	3.57
C20:4	77.98	4.81	5.20	7.50	6.55	0.18	3.00
C22:2*	82.59	nd	nd	0.03	10.64	0.01	6.53
C22:4	89.73	0.48	8.74	1.56	6.84	0.03	6.87
C22:5	92.57	1.46	7.39	0.26	5.71	0.02	3.97
trans FA							
C18:1 t9*	46.83	0.12	12.94	0.03	4.54	0.01	4.57
C18:1 t11	47.24	1.85	4.11	0.07	5.72	0.23	2.61
C18:2 t9,12*	52.67	0.03	14.40	nd	nd	2.05	12.12
CLA							
18:2 c9,t11	68.36	0.23	9.95	0.05	4.30	0.79	2.93
18:2 t10,c12	69.14	0.05	9.69	0.02	10.84	0.01	8.49

RT Retentionszeit; nd nicht detektiert; tr Spuren (< LOQ); V_K Variationskoeffizient
 *in 37 FAME Standard Mix von Supleco®

VII. Zusammensetzung und Vergleich der Fettsäuren in Plasma und Erythrozytenmembranen

Fettsäuren	Plasma						Erythrozytenmembranen					
	Diät A/Alpenmilch		Diät B/Hessenmilch		Kontrolldiät (C1000)		Diät A/Alpenmilch		Diät B/Hessenmilch		Kontrolldiät (C1000)	
	MW % der Gesamt-FS	SD	MW % der Gesamt-FS	SD	MW % der Gesamt-FS	SD	MW % der Gesamt-FS	SD	MW % der Gesamt-FS	SD	MW % der Gesamt-FS	SD
C14:0	2,52***	1,00	1,62	0,80	0,50 ^{°°°}	0,19	0,84	0,14	0,97 [#]	0,10	0,44 [°]	0,06
C16:0	19,16	9,36	26,28 ^{###}	1,81	21,19	0,82	29,53	0,33	30,14 ^{####}	0,27	28,06 ^{°°}	0,28
C18:0	10,40*	1,82	8,76	0,16	9,47	0,73	9,56 ^x	0,37	8,56	0,13	9,32 ^{°°°}	0,18
C20:0	0,22	0,05	0,22	0,10	0,21	0,05	0,41	0,11	0,26	0,04	0,17	0,01
C24:0	0,12	0,10	0,09	0,03	0,18	0,03	0,27	0,03	0,19	0,04	0,15	0,03
Σ SFA	32,43	6,37	36,94	2,66	31,37	1,11	41,41	0,56	40,82[#]	0,35	38,59^{°°°}	0,42
C16:1	3,76***	0,81	4,06 ^{####}	0,84	1,30 ^{°°°}	0,19	2,09	0,30	2,23 [#]	0,27	1,25	0,16
C18:1 t9	0,17	0,04	0,33	0,32	0,39	0,23	0,11	0,01	0,11 ^{####}	0,01	0,01 [°]	0,01
C18:1 t11	28,03***	4,70	30,25 ^{####}	2,83	13,25 ^{°°°}	1,96	23,09	1,10	23,13 ^{###}	0,97	17,06 ^{°°°}	1,26
C18:1 c9	4,08*	0,73	3,92 [#]	2,30	1,89 [°]	0,21	3,12	0,08	3,45 ^{####}	0,12	2,22 ^{°°°}	0,01
