

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln  
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

# **Muttermilch und ihre Wirkung auf neuronales Wachstum *in vitro***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Julian Eric Kaps  
aus Berlin

promoviert am 28. Mai 2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

Druckjahr 2024

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Professor Dr. rer. nat. B. Brachvogel

2. Gutachterin: Privatdozentin Dr. med. A. Kribs

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.<sup>1</sup>

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Sammlung von Milchproben erfolgte ohne meine Mitarbeit in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin unter der Verantwortung von Herrn Dr. Titus Keller.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Prof. Bent Brachvogel und seiner Arbeitsgruppe von mir selbst ausgeführt und ausgewertet worden.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Messergebnisse der Massenspektrometrie wurden nach meiner Probenvorbereitung im Labor der Proteomics Facility des CECAD Köln ermittelt.

Diese Arbeit wurde durch ein Forschungsstipendium des Köln Fortune Programms gefördert.

Die ethische Unbedenklichkeit der Nutzung von menschlichem Biomaterial in dieser Arbeit wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln bestätigt (EK-MED 15-368).

## Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 12.10.2023

Unterschrift: .....

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die die Umsetzung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Bent Brachvogel und seiner gesamten Arbeitsgruppe, insbesondere den wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern Frau Dr. Veronica Georgieva, Frau Dr. Tatjana Holzer, Herrn Dr. Björn Bluhm, Frau Dr. Kristina Probst, Herrn Mark Auler und Frau Dr. Julia Etich. Ohne die stets geduldige und immer gut gelaunte Einführung in die Laborforschung, genauso wie das immer konstruktive Troubleshooting wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Die vielen Stunden an der Bench, im Seminar und in der Zellkultur werden mir immer, und meistens in guter Erinnerung bleiben. Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Titus Keller, der mich in das Projekt aufgenommen und mir erste Kontakte mit der Neonatologie ermöglicht hat. Mit seiner Begeisterungsfähigkeit und Leidenschaft für die Forschung und für die Pädiatrie hat er meinen beruflichen Weg maßgeblich beeinflusst und wird immer ein großes Vorbild für mich sein. Natürlich gilt ein herzlicher Dank auch meinen Eltern, die mich immer unterstützt und mein Studium möglich gemacht haben.

# **Inhaltsverzeichnis**

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>5</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>6</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
2.1. Der frühgeburtliche Hirnschaden	7
2.2. Neuroprotektive Therapieansätze	9
2.3. Zusammensetzung und Eigenschaften von Muttermilch	11
2.4. Zielsetzung	13
<b>3. PUBLIKATION</b>	<b>14</b>
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>19</b>
4.1. Einordnung der Ergebnisse in die aktuelle Forschungslage	20
4.2. Bedeutung der Muttermilchgabe auf der neonatologischen Intensivstation	21
4.3. Limitationen und Ausblick	22
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>23</b>

## Abkürzungsverzeichnis

CECAD	„Cluster of Excellence Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases“ an der Universität zu Köln
BDNF	brain derived neurotrophic factor
CDH1	Cadherin-1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Epo	Erythropoetin
HIE	Hypoxisch-Ischämische Enzephalopathie
HMO	Humane Milch-Oligosaccharide
KiGGS	Kinder- und Jugendgesundheits-Survey
miRNA	Micro-Ribonukleinsäuren
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäuren
MSC	Mesenchymale Stammzellen
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
NRP1	Neuropilin-1
PAM	Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase
PLOD3	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
RNA	Ribonukleinsäure
SDCBP	Syntenin-1
sIgA	Sekretorisches Immunglobulin A
SPARCL1	SPARC-like protein 1
SSW	Schwangerschaftswoche
TNC	Tenascin-C
VEGF	Vascular endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization

## 1. Zusammenfassung

Frühgeborene Kinder haben ein hohes Risiko für schwerwiegende Hirnblutungen und neurokognitive Beeinträchtigungen. Muttermilch setzt sich im klinischen Alltag in der Ernährung von Frühgeborenen immer weiter durch, gleichzeitig mehren sich die Hinweise auf ihre direkten neuroprotektiven Eigenschaften, insbesondere von Kolostrum (der Milch der ersten fünf Tage). Ziel dieser Arbeit war es, diese experimentell genauer zu untersuchen. Hierfür wurden Milchproben von stillenden Müttern zu unterschiedlichen Zeitpunkten gesammelt und aus ihnen die wässrige Phase mit den in der Muttermilch enthaltenen Proteinen gewonnen (Skim Milk). Zur Beurteilung der Auswirkung auf neuronales Wachstum wurden explantierte Riechhirne von Mäusen mit der Skim Milk versetzt und mehrere Tage kultiviert. Die Wirkung von Kolostrum wurde mit der von reifer Milch (ab der zweiten Woche) verglichen. Hier konnte ein signifikant verstärktes Neuritenwachstum durch das Kolostrum belegt werden. In weiteren Versuchen zeigte sich sogar eine weitgehend dosisunabhängige Wirkung, als Hinweis auf einen eher durch Wachstumsfaktoren als durch Nährstoffe bedingten Effekt. Zur Identifizierung von möglicherweise verantwortlichen Proteinen im Kolostrum wurden vergleichende massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt. Dabei waren 21 Proteine im Kolostrum signifikant angereichert, von denen acht in einem Zusammenhang mit neuronalem Wachstum stehen. In dieser Arbeit konnte die wachstumsfördernde Wirkung von insbesondere früher Muttermilch auf neuronales Gewebe unter Laborbedingungen gezeigt werden. Weiterhin wurden im Kolostrum Proteine identifiziert, die dessen Wirkung bedingen könnten. Diese Ergebnisse deuten eine bioaktive Rolle des Kolostrums für die Hirnentwicklung Frühgeborener an.

Die Bedeutung der nasopharyngealen Exposition mit Muttermilch sollte daher weiter untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit konnten im Juli 2023 in *Pediatric Research* veröffentlicht werden, die Publikation findet sich im Anhang.

## 2. Einleitung

Bei frühen und komplizierten Geburten stellen Hirnschäden gefürchtete Folgen dar und da es an Therapien mangelt, sind die potenziellen langfristigen Auswirkungen auf das Leben der betroffenen Kinder umso einschneidender.

Gleichzeitig mehren sich die Hinweise auf neuroprotektive Effekte durch die (intranasale) Gabe von Wachstumsfaktoren und Stammzellen. Diese sind unter anderem in der Muttermilch vorhanden und stehen so den Kindern zur Verfügung.

Klinische und beobachtende Studien geben ermutigende Hinweise auf den Einfluss von Muttermilch auf die Gehirnentwicklung, sie sind jedoch schwer zu kontrollieren und unterliegen einer Vielzahl von Variablen. Es fehlte bisher an Erkenntnissen zur direkten Wirkung von Muttermilch auf neuronales Wachstum.

### 2.1. Der frühgeburtliche Hirnschaden

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert Frühgeburtlichkeit mit der Geburt eines lebenden Kindes vor der abgeschlossenen 37. Schwangerschaftswoche<sup>1</sup>. Die weltweite Rate an Frühgeburten liegt bei 7-14%, das entspricht etwa 15 Millionen frühgeborenen Kindern jedes Jahr. Daten aus dem Kinder- und Jugendgesundheits-Survey (KiGGS) legen laut Weichert et al. eine Frühgeburtenrate von 11,6% für Deutschland nahe, Tendenz steigend<sup>2</sup>. Selbst bei ausschließlich gesunden Einlingsschwangerschaften ohne Risikofaktoren fand eine internationale Studie im Auftrag der WHO Frühgeburtenraten von 7,5% weltweit und 3,6% für Deutschland<sup>3</sup>. Dabei ist die vorzeitige Beendigung der Schwangerschaft und damit des intrauterinen Wachstums nicht nur keine seltene, sondern auch keine ungefährliche Situation. Etwa vier Millionen Kinder sterben weltweit jährlich innerhalb der ersten vier Lebenswochen, der sogenannten Neugeborenenperiode. Mit einem Anteil von 28% stellt die Frühgeburtlichkeit die häufigste direkte Ursache dar<sup>4</sup>. Laut WHO starben allein 2017 dadurch 878.000 Neugeborene<sup>5</sup>. Der überwiegende Anteil dieser Tode kommt durch mangelnde Hygiene und fehlende prä- sowie perinatale Betreuung in Entwicklungsländern zustande<sup>4</sup>.