Σ MUFA	36,21***	5,57	38,60^{####}	4,87	16,82^{°°°}	1,79	28,55	1,37	28,63^{####}	1,07	20,61^{°°°}	1,47
C18:3 n3	12,2*	1,66	12,57 [#]	4,04	17,30 [°]	1,30	4,71	0,17	4,17	0,30	7,43 ^{°°°}	0,34
C20:5 n3	0,14	0,02	0,16	0,05	0,21	0,11	0,29	0,03	0,36	0,03	0,29 ^{°°}	0,03
C22:5 n3	8,63***	1,26	5,20 ^{####}	1,53	24,94	2,36	15,15	0,76	15,54 ^{####}	0,57	19,72 ^{°°°}	0,60
C22:6 n3	0,48***	0,81	0,23 ^{####}	0,14	0,90	0,93	1,52	0,07	1,59 ^{####}	0,03	2,98 ^{°°°}	0,12
Σ Omega-3	0,60	0,11	0,37	0,12	2,61[°]	0,25	1,13	0,06	1,33^{####}	0,06	4,00^{°°°}	0,28
C18:2 c9,c12	22,18***	2,67	18,78 ^{####}	4,05	46,37 [°]	2,02	22,46	1,11	22,72 ^{####}	0,66	34,40 ^{°°°}	0,67
C20:2 n6	0,70*	0,13	0,38	0,09	0,35	0,06	0,29	0,03	0,36 ^{####}	0,03	0,29 ^{°°°}	0,03
C20:4 n6	0,25	0,25	0,10	0,04	0,29 ^{°°°}	0,30	0,13	0,02	0,14 ^{####}	0,02	0,12 ^{°°°}	0,01
C22:4 n6	0,20***	0,04	0,22	0,07	0,20	0,06	0,63	0,04	0,62 ^{####}	0,02	0,14 ^{°°°}	0,01
C22:5 n6	3,42	0,79	1,50	0,32	1,83 ^{°°°}	0,49	4,74	0,28	4,82 ^{####}	0,19	2,00 ^{°°°}	0,12
Σ Omega-6	4,56***	0,90	2,20^{####}	0,27	2,73^{°°°}	0,77	5,73	0,33	5,91^{####}	0,20	2,54^{°°°}	0,01
C18:2 c9,t11	0,55***	0,13	0,39 ^{####}	0,10	0,03 ^{°°°}	0,07	0,51	0,03	0,45 ^{####}	0,03	0,06 ^{°°°}	0,01
C18:2 t10,c12	0,15***	0,02	0,15 ^{####}	0,08	0,00 ^{°°°}	0,00	0,06	0,01	0,05 ^{####}	0,01	0,005 ^{°°°}	0,01
Σ CLA	0,70***	0,14	0,54^{####}	0,11	0,03^{°°°}	0,07	0,57	0,03	0,5^{####}	0,04	0,07^{°°°}	0,01
Σ trans FS	8,01***	1,55	8,31^{####}	2,97	3,58^{°°°}	0,55	5,32	0,31	5,79^{####}	0,29	3,54^{°°°}	0,24
Ratio Σ n6/Σ n3	4,96***	0,64	8,57^{####}	1,88	18,28^{°°°}	5,67	3,96	0,07	3,87^{####}	0,10	13,97^{°°°}	0,69
Omega-3/6-Index	2,43***	0,44	3,41^{####}	1,46	12,78^{°°°}	4,09	3,10	0,08	3,14^{####}	0,08	9,7^{°°°}	0,59