Doch auch unter modernsten medizinischen Voraussetzungen lassen sich häufige Komplikationen wie das Atemnotsyndrom des Frühgeborenen, die Nekrotisierende Enterokolitis (NEC), Hirnschädigungen oder die Frühgeborenenretinopathie beobachten<sup>6-8</sup>. Die typischen Hirnschädigungen bei Frühgeborenen und die daraus folgenden neurologischen Beeinträchtigungen wurden von Volpe 2009 unter dem Begriff der Frühgeborenen-Enzephalopathie zusammengefasst<sup>7</sup>. Ursächlich spielen einerseits Hirnblutungen in der germinalen Matrix sowie der Ventrikel und andererseits die Periventrikuläre Leukomalazie (PVL) eine Rolle.



Die germinale Matrix bezeichnet einen Bereich unterhalb der Seitenventrikel, in dem Nervenvorläuferzellen entstehen, die im Laufe der Embryonalentwicklung zur Hirnrinde migrieren, um dort auszudifferenzieren. Das Gefäßnetz in diesem gut durchbluteten Areal ist allerdings anfällig für Blutdruckschwankungen und Noxen. So können Blutdruckspitzen zu einer mechanischen Läsion der Gefäße führen, während bei Entzündungsprozessen (z.B. im Rahmen einer Chorioamnionitis) chemische Noxen in Form von Zytokinen gebildet werden. Hypoperfusionen und Azidosen können die Gefäßarchitektur durch die Entstehung von Ischämien schwächen und ebenfalls zu Hirnblutungen führen. Die Folgeerscheinungen derartiger Hirnblutungen hängen stark von der Ausdehnung ab. Während bei kleinen Läsionen neurologische Auffälligkeiten selten sind, treten sie bei intraventrikulären Blutungen in etwa einem Drittel der Fälle auf und bei Beteiligung des Hirnparenchyms sind mehr als die Hälfte der überlebenden Kinder von langfristigen Einschränkungen betroffen <sup>9</sup>.

Bei der PVL ist eine Minderversorgung oder ein Überangebot des Gewebes mit Sauerstoff ursächlich. Durch die spezielle Gefäßversorgung des unreifen Gehirns gehört ein Bereich in der weißen Substanz nahe der Seitenventrikel (periventrikulär) zu den Endstromgebieten mehrerer Hirnarterien. Kommt es vor, unter, oder kurz nach der Geburt zu einem Mangel an Blut oder Sauerstoff, ist dieser Bereich besonders betroffen. Bei unreifen Kindern sind 90% der Oligodendrozyten in der weißen Substanz noch im Vorläuferstadium und nicht funktionsfähig. Sie besitzen noch keine funktionierende Superoxid-Dismutase und gehen bei Kontakt mit Sauerstoffradikalen in die Apoptose <sup>10</sup>. So sorgen sowohl ein Mangel an Sauerstoff als auch ein erhöhter Sauerstoffpartialdruck (etwa im Rahmen einer maschinellen Beatmung des Frühgeborenen) zu Schädigungen an den myelinproduzierenden Oligodendrozyten. Diese Schäden führen langfristig zu nekrotischen und zystischen Läsionen <sup>11</sup>. Etwa 60-100% der Überlebenden entwickeln eine Infantile Zerebralparese mit dauerhaften Lähmungen oder spastischen Paresen <sup>12</sup>.

Die sogenannte Hypoxisch-Ischämische Enzephalopathie (HIE) ist eine Folge perinataler Asphyxie und kommt auch bei Reifgeborenen vor, Frühgeburtlichkeit stellt allerdings einen Risikofaktor für Asphyxie dar. Hierbei führt ein Sauerstoffmangel oder eine Ischämie zu einer Azidose und Schädigung von Organen, die Folge ist eine gestörte Adaptation des Kindes nach Geburt <sup>13</sup>. Während sich die meisten Organe von der kurzzeitigen Ischämie und Azidose gut erholen können, ist das Gehirn von der Asphyxiefolge HIE besonders bedroht. Nach der primären Schädigung durch die Ischämie erfolgt ein Reperfusionsschaden aufgrund freier Sauerstoffradikale und proinflammatorischer Mediatoren. Ein sekundäres Energieversagen durch lokale Laktatakkumulation beginnt bereits innerhalb weniger Stunden und erreicht seinen Höhepunkt nach 24-72 Stunden. Insgesamt führt die HIE zu fokalen und diffusen Schäden an der grauen Substanz sowie globalem Hirnvolumenverlust <sup>9,14</sup>. Die Prävalenz der HIE liegt unter Reifgeborenen bei 0,1-0,3%, unter Frühgeborenen ist sie mit etwa 4% jedoch

deutlich höher <sup>15,16</sup>. Die Symptomatik kann sich als Infantile Zerebralparese präsentieren oder sehr viel später durch Aufmerksamkeitsdefizit- und Autismusspektrumstörungen auffallen <sup>17</sup>. Insgesamt tragen etwa ein Drittel aller Frühgeborenen neurokognitive und motorische Beeinträchtigungen davon <sup>18</sup>. Frühgeburtlichkeit stellt somit insgesamt einen großen Risikofaktor für langfristige psychomotorische Störungen dar <sup>19</sup>, und es besteht ein Bedarf an weiteren Konzepten zum Management dieser Komplikationen <sup>20-22</sup>.

## **2.2. Neuroprotektive Therapieansätze**

Frühgeburtlichkeit und Asphyxie gelten als größte Risikofaktoren für den frühkindlichen Hirnschaden, ihre Prävention und ihr optimales Management stehen daher an erster Stelle <sup>23,24</sup>. Die klinische Ausprägung einer derartigen Hirnschädigung wird oft erst ab dem zweiten Lebensjahr deutlich. Zu diesem Zeitpunkt kommt eine prophylaktische, neuroprotektive oder neuroregenerative Therapie zu spät, durch die multidisziplinären Bemühungen von u.a. Physiotherapeuten, Ergotherapeuten und Logopäden soll eine möglichst eigenständige Alltagsbewältigung erzielt werden <sup>25</sup>. Zahlreiche Ansätze, vor einer drohenden Frühgeburt prophylaktisch einzugreifen oder nach einem hypoxisch-ischämischen Insult direkt therapeutisch zu intervenieren, werden daher stark erforscht.

Als einzige gut etablierte Intervention gilt die therapeutische Hypothermie, bei der das Kind innerhalb von 6 Stunden nach Geburt für 72 Stunden bei einer Temperatur von 33-35°C gekühlt wird. Ein Cochrane Review aus dem Jahr 2013 zeigte, dass durch diese Vorgehensweise bei Reifgeborenen mit HIE eine signifikante Reduktion von Tod, schwerer Behinderung und infantiler Zerebralparese erreicht werden konnte <sup>26</sup>.

Als einzige gut etablierte Präventionsmaßnahme gilt die pränatale Gabe von Steroiden bei erwarteter Frühgeburt. Dies dient hauptsächlich der Induktion der Lungenreife, es konnte jedoch zusätzlich eine deutliche Reduktion von Hirnblutungen und perinatalen Todesfällen gezeigt werden <sup>27</sup>. Die Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe empfiehlt weiterhin in ihrer aktuellen Leitlinie „Prävention und Therapie der Frühgeburt“ sowohl die pränatale Magnesiumgabe als auch ein verzögertes Abnabeln zur Neuroprotektion <sup>28</sup>.

Für die Gabe von Magnesiumsulfat bei Frauen, die voraussichtlich vor der 32. Schwangerschaftswoche (SSW) entbinden werden, konnte eine Verringerung des Risikos für eine infantile Zerebralparese beim Kind nachgewiesen werden <sup>29,30</sup>. Auch das verzögerte Abklemmen der Nabelschnur (für bis zu 180 Sekunden) zeigte sich in einem Cochrane Review von 2012 als vorteilhaft: Die Inzidenz von Hirnblutungen war ebenso rückläufig wie die der Transfusionsbedürftigkeit und das Risiko einer NEC <sup>31</sup>. Eine aktuelle Studie musste hingegen abgebrochen werden, da das Ausstreichen der Nabelschnur im Vergleich zum verzögerten Abklemmen bei Frühchen vor der 27. SSW zu signifikant häufigeren Hirnblutungen geführt

hatte <sup>32</sup>. Studien zur prophylaktischen Gabe von nichtsteroidalen antiinflammatorischen Medikamenten zeigten für Indometacin kurzfristige Verbesserungen in der Inzidenz der schweren Hirnblutung, jedoch ohne Effekte auf das Überleben oder die langfristige neurologische Entwicklung <sup>33</sup>. Für Ibuprofen konnten keine Auswirkungen auf das Outcome bewiesen werden <sup>34</sup>. Unklar ist die derzeitige Studienlage zur prophylaktischen Verabreichung von humanem rekombinantem Erythropoetin (Epo). Ein Cochrane Review kam 2017 zu dem Schluss, Epo verringere die Inzidenz von Hirnblutungen, PVL, sowie NEC in Frühgeborenen <sup>35</sup>, und auch Fischer et al. fanden eine verbesserte neurokognitive Entwicklung von Frühgeborenen noch im zweiten Lebensjahr <sup>36</sup>. Andere Studien sahen keinen Effekt im Vergleich zu Placebo <sup>37</sup>, und eine Gruppe fand in einem Mausmodell mit Hirnschädigung sogar Hinweise auf einen aggravierten Verlauf durch Epo <sup>38</sup>. Auch Laktoferrin, eines der Hauptproteine in der Muttermilch, zeigte positive Auswirkungen auf die neurokognitive Entwicklung, und konnte in einem Tiermodell den herbeigeführten neonatalen Hirnschaden abmildern <sup>39-41</sup>. Das in diesem Kontext häufig an Ratten durchgeführte Schädigungsmodell wurde 1981 von Rice und Vannucci etabliert. Hierbei erfolgt eine einseitige Ligatur der Arteria carotis communis und eine anschließende Hypoxie bei 8% Sauerstoff für 3,5 Stunden. Im Anschluss ist eine einseitige Hirnschädigung mit Infarkt und Schädigung der weißen Substanz feststellbar <sup>42</sup>.

Weitere Substanzen, deren neuroprotektive Eigenschaften seit Jahren erforscht werden, beinhalten unter anderem Melatonin, Topiramid, Allopurinol, Vitamin E, Kreatin, Wachstumsfaktoren sowie die Beatmung mit Xenon <sup>43,44</sup>. Größere Aufmerksamkeit erfuhren in letzter Zeit Therapieansätze mit Mesenchymalen Stammzellen (MSC) und deren Extrazellulärvesikeln. Diese Stammzellen können auch aus adultem Gewebe gewonnen werden, besitzen spezifische Oberflächenantigene und haben Potential für vielfältige Differenzierung, Koloniebildung und Selbsterneuerung. Ihnen wird ein positiver Einfluss auf die Regeneration von geschädigtem Gewebe zugesprochen. Neue Studien zeigen allerdings, dass vor allem die Sekretionsprodukte der MSC hierfür verantwortlich sind. In diesen sogenannten Extrazellulärvesikeln befinden sich eine bisher noch nicht gänzlich geklärte Bandbreite an mRNA, miRNA, Fetten, Zytokinen und anderen Proteinen <sup>45</sup>.

So untersuchten Sisa et al die intranasale Gabe von Extrazellulärvesikeln aus MSC am Rice-Vannucci-Modell. Die Folge war eine reduzierte Mikrogliaaktivierung und damit eine verminderte Vernarbung des Hirngewebes, ein geringerer Zelltod sowie bessere Ergebnisse in Verhaltenstests im Vergleich zu einer Kontrollgruppe <sup>46</sup>. Eine südkoreanische Gruppe zeigte im Rattenmodell mit induzierter Hirnblutung verkleinerte Läsionen durch die intraventrikuläre Gabe („transplantation“) von MSC <sup>47</sup>. Dieselbe Gruppe beschrieb im Anschluss bereits 2014 und 2015 die klinische Anwendung von intraventrikulären Stammzellen aus menschlichem Nabelschnurblut bei frühgeborenen Kindern mit Hirnblutung <sup>48</sup>. Eine Kölner Gruppe

verabreichte Muttermilch, als natürliche Quelle von Laktoferrin, Wachstumsfaktoren, Stammzellen sowie deren Extrazellulärvesikeln, intranasal bei Frühgeborenen mit schweren Hirnblutungen und zeigte im Vergleich zu einer Kontrollgruppe einen Trend zu weniger schwerwiegenden zystischen Defekten im Verlauf <sup>49</sup>.

### **2.3. Zusammensetzung und Eigenschaften von Muttermilch**

Muttermilch ist die natürliche erste Ernährung des neugeborenen Kindes, die Milchproduktion (Laktation) beginnt durch eine Abnahme des Progesteronspiegels im Blut im Rahmen der Plazentalösung nach der Geburt des Kindes <sup>50</sup>. Muttermilch wird schon lange beforscht und ihr grundlegender Aufbau ist bekannt <sup>51</sup>. Doch moderne analytische Methoden und neue klinische Aspekte (wie der zunehmenden Versorgung von Frühgeborenen) sorgen für detailliertere Erkenntnisse und weitere Fragestellungen. Dabei stellt die Muttermilch kein einfaches Forschungsobjekt dar, sie ist komplex aufgebaut und dazu hochvariabel. Es finden sich Proteine, Fette und Kohlenhydrate, aber auch Zellen in der Muttermilch <sup>52,53</sup>. Schon die Frage nach dem Proteingehalt kann nicht allgemeingültig beantwortet werden, in einer Untersuchung an 2553 Milchproben zeigte sich ein Durchschnittsproteingehalt von 9mg/ml, die Streubreite war von 6,3mg/ml bis 14,3mg/ml (2,5. und 97,5. Perzentile) allerdings beträchtlich <sup>54</sup>. Große Schwankungen der Proteinmenge in der Literatur lassen sich zwar auch durch unterschiedliche Messmethoden erklären, denn oft wird der Stickstoffgehalt mit dem Proteingehalt gleichgesetzt. In Muttermilch sind jedoch etwa 25% des Stickstoffs nicht proteingebunden, sondern liegen in Form von Peptiden, freien Aminosäuren, DNA oder RNA vor <sup>55</sup>. Da die fettige Phase zur Untersuchung der Proteine meist durch Zentrifugation entfernt wird, bleibt ein (wenn auch mit unter einem Prozent kleiner) Anteil der Proteinfraction nicht in der wässrigen Phase erhalten <sup>56</sup>.