* zeigt Unterschiede in Fettsäuremustern zw. Kontrolldiät gefütterter Tieren und Alpenmilch gefütterten Tieren, ° <0.05; °° <0.01; °°° <0.001 (1-way ANOVA gefolgt von Tukey Test)

zeigt Unterschiede in Fettsäuremustern zw. Kontrolldiät gefütterter Tieren und Hessenmilch gefütterten Tieren hin, # <0.05; ## <0.01; ### <0.001 (1-way ANOVA gefolgt von Tukey Test)

° zeigt Unterschiede in Fettsäuremustern zw. Kontrolldiät gefütterter Tieren und Hessenmilch gefütterten Tieren hin, ° <0.05; °° <0.01; °°° <0.001 (1-way ANOVA gefolgt von Tukey Test)

VIII. Fragebögen zur Milchsammlung

2 Monate

1. Datum und Uhrzeit der Probenahme: _____ Uhr
2. Art der Milch
 - _____ Milch vom Bauernhof → **weiter mit Frage 3!**
 - _____ Milch vom Geschäft → **weiter mit Frage 7!**
3. Besitzt der Bauernhof einen Hoftank? ja _____ nein _____
4. Wurde die Milch abgekocht? ja _____ nein _____
5. Wurde die Milch in einem Sahneabscheider aufbewahrt? ja _____ nein _____
6. Wie lange wurde die Milch vor der Probenahme aufbewahrt _____ Stunden
(Zeit seit Entnahme aus dem Hoftank) → **weiter mit Frage 9!**
7. Welchen Fettgehalt hat die Milch? _____ %
8. Wie lange wurde die Milch vor der Probenahme aufbewahrt? _____ Tage
(seit dem Öffnen der Packung)
9. Wo wurde die Milch vor der Probenahme aufbewahrt:
 - Kühlschrank _____
 - Speisekammer _____
 - Milchkammer _____
 - Sonstiges, wo _____
10. Geschätzte Temperatur des Lagerortes (Kühlschrank +4°) _____ C°
11. Bei welcher Temperatur wurde die Milch transportiert _____ C°
12. Bei welcher Temperatur wird die Probe bei der Feldarbeiterin eingefroren? _____ C°
13. Wie viele Stunden liegen zwischen der Probenahme und dem
Einfrieren der Probe bei der Feldarbeiterin? _____ Stunden
14. Wie viele Tage wurde die Probe bei der Feldarbeiterin zwischengelagert?
_____ Tage

2274483190

5. Wurde von der Kuhmilch der Rahm abgeschöpft?

- Ja, der Rahm wurde vollständig abgeschöpft 1
- Ja, der Rahm wurde teilweise abgeschöpft 2 Vk05_1
- Nein, der Rahm wurde nicht abgeschöpft und vor dem Verzehr mit der Milch verrührt 3
- Kennen Sie den Fettgehalt dieser Milch? Nein 1 Vk05_2
- Ja, ca. , % Fett Vk05_3
- Nein, der Rahm wurde nicht abgeschöpft aber vor dem Verzehr nicht mehr mit der Milch verrührt 1 Vk05_4

Bitte beantworten Sie Frage 6 bis 9 nur dann, wenn Sie die Kuhmilch im Supermarkt oder Laden gekauft haben!

6. Bei der Kuhmilch aus dem Supermarkt handelt es sich um:

- Vorzugsmilch (rohe Milch), nicht homogenisiert 1
- Vorzugsmilch (rohe Milch), homogenisiert 2 Vk06
- pasteurisierte Frischmilch 3
- H-Milch 4

7. Welchen Fettgehalt hat die Milch, von der die Kuhmilchprobe entnommen wurde?

- 3,5% oder mehr 1
- 2,5% bis < 3,5% 2 Vk07
- 1,5% bis < 2,5% 3
- Unter 1,5% 4

8. Wann haben Sie die Milch gekauft? Vor ca. Tagen Stunden

Vk08_1 Vk08_2

9. Wie lange war die Milchpackung vor Entnahme der Kuhmilch für die Probe geöffnet?

- Die Packung wurde unmittelbar vorher geöffnet 1 Vk09_1
- Die Packung wurde geöffnet vor ca. Tagen Stunden
- Vk09_2 Vk09_3

4522483198

15. Trinkt Ihr Kind zur Zeit noch sonstige Kuhmilch oder Ziegenmilch?
Bitte berücksichtigen Sie dabei auch Kakao und andere Milchgetränke!

- Vorzugsmilch (rohe Milch), nicht homogenisiert 1
- Vorzugsmilch (rohe Milch), homogenisiert 2
- pasteurisierte Frischmilch (Kuhmilch) 3
- H-Milch (Kuhmilch) 4 Vk15
- Zubereitung aus Milchpulver (Kuhmilch) 5
- Nicht-pasteurisierte Ziegenmilch 6

Hier noch eine letzte Frage bezüglich Lagerung und Transport des Probenröhrchens nach dem Befüllen:

16. Wie haben Sie das Röhrchen mit der Kuhmilchprobe bis zur Abgabe aufbewahrt?

Ort	von (Uhrzeit)	bis (Uhrzeit)	bei ca. °C
Kühlschrank	<input type="text"/> . <input type="text"/>	<input type="text"/> . <input type="text"/>	<input type="text"/>
sonstiger Lagerort (bitte eintragen)	Vk16_1_1 Vk16_2_1	Vk16_1_2 Vk16_2_2	Vk16_1_3 Vk16_2_3
Vk16_w <input type="text"/>	<input type="text"/> . <input type="text"/>	<input type="text"/> . <input type="text"/>	<input type="text"/>
Transport in Kühltasche	<input type="text"/> . <input type="text"/>	<input type="text"/> . <input type="text"/>	<input type="text"/>
	Vk16_3_1	Vk16_3_2	Vk16_3_3

Das LUKAS-Team bedankt sich für Ihre Mitwirkung!