Den größten Einfluss auf die Zusammensetzung von Muttermilch hat aber sicherlich der Zeitpunkt der Probennahme. Sowohl durch das Laktationsstadium, also die Zeit seit dem ersten Stillen, als auch während des Stillvorgangs verändert sich die Zusammensetzung stetig <sup>57</sup>. Die Laktationsstadien werden unterteilt in die Milch der ersten fünf Tage (Kolostrum), die Milch ab dem 14. Tag (reife Milch) und die dazwischenliegende Übergangsmilch. Während eines Stillvorgangs werden Vormilch und Hintermilch unterschieden. Der Proteingehalt zeigt sich zu Beginn der Laktation im Kolostrum (mit ca. 1,8 mg/ml) am höchsten und sinkt dann ab dem dritten Monat auf etwa die Hälfte (mit ca. 0,9 mg/ml) <sup>57</sup>. Der Fettanteil ist über die Laktationsstadien hinweg stabil, zeigt jedoch vor allem während des Stillvorgangs eine Dynamik, er ist in der Hintermilch zwei- bis dreimal größer als in der Vormilch <sup>58</sup>.

In massenspektrometrischen Untersuchungen konnten über 400 Proteine in Muttermilch nachgewiesen werden, deren Funktionen allerdings nicht alle abschließend geklärt sind <sup>59</sup>. Die

Proteinfraktion lässt sich in Molkeproteine (unter den häufigsten sind Alpha-Laktalbumin, Laktoferrin, Albumin und Lysozym), Kaseine (Alpha-, Beta- und Kappa-Kasein) sowie Muzine unterteilen, wobei letztere ausschließlich in den Membranen der Milchfettmizellen zu finden sind<sup>55</sup>. Die Kaseine haben dabei am ehesten eine nährnde Funktion, viele der Molkeproteine unterstützen die Immunität, die Verdauung oder die Organentwicklung. Beispielsweise ist Laktoferrin als Eisentransportprotein ein Baustein in der Eisenversorgung des Kindes, zeigt aber auch antimikrobielle Effekte. Lösliche Immunglobuline wie sIgA schützen die Darmmukosa durch die Bindung von Pathogenen, und Wachstumsfaktoren unterstützen die Darmentwicklung<sup>60-63</sup>.

Der Fettgehalt beträgt durchschnittlich etwa 40 mg/ml, auch hier ist die Streuung von 18,4 bis 89 mg/ml breit<sup>54</sup>. Er ist über die Laktationsstadien hinweg stabil, zeigt jedoch vor allem während des Stillvorgangs eine Dynamik. So ist die Hintermilch zwei- bis dreimal fettreicher als die Vormilch<sup>58</sup>. Ölsäure stellt mit 30-40% den größten Anteil der Fettsäuren dar, gefolgt von Palmitin- und Linolsäure<sup>64</sup>. Langkettige ungesättigte Fettsäuren machen lediglich 2% aus. Insgesamt ist der Fettanteil für 40-55% des Energiegehalts der Muttermilch verantwortlich<sup>65</sup>. Neben den nutritiven Effekten stehen besonders langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren sowie Sphingomyeline im Verdacht, eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des Gehirns sowie des Auges zu spielen. Als Bestandteile von Zellmembranen und Myelinscheiden ist ein ausreichendes und diverses Angebot in der Ernährung zur Bildung und Funktionalität dieser Strukturen notwendig<sup>66-69</sup>. Bestimmte Fette, insbesondere Docosahexaensäure, scheinen auch einen direkten Einfluss auf Transkriptionsfaktoren zu haben und eine bessere Aktivierung von Photorezeptoren im Auge zu ermöglichen<sup>70</sup>.

Kohlenhydrate machen einen Anteil von etwa 70-90 mg/ml in der Muttermilch aus. Das Disaccharid Laktose hat daran den größten Anteil, von 56 mg/ml im Kolostrum steigt der Laktosegehalt auf 86,9 mg/ml in der reifen Milch. Oligosaccharide zeigen einen umgekehrten Trend und fallen von 20,9 mg/ml im Kolostrum auf 12,8 mg/ml in der reifen Milch. Monosaccharide haben den kleinsten Anteil und liegen durchweg bei <1 mg/ml<sup>54,71</sup>. Vor allem den Oligosacchariden (human milk oligosaccharides, HMO) wird eine zentrale Rolle im Schutz des frühkindlichen Darms zugesprochen. Sie sind zwar für das Kind nur schwer verdaulich, bieten aber Nahrung für bestimmte Bakterienarten und unterstützen so den Aufbau eines gesunden Mikrobioms. Weiterhin binden sie pathogene Erreger wie Viren, Bakterien, Pilze und Protozoen und sorgen auf diesem Weg für deren harmlose Ausscheidung<sup>72,73</sup>.

Einen weiteren hochvariablen Anteil der Muttermilch machen Zellen aus, Trend et al. fanden einen Mittelwert von 300.000 Zellen pro Milliliter Muttermilch<sup>74</sup>. Die größte Fraktion davon entfällt auf myoepitheliale Zellen sowie die milchproduzierenden Laktozyten aus der Brustdrüse selbst. Einen weiteren Anteil machen Leukozyten aus, die am ehesten aus dem Blutstrom der Mutter stammen und einen Teil der Leihimmunität ausmachen<sup>75</sup>.

Zurzeit besonders aktiv beforscht werden die in der Muttermilch nachgewiesenen Stammzellen, die Potential für pluripotente Differenzierung zeigen <sup>76</sup>. In einem Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass sich diese Stammzellen im Gehirn des gefütterten Tieres ansiedeln und zu neuronalen Strukturen ausdifferenzieren <sup>77</sup>.


#### **2.4. Zielsetzung**

Wir stellen die Hypothese auf, dass Muttermilch nicht nur einen nutritiven Effekt auf die Hirnentwicklung hat, sondern auch durch spezifische Proteine die neuronale Entwicklung direkt beeinflusst. In dieser Arbeit möchten wir in einem in-vitro Modell untersuchen, ob menschliche Muttermilch neuronales Wachstum fördern kann.

## SPECIAL ARTICLE OPEN



# Human preterm colostrum stimulates outgrowth in neurogenic tissue

 Julian Kaps<sup>1</sup>, Veronica S. Georgieva<sup>1,2</sup>, Laura Oberholz<sup>3</sup>, Angela Kribs<sup>3</sup>, Bent Brachvogel<sup>1,2</sup> and Titus Keller<sup>1,3</sup>  <sup>✉</sup>

© The Author(s) 2023

**BACKGROUND:** The olfactory bulb has a key role for nasal delivery of drugs to the brain by its access from the nasal mucosa and its connection to the subventricular zone. The aim of this study was to investigate the neuromodulatory capacity of human milk of premature infants on the olfactory bulb.

**METHODS:** Olfactory bulbs from P1 mice were embedded in a collagen I gel and incubated with DMEM supplemented with the aqueous phase of human colostrum (Col) of five mothers after very preterm birth, mature milk (Mat) of the same mothers or without supplement (Ctrl). After 7 days, the neurite outgrowth was quantified. Proteome analysis of the milk samples was performed using unlabeled mass spectrometry.

**RESULTS:** Outgrowth increased significantly in bulbs exposed to Col but not when exposed to Mat. Mass spectrometry revealed profound differences in the proteome of Col versus Mat. Among 21 upregulated proteins in Col were proteins involved in neurite outgrowth, axon guidance, neuromodulation and longevity.

**CONCLUSIONS:** A high bioactivity of human preterm colostrum on murine neonatal neurogenic tissue is demonstrated to be associated with a proteome profoundly differing from mature milk.

*Pediatric Research* (2023) 94:1906–1910; <https://doi.org/10.1038/s41390-023-02721-z>

**IMPACT:**

- The hypothesis has been raised that neonatal brain damage in a preterm infant could potentially be ameliorated by intranasal application of maternal breast milk.
- In an in-vitro model using neonatal murine olfactory bulb explants a significant stimulatory effect by human preterm colostrum is observed.
- Proteomics reveals upregulated neuroactive proteins in human colostrum compared to mature milk.
- A confirmation of this exploratory study would indicate that preterm colostrum stimulates neurogenic tissue.
- Early intranasal colostrum application might attenuate perinatal loss of neurogenic tissue thereby contributing to reducing complications such as cerebral palsy.

**INTRODUCTION**

Breast milk feeding of preterm infants is associated with less severe adverse neurodevelopmental outcome despite an increased risk for suboptimal weight gain, described as the apparent breastfeeding paradox.<sup>1</sup> It is known that human milk contains neurotrophins and other growth factors such as EGF.<sup>2</sup> Neurotrophins are known to modulate neurogenesis and their intranasal delivery mediates neuroprotective and regenerative effects in animal models of neonatal brain injury.<sup>3</sup> Specifically, in cases of severe intraventricular hemorrhage (IVH) in preterm infants new strategies are needed to protect the vulnerable brain during the high risk phase for loss of neurogenic tissue.<sup>4</sup> Considering the complex interactions during breastfeeding such as, oxytocine modulated maternal infant bonding promoting offspring cognitive development, it is difficult to evaluate the

isolated effect of the mothers' own milk (MOM) on neurocognitive development in a clinical study.

Therefore, an in-vitro model was needed to safely study the isolated effects of MOM on the neonatal brain and elucidate the role of its composition. We present an in vitro model using murine neonatal olfactory bulb (OB) explants to examine effects of human milk on neonatal neurogenic tissue.

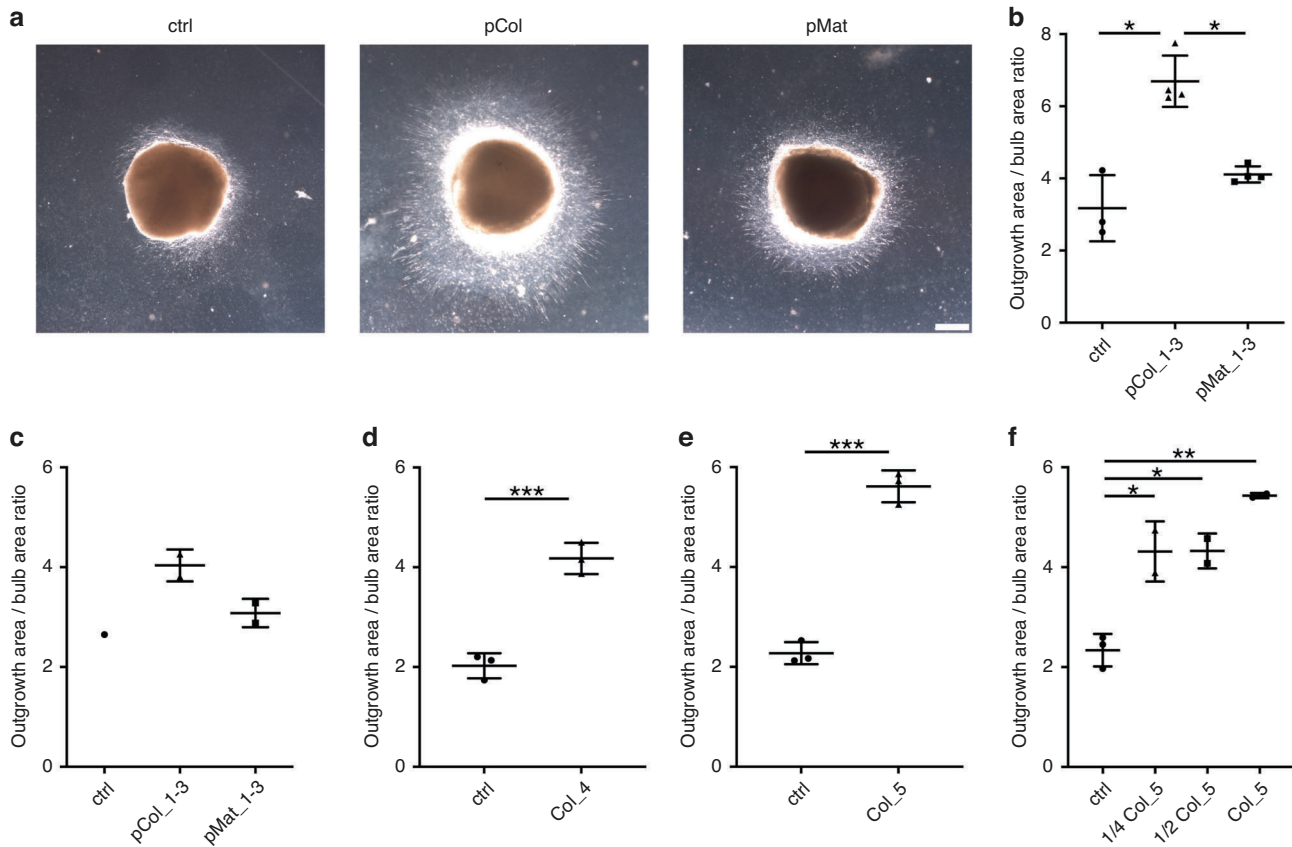
**METHODS****Milk preparation**

MOM samples were collected from five infants, born with gestational age 25 to 28 weeks at the neonatal center of the University Hospital of Cologne with informed consent and approval by the local Ethical board (EK 15–368).<sup>5</sup> Colostrum samples (2 ml) were collected before the onset of lactogenesis II confirmed by color, volume and electrolyte concentrations

<sup>1</sup>Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Medical Faculty of the University of Cologne, Experimental Neonatology, Cologne, Germany. <sup>2</sup>Center for Biochemistry, Medical Faculty of the University of Cologne, Cologne, Germany. <sup>3</sup>Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Center for Neonatology and Pediatric Intensive Care Medicine, Medical Faculty of the University of Cologne, Cologne, Germany. <sup>✉</sup>email: [titus.keller@uk-koeln.de](mailto:titus.keller@uk-koeln.de)

Received: 30 September 2022 Revised: 16 May 2023 Accepted: 15 June 2023

Published online: 11 July 2023



**Fig. 1** Stimulation of outgrowth by human milk. **a** Murine olfactory bulb explants were incubated without milk (ctrl), with colostrum (Col) and mature milk (Mat), and the outgrowth was analyzed by light microscopy after 7 days. Representative images are shown. Scale bar: 500  $\mu$ m. **b–f** Quantification of the neurite area to bulb area ratio is shown. Each graph represents one experiment with one litter of mice. **b, c** Pooled samples are from donor 1, 2 and 3. **d** Colostrum of donor 4. **e** Colostrum of donor 5 and **(f)** dilution experiment with colostrum of donor 5.

(90–105 h postnatally, sodium 21–29 mmol/l) and the mature milk samples (10 ml) collected 14 days postnatally. Within 4 h each sample was centrifuged at 16,000 g for 5 min to isolate the aqueous phase, which then was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . After thawing for the *in vitro* experiments, the colostrum samples of donor 1–3 (pCol) and the mature milk samples (pMat) were pooled. For confirmatory experiments, single colostrum samples (donors 4 and 5) were used.

#### Mice

C57BL/6N mice were used for the animal studies. All experiments were performed in accordance with the ethics guidelines of the German animal protection law. Institutional review board - Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen.

#### In vitro model for neurite outgrowth assessment

For neurite outgrowth assessment, collagen I gels were prepared freshly by adding rat tail collagen I (0.76 mg/mL, First Link UK Ltd., UK), ascorbic acid (0.61 mg/mL, Sigma-Aldrich, Germany) and NaOH (31 mM, VWR) to DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Olfactory bulbs were explanted from one litter of P1 C57BL/6N mice and each bulb was placed in 400  $\mu$ L collagen gel in 24-well plates. After polymerization of the gel at  $37^{\circ}\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ , 400  $\mu$ L DMEM either without any supplements or with 10% (v/v) pCol or pMat milk were carefully added. The bulbs were incubated for 7 days at  $37^{\circ}\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$  and analyzed with a stereo microscope (Nikon SMZ 1500, Japan). The ratio between neurite area and bulb area was determined using ImageJ software.