IX. Fragebogenszüge zum Still- und Ernährungsverhalten der Kinder

2 Monate

31. Welche der folgenden Milcharten hat [Vornamen sagen] in den ersten 3 Lebenstagen bekommen?

	Ja	Nein
Eigene Muttermilch	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Säuglingsmilch	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Andere Milch (z.B. Ziegenmilch)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

32. Welche der Milcharten hat [Vornamen sagen] hauptsächlich bekommen?

Eigene Muttermilch.....	<input type="checkbox"/>
Säuglingsmilch	<input type="checkbox"/>
Andere Milch (z.B. Ziegenmilch).....	<input type="checkbox"/>

33. Haben Sie [Vornamen sagen] jemals gestillt?

 Diese Frage selbst mit „Ja“ ausfüllen, wenn die Mutter bei Frage 31 angegeben hat, dass ihr Kind in den ersten 3 Lebenstagen eigene Muttermilch erhalten hat.

Ja

Nein

39. Stillen Sie [Vornamen sagen] zur Zeit noch?

Ja, und zwar ausschließlich, d.h. ohne andere Nahrung zu füttern.....

Ja, aber nicht ausschließlich ⇒ **weiter mit Frage 41**

Nein ⇒ **weiter mit Frage 40**

40. Wie alt war [Vornamen sagen], als Sie mit dem Stillen ganz aufgehört haben?

wie viele Tage _____ oder wie viele Wochen _____

45. Haben Sie *[Vornamen sagen]* bisher eine der folgenden Milcharten **direkt von Ihrem eigenen oder einem anderen Bauernhof** gefüttert (egal ob mit oder ohne Verdünnung)?

	Ja	Nein
Kuhmilch, ohne Abkochen.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kuhmilch, abgekocht	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ziegenmilch	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

1 Jahr

31. Wurde Ihr Kind **jemals** gestillt?

Ja.....

Nein ⇒ weiter mit Frage 38

32. Wie viele Monate wurde Ihr Kind insgesamt gestillt? Wenn Ihr Kind weniger als 1 Monat gestillt wurde, geben Sie bitte die Stilldauer in Wochen an!

___ Monate

___ Wochen

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

	ja	nein
Kuhmilch direkt vom Bauernhof, ohne Abkochen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kuhmilch direkt vom Bauernhof, abgekocht.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vorzugsmilch.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pasteurisierte Frischmilch (Kuhmilch).....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
H-Milch (Kuhmilch).....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Zubereitungen aus Milchpulver (Kuhmilch).....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nicht pasteurisierte Ziegenmilch	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

39. Wie alt war Ihr Kind, als es **zum ersten Mal** Kuhmilch direkt vom Bauernhof getrunken hat?

Mein Kind hat noch keine Kuhmilch direkt vom Bauernhof getrunken.....

Kuhmilch direkt vom Bauernhof, ohne AbkochenAlter: ____ Monate

Kuhmilch direkt vom Bauernhof, abgekocht.....Alter: ____ Monate

4,5 Jahre

7256369514

Fragebogen zur Ernährung des Kindes im 37.-48. Lebensmonat

Im Folgenden wollen wir Sie zur Ernährung Ihres Kindes in den letzten 12 Lebensmonaten befragen.

1. Hat Ihr Kind in den letzten 12 Monaten Kuhmilch direkt von Ihrem Bauernhof oder einem anderen Hof getrunken? Bitte berücksichtigen Sie dabei jede Art von Milchgetränken (z. B. Kakao), die Sie aus Kuhmilch direkt vom Bauernhof hergestellt haben.

- Ja 1 ViE01
- Nein 2 ⇒ weiter mit Frage 14!