#### Mass spectrometry and Gene Ontology enrichment analysis

Approximately 50  $\mu$ g of protein per sample were reduced, alkylated and digested in Lys-C and trypsin. The samples ( $n=3$  biological replicates) were analyzed on a liquid-chromatography mass-spectrometer coupled to a nano-flow liquid chromatograph (Thermo Scientific) following standard

protocols. Peptides were identified by searching expected protein sequences in the UniProt Human database (71,931 entries, downloaded from Uniprot 16.6.2017) using MaxQuant software (version 1.5.3.8, <https://www.maxquant.org/>).

LFQ intensities were loaded into Perseus software (version 1.6.1.1, <https://www.maxquant.org/perseus>). A two sample Student's *t*-test was performed using permutation-based FDR estimation. Proteins with a *q*-value below 0.05 (26 in total) were considered significantly different between the two groups. Data were imported in InstantClue (version 0.5.34) for visualization by principal component analysis and volcano plot. Gene Ontology term analysis was performed according to the PANTHER Classification System (<https://geneontology.org>).

#### Statistical analysis

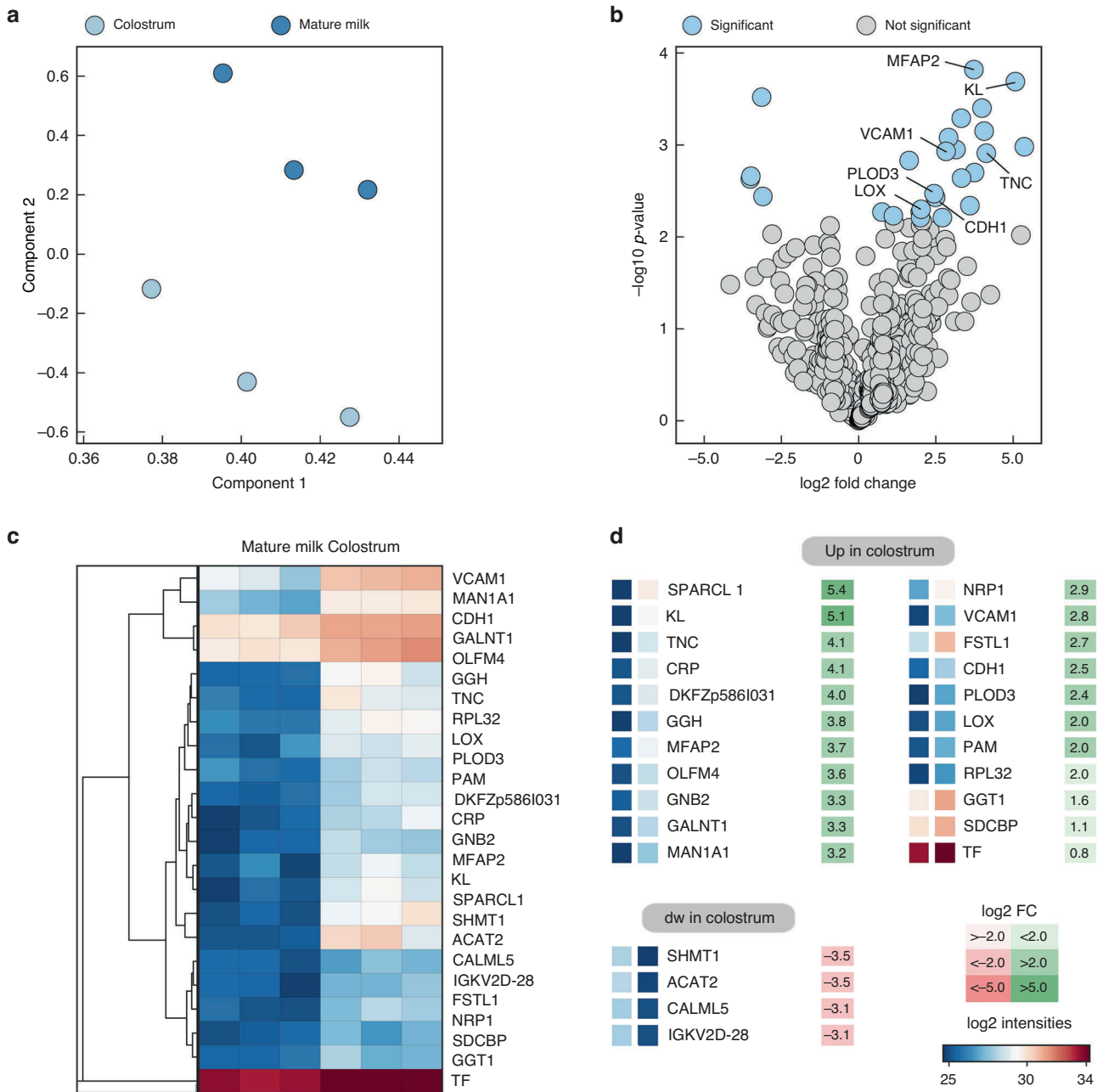
Significance between multiple groups was determined by one-way ANOVA analysis and subsequent Tukey's multiple comparisons test. For comparison of two groups, the unpaired *T*-Test, two-tailed, was used. *P*-values of  $p < 0.05$  (\*) were considered as significant. Mean values and standard deviations are shown in the graphs (GraphPad Prism, version 9.00).

## RESULTS

### Neurotrophic potential of human breast milk

Olfactory bulb (OB) explants were cultured for 7 days in the presence of pooled colostrum of three donors (pCol), pooled mature milk (pMat) or in medium without supplements (ctrl) (Fig. 1a). Outgrowth quantified by the ratio of neurite area to bulb area revealed a 2.1-fold increase in outgrowth in pCol-treated bulbs compared to control ( $p=0.021$ ), the outgrowth of pMat-treated cultures was 1.3-fold (ns) (Fig. 1b). This increase in outgrowth in the presence of colostrum was confirmed in 4





**Fig. 2 Proteome analysis of human breast milk samples.** Colostrum and mature milk samples were analyzed by mass spectrometry ( $n = 3$  per biological replicate). **a** Principal component analysis of the proteome dataset. Each circle represents an individual breast milk sample. **b** Volcano plot. Significant changes within the dataset are indicated (blue). Proteins with the highest fold change are annotated. **c** Heatmap of significantly regulated milk proteins. **d** List of up- and downregulated milk proteins sorted according to fold change.

additional litters and with colostrum of two further donors (Fig. 1c–f). Moreover, we demonstrated that the stimulatory effect on outgrowth was detectable in presence of lower concentrations of colostrum (Fig. 1f). The neurostimulatory effect was also shown in a live cell imaging experiment using the DNA-dye Hoechst 33,342. Here radial cell migration within the outgrowth area was observed associated with increased cell proliferation (Video suppl.). The results demonstrate that preterm human colostrum stimulates outgrowth out of the olfactory bulb significantly, including radial cell migration and proliferation.

**Mass spectrometry analysis of human breast milk components**  
Principal component analysis using mass spectrometry revealed substantial differences between the colostrum versus mature milk

used in our experiments (Fig. 2a). In total, 516 proteins were identified and among those, 26 differed significantly (Fig. 2b). 21 proteins were enriched in colostrum (Fig. 2d). The most highly upregulated proteins were hevin (5-fold), klotho (5-fold) and tenascin C (4-fold). A higher abundance of proteins involved in neuron axon guidance (neuropilin 1), in neuromodulation (syntenin 1), and cell adhesion (cadherin 1 and vascular cell adhesion molecule 1).

**Highly upregulated neuroactive proteins in Colostrum**

According to GeneOntology term analysis, most of these proteins are secreted extracellular space components. Five of these colostrum proteins are involved in synapse organization (neuropilin-1, cadherin-1, tenascin C, hevin and syntenin-1). Six are

involved in extracellular matrix organization (Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3, Microfibrillar associated protein 2, Cadherin-1, Vascular cell adhesion protein 1, Tenascin C, Lysyl oxidase).

## DISCUSSION

Our results show that human colostrum has a strong stimulatory effect on outgrowth of neurogenic tissue using the murine neonatal olfactory bulb explant system. A molecular signature of neuroactive proteins was identified in colostrum compared to mature milk by proteome analysis.

The effect of colostrum on the olfactory bulb tissue is remarkable since the OB is a neurogenic niche receiving neural stem cells from the subventricular zone (SVZ) via the rostral migratory stream (RMS). Scranton et al. demonstrated the relevance of the RMS for the intranasal route into the brain by proving the connection between the OB and the SVZ in both directions.<sup>6</sup> Intranasal neurotrophins induce neurogenesis in the murine SVZ.<sup>7</sup> Clinical trials on intranasal insulin have demonstrated efficiency and safety for intranasal delivery of growth factors into the brain in human adults.<sup>8</sup> Sanai et al. demonstrated the existence of the RMS in humans with strongest prominence in infancy.<sup>9</sup>

Here, the aqueous phase of human preterm colostrum induced the increased OB outgrowth significantly. The higher bioactivity of colostrum compared to mature milk is well known and mostly attributed to higher levels of immunoglobulins and growth factors. Neuroprotective effects by bovine colostrum in a rat model of intracerebral hemorrhage was reported by Kim et al. including significant suppression of apoptosis.<sup>10</sup> Our results suggest that colostrum after preterm birth might mediate a similar effect.

The milk proteomics revealed highly upregulated neuroactive proteins in colostrum. Among these, for the longevity hormone klotho increased plasma-levels are associated with improved cognitive performance in mice and humans.<sup>11</sup> Hevin is involved in the regulation of Insulin-like Growth Factor transport and uptake.<sup>12</sup> Neuropilin-1 plays versatile roles in the regulation of neurogenesis, angiogenesis, axon guidance, cell survival and remyelination and is important in tissue remodeling following brain injury.<sup>13</sup> Tenascin C is highly expressed in the extracellular matrix during development and in the adult central nervous system (CNS) in regions of active neurogenesis.<sup>14</sup> Soluble Vascular Adhesion Molecule-1 modulates the Blood Brain Barrier permeability. Follistatin-like 1 is involved in CNS development and Cadherin-1 in synapse development and plasticity. Sequential testing of the candidate proteins in the OB model might identify the main factor for the neuromodulatory effect, although the composition may be responsible.

Our observation is of high clinical relevance, since the increased bioactivity of MOM coincides with a high vulnerability of the neurogenic niche during the first postnatal days with the peak incidence for germinal matrix /IVH in very preterm infants. In a clinical study, fresh MOM which also contains living cells was applied intranasally to preterm infants after diagnosis of severe IVH and a trend for less severe residual brain defects at discharge was reported.<sup>15</sup> We hypothesize that an earlier intranasal exposure to fresh colostrum might increase beneficial effects on the brain.

In conclusion, our results suggest a high bioactivity of human preterm colostrum on murine neonatal neurogenic tissue associated with a proteome profoundly differing from mature milk. A better knowledge on the neuromodulatory effects of human colostrum for the neurogenic niche of preterm infants will help neonatologists to improve existing strategies and to develop new approaches to ameliorate neonatal brain injury.

## DATA AVAILABILITY

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author, T.K., upon reasonable request.

## REFERENCES

- Rozé, J.-C. et al. The apparent breastfeeding paradox in very preterm infants: relationship between breast feeding, early weight gain and neurodevelopment based on results from two cohorts, EPIPAGE and LIFT. *BMJ Open* **2**, e000834 (2012).
- Ballard, O. & Morrow, A. L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr. Clin. North Am.* **60**, 49–74 (2013).
- Scafidi, J. et al. Intranasal epidermal growth factor treatment rescues neonatal brain injury. *Nature* **506**, 230–234 (2014).
- Volpe, J. J. Commentary—Severe IVH: Time for newer, earlier interventions to prevent brain injury? *J. Neonatal-Perinat. Med.* **13**, 435–439 (2020).
- Keller, T. et al. Novel DRAQ5<sup>TM</sup>/SYTOX<sup>®</sup> Blue Based Flow Cytometric Strategy to Identify and Characterize Stem Cells in Human Breast Milk. *Cytometry B Clin. Cytom.* 9999/1–10 <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21748> (2018).
- Scranton, R. A., Fletcher, L., Sprague, S., Jimenez, D. F. & Digicaylioglu, M. The rostral migratory stream plays a key role in intranasal delivery of drugs into the CNS. *PLoS One* **6**, e18711 (2011).
- Jin, K. et al. Cerebral neurogenesis is induced by intranasal administration of growth factors. *Ann. Neurol.* **53**, 405–409 (2003).
- Benedict, C. et al. Intranasal insulin improves memory in humans: superiority of insulin aspart. *Neuropsychopharmacol. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* **32**, 239–243 (2007).
- Sanai, N. et al. Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* **478**, 382–386 (2011).
- Kim, S. E. et al. Neuroprotective effects of bovine colostrum on intracerebral hemorrhage-induced apoptotic neuronal cell death in rats. *Neural Regen. Res.* **7**, 1715–1721 (2012).
- Dubal, D. B. et al. Life extension factor klotho enhances cognition. *Cell Rep.* **7**, 1065–1076 (2014).
- Hambrock, H. O. et al. SC1/hevin. An extracellular calcium-modulated protein that binds collagen I. *J. Biol. Chem.* **278**, 11351–11358 (2003).
- Mecollari, V., Nieuwenhuis, B. & Verhaagen, J. A perspective on the role of class III semaphorin signaling in central nervous system trauma. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 328 (2014).
- Tucić, M., Stamenković, V. & Andjus, P. The extracellular matrix glycoprotein tenascin C and adult neurogenesis. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 674199–674211 (2021).
- Keller, T. et al. Intranasal breast milk for premature infants with severe intraventricular hemorrhage—an observation. *Eur. J. Pediatr.* <https://doi.org/10.1007/s00431-018-3279-7> (2018).

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the CECAD Proteomics Facility and Dr. Stefan Müller PhD for advice and contribution towards the execution and analysis of the proteomics experiment. We thank the mothers of the study patients for participation, Prof. Mats Paulsson for his valuable support throughout the project, to Dr. Björn Bluhm for valuable advice, to Denise Smorra for her help during establishing the model and Dr. Christina Comeau for english-proofreading.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.K. and T.K. conceived the presented idea and performed the experiments. V.G. helped with the data analysis, drafting of the figures and writing of the manuscript. A.K. supervised the clinical part and sparked the initial idea. B.B. supervised the experimental part with critical support. T.K. wrote the manuscript in consultation with V.G. and J.K. L.O. helped drafting the manuscript. All authors provided critical feedback and helped shape the research, analysis, and manuscript.

## FUNDING

Supported by the Koeln Fortune Program/ Faculty of Medicine, University of Cologne. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

## COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

**ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE**

The study was approved by the local Ethics Committee of the University of Cologne (No. 15–368), and all participants provided informed written consent.

**ADDITIONAL INFORMATION**

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to Titus Keller.