2. Welcher Qualitätsklasse war diese Milch in den letzten 12 Monaten überwiegend zugeordnet?

- S-Klasse 1
- Güteklasse 1 2
- Güteklasse 2 3 ViE02 / ViE02au
- Die Milch ist nicht klassifiziert, da der Betrieb nur für den Eigenverbrauch produziert 4
- Bitte nicht vorlesen:*
- Weiß nicht 8

3. Wie oft hat Ihr Kind diese Milch(getränke) in den letzten 12 Monaten getrunken?

- Weniger als 1 Mal pro Woche 1
- 1 - 6 mal pro Woche 2 ViE03
- Täglich 3

4886369510

4. Wie viele Gläser dieser Milch(getränke) trinkt Ihr Kind
üblicherweise pro Tag?
(1 Glas entspricht 0,2 Liter)

Gläser

ViE04

5. Hat Ihr Kind in den letzten 12 Monaten zum ersten Mal in seinem
Leben Kuhmilch direkt vom Dauernhof getrunken oder hatte es
auch schon vor dem 3. Geburtstag solche Milch getrunken?

In den letzten 12 Monaten zum ersten Mal ⇒ weiter mit Frage 7!

Auch schon vor dem 3. Geburtstag ViE05

6. Haben Sie am Umgang mit der Kuhmilch vom Bauernhof in den
letzten 12 Monaten in Ihrer Familie irgendetwas verändert (also
z. B. beim Abkochen, Lagern, Entrahmen etc.)?

Ja ViE06

Nein ⇒ weiter mit Frage 14!

7. Wenn Sie Ihrem Kind Kuhmilch direkt vom Bauernhof geben,
handelt es sich dann stets um eine frische Milch (d. h. am selben
Tag gemolken), oder geben Sie auch solche Milch(getränke), die
vorher schon einige Tage z. B. im Kühlschrank aufbewahrt
wurde(n)?

Ausschließlich frisch gemolkene Milch ⇒ weiter mit Frage 10!

Teilweise frisch gemolkene Milch, teilweise nach
vorheriger Lagerung im Kühlschrank oder in der
Speisekammer

ViE07

Ausschließlich im Kühlschrank oder in der
Speisekammer über mindestens 24 Stunden
gelagerte Milch

0155369515

8. Wenn Sie die Milch vorher im Kühlschrank oder in der Speisekammer länger als einen Tag aufbewahren - bewahren Sie sie dort als Rohmilch oder in abgekochtem Zustand auf?

- Rohmilch ViE08
 Nach vorherigem Abkochen

9. Wenn Sie die Milch im Kühlschrank oder in der Speisekammer aufbewahrt haben, ist Ihnen gelegentlich aufgefallen, dass die Milch in dieser Zeit verdorben wäre (z. B. sauer geworden)?

- Nein, nie
 Ja, aber selten ViE09
 Ja, häufig

10. Haben Sie diese Milch in den letzten 12 Monaten abgekocht, bevor Sie sie Ihrem Kind gegeben haben?

- | | Ja | Nein | |
|-----------------|--------------------------|-------------------------------------|----------|
| Im Sommer | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | ViE10_01 |
| Im Winter | <input type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | ViE10_02 |
- Wenn sowohl Sommer als auch Winter mit "nein" beantwortet wurden, bitte weiter mit Frage 13*

11. Wenn Sie die Milch abkochen, lassen Sie diese dann nur kurz aufwallen oder kochen Sie sie über längere Zeit?

- Ich lasse die Milch länger kochen ⇒ weiter mit Frage 13!
 Ich lasse die Milch nur kurz aufwallen ViE11

12. Lassen Sie die Milch nach dem Aufwallen

- Rasch abkühlen (z. B. im kalten Wasserbad oder im Kühlschrank) .. ViE12
 Langsam abkühlen (d. h. bei normaler Raumtemperatur)

5309369511

13. Schöpfen Sie üblicherweise den Rahm ab, bevor Sie die Milch Ihrem Kind geben?

Ja

ViE13

Nein

14. Hat Ihr Kind in den letzten 12 Monaten sonstige Kuhmilch oder Ziegenmilch getrunken?
Bitte berücksichtigen Sie dabei auch Kakao und andere Milchgetränke.