**Reprints and permission information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023

## 4. Diskussion

Muttermilch stellt die natürliche erste Ernährung für das neugeborene Kind dar und es besteht Konsens, dass sie bei fehlender Kontraindikation in erster Linie als Nahrungsquelle für das Kind dienen sollte <sup>85</sup>. Die nicht-nutritiven Effekte der Muttermilch konnten in Beobachtungsstudien bereits vermutet werden, der Nachweis einer direkten Wirkung auf neuronale Entwicklung fehlte jedoch bislang. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die in der Muttermilch enthaltenen Proteine ein Zellwachstum in murinen Riechhirnen stimulieren. Die frühe Milch der ersten fünf Tage, das Kolostrum, zeigte dabei einen deutlich stärkeren Effekt auf das neuronale Wachstum als die reife Milch, die ab der zweiten Woche zur Verfügung steht. In vergleichenden massenspektrometrischen Untersuchungen der Proteinzusammensetzung dieser beiden Milchstadien zeigten sich erhöhte Proteine im Kolostrum, die an Prozessen der neuronalen Entwicklung beteiligt sind und für diesen Unterschied verantwortlich sein könnten:

*SPARC-like protein 1* (SPARCL1, auch als Hevin bekannt) wird mit seinen vielseitigen Expressionsorten im Körper vor allem als regulatives Protein der extrazellulären Matrix angesehen <sup>87</sup>, fördert jedoch auch dendritisches Wachstum, sowie die Entwicklung von exzitatorischen Synapsen <sup>88-90</sup>. Es wurde erstmalig strukturell an unserem Institut für Biochemie beschrieben <sup>91</sup>. Genau wie anderen Proteinen der extrazellulären Matrix werden auch *Tenascin-C* (TNC) vielfältige Funktionen zugeschrieben. Spielt es während der Embryonalentwicklung eine große Rolle bei der Ausbildung des zentralen Nervensystems <sup>92</sup>, kommen ihm im erwachsenen Organismus Aufgaben in dichtem Bindegewebe wie Knorpel und Knochen, in Reparaturvorgängen nach Gewebeschädigung und in der Vermittlung von Immunantworten zu <sup>93,94</sup>.

*Neuropilin-1* (NRP1) ist ein Transmembranprotein, das als Rezeptor für Semaphorin Einfluss auf die axonale Wegfindung hat <sup>95</sup>. Ebenso bindet es den *Vascular endothelial Growth Factor* (VEGF) und moduliert sowohl Angiogenese als auch Gefäßpermeabilität <sup>96</sup>. Im Rahmen der Pandemie mit dem neuartigen Coronavirus Sars-Cov-2 wurde NRP1 als Vermittler für die Aufnahme des Virus in die Zellen des olfaktorischen Epithels bekannt <sup>97</sup>. Es wurden jedoch nur sehr wenige vertikale Transmissionen beobachtet und laut klinischen Studien stellt das Stillen des Neugeborenen auch bei Sars-Cov-2 positiver Mutter die Ernährung der Wahl dar <sup>98,99</sup>.

*Cadherin-1* (CDH1) ist ebenfalls ein Transmembranprotein, das als calciumabhängiges Zelladhäsionsmolekül fungiert. Es weist Funktionen in der Organisation von Geweben während der Embryonalentwicklung auf und eine abgeschwächte Aktivität begünstigt die Invasion von Tumorzellen <sup>100,101</sup>.

*Syntenin-1* (SDCBP) ist ein Gerüstprotein mit Bindungsstellen für viele Bestandteile des Zytoskeletts und steht auch in einem räumlichen und funktionellen Zusammenhang mit CDH1. Physiologischerweise sorgt es für Zell-Zell-Verbindungen, unterstützt aber auch die Myelinisierung von Nerven und die Migration von Oligodendrozyten im Rahmen der Synapsenorganisation<sup>102</sup>. *Syntenin-1* interagiert ebenso mit Wachstumshormonen wie *insulin like growth factor* und *transforming growth factor beta* und wird über diese mit der Metastasierung von verschiedenen Karzinomen in Verbindung gebracht<sup>103,104</sup>.

Das Enzym *Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase* (PAM) katalysiert die Alpha-Amidierung von Peptiden. Dies ist eine weitverbreitete Form der posttranslationalen Modifikation, die hauptsächlich bei der Aktivierung und Stabilisierung von Neurotransmittern, Hormonen und Wachstumsfaktoren zu finden ist<sup>105,106</sup>. *Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3* (PLOD3), ebenfalls ein Enzym, befindet sich membrangebunden am rauen endoplasmatischen Retikulum und spielt eine wichtige Rolle in der Biosynthese von Kollagenen. Eine fehlerhafte Funktion von PLOD3 wird mit komplexen Bindegewebserkrankungen in Zusammenhang gebracht, während bei Überexpression des PLOD3-Gens eine erhöhte Metastasierungsrate beispielsweise beim Lungenkarzinom gesehen wurde<sup>107,108</sup>.

Ein weiterer in unserer Proteom-Analyse hervorstechender Kandidat ist das Transmembranprotein *Klotho*. Dieses wird überwiegend in der Niere, aber auch im Plexus choroideus im Gehirn exprimiert und kann ebenso als lösliches Hormon vorliegen. Aufmerksamkeit erregte es erstmals durch seinen Einfluss auf die Lebensspanne: Genetisch veränderte Mäuse ohne dieses Protein zeigten Merkmale des Alterns wie Hautatrophie und Atherosklerose<sup>109</sup>, während die Überexpression zu einer deutlich verlängerten Lebensspanne führte<sup>110</sup>. Auch im Gehirn scheint lösliches *Klotho* einen Einfluss zu haben. Es wird mit verbesserter Kognition und Myelinisierung sowie einem stärkeren Hirnwachstum in Verbindung gebracht<sup>111-113</sup>.

Neben diesen Proteinen spielen sicher noch viele weitere Faktoren wie Zellen und Fette eine wichtige Rolle, die in dieser Arbeit nicht berücksichtigt wurden. Die hier vorliegende Arbeit beansprucht also nicht, alle Faktoren hinreichend untersucht zu haben, sondern unterstreicht den Stellenwert bioaktiver Substanzen in der Muttermilch, und die Bedeutung dieser Nährstoffquelle für die Entwicklung des Nervensystems im Frühgeborenen.

#### **4.1. Einordnung der Ergebnisse in die aktuelle Forschungslage**

Die Gesamtwirkung der Muttermilch auf das Leben eines Kindes ist schwer greifbar. Randomisierte Studien können schon aus ethischen Gründen kaum durchgeführt werden und Confounder wie der physische Kontakt zur Mutter beim Stillen oder sozioökonomische

Unterschiede erschweren die Beurteilung. Durch Tierversuche und Grundlagenforschung können die Effekte einzelner Milchbestandteile jedoch näher beleuchtet werden.

Kolostrum und reife Milch unterscheiden sich optisch und durch den Proteingehalt, und auch in der Literatur finden sich bereits Hinweise auf die unterschiedliche Zusammensetzung der Milch in diesen Stadien. Zu erwähnen sind beispielsweise eine erhöhte Konzentration an Wachstumsfaktoren, Spurenelementen, sowie für die Entwicklung einer diversen Darmflora wichtigen Mikroorganismen <sup>114</sup>.

Das primäre Riechhirn, bestehend aus den Bulbi olfactorii, ist eine der wenigen Gehirnregionen, in denen auch lange nach der Geburt noch Neurogenese stattfindet <sup>115</sup>. Die Aufnahme von Substanzen in das Gehirn über die Fila olfactoria und den anschließenden Bulbus olfactorius ist beispielsweise bei der Infektion mit Viren bereits bekannt, wird aber auch als Ansatz für die Verabreichung von intrazerebral wirksamen Stoffen diskutiert. So könnte eine intranasal gegebene Dosis eines Medikaments besser in das Gehirn gelangen als über eine intravenöse oder orale Applikation <sup>116,117</sup>. Einen ähnlichen Effekt erwarteten auch Keller et al. bei der intranasalen Gabe von Muttermilch bei Frühgeborenen mit intraventrikulärer Hämorrhagie <sup>49</sup>. Die genauen Mechanismen sind allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt. Infrage kommen unter anderem ein aktiver, intrazellulärer, axonaler Transport, da die Neurone des Bulbus olfactorius in zentrale Bereiche des Großhirns wie Amygdala und Hippocampus projizieren, ein aktiver paraaxonaler Pumpmechanismus unter Beteiligung der lokalen Blutgefäße <sup