	Ja	Nein	
Vorzugsmilch	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	ViE14_01
pasteurisierte Frischmilch (Kuhmilch)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	ViE14_02
H-Milch	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	ViE14_03
Zubereitungen aus Milchpulver (Kuhmilch)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	ViE14_04
Nicht-pasteurisierte Ziegenmilch	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	ViE14_05

extra variable for Swiss and France:

ViE14a

15. Welchen Fettgehalt hat die Kuhmilch, die Ihr Kind üblicherweise trinkt?

	Ja	Nein	
Ca. 3,5 %	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	ViE15_01 / ViE15_01_fr
2,5 bis < 3,5 %	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	ViE15_02
1,5 bis < 2,5 %	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	ViE15_03
Unter 1,5 %	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	ViE15_04

X. Fragebogenauszüge zur Definition der Variable „Asthmasymptome“ (4,5 Jahre)

2715369519

Es folgen Fragen zu pfeifenden und keuchenden Atemgeräuschen.
Mit *pfeifenden Atemgeräuschen* meinen wir ein pfeifendes Geräusch, das aus dem Brustkorb kommt, aber nicht geräuschvolles Atmen durch die Nase.

20. Wie häufig hatte Ihr Kind in den letzten 12 Monaten pfeifende oder keuchende Atemgeräusche?

- Nie 1 ⇒ weiter mit Frage 30!
- Seltener als einmal pro Monat 2
- Einmal pro Monat 3 Vi20
- Mindestens zweimal pro Monat 4

21. Wenn Ihr Kind pfeifende oder keuchende Atemgeräusche hat - wie lange haben diese in den letzten 12 Monaten üblicherweise angehalten?

- Meist wenige Stunden bis maximal einen Tag 1
- Normalerweise 2 - 3 Tage 2
- Meist 4 - 6 Tage 3 Vi21
- Meist 1 - 2 Wochen 4
- Meist mehr als 2 Wochen 5

22. Ist das Kind zwischen diesen Episoden völlig beschwerdefrei?

- Ja 1 ⇒ weiter mit Frage 24!
- Nein 2 Vi22

1472369518

23. Das Kind leidet zwischen diesen Episoden unter ...

	Ja	Nein	
Husten nachts	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	Vi23_01
Husten bei Anstrengung	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	Vi23_02

24. Wie häufig hatte Ihr Kind in den letzten 12 Monaten pfeifende oder keuchende Atemgeräusche, ohne dass es erkältet war?

Nie	<input type="checkbox"/> 1	⇒ weiter mit Frage 28!
Seltener als einmal pro Monat	<input type="checkbox"/> 2	
Einmal pro Monat	<input type="checkbox"/> 3	Vi24
Mindestens zweimal pro Monat	<input type="checkbox"/> 4	

25. Hatte Ihr Kind in den letzten 12 Monaten nachts pfeifende oder keuchende Atemgeräusche, ohne dass es erkältet war?

Ja.....	<input type="checkbox"/> 1	Vi25 / Vi25fr
Nein	<input type="checkbox"/> 2	⇒ weiter mit Frage 27!

26. Wie häufig ist Ihr Kind in den letzten 12 Monaten nachts wegen pfeifender oder keuchender Atemgeräusche aufgewacht?

Seltener als einmal pro Monat oder nie	<input type="checkbox"/> 1	
Einmal pro Monat	<input type="checkbox"/> 2	Vi26
Mindestens zweimal pro Monat	<input type="checkbox"/> 3	



3324369516



31. Welche Medikamente waren dies?

Bitte geben Sie den Markennamen möglichst genau an!

1.

V31_C

2.

V31_C

3.

V31_C

32. Erhält Ihr Kind solche Medikamente gegen pfeifende oder keuchende Atemgeräusche

nur bei besonders schweren Phasen solcher Atemgeräusche..... 1

bei (fast) jeder Phase pfeifender oder keuchender Atemgeräusche..... 2

V32

sowohl während akuter Phasen derartiger Geräusche als auch vorbeugend 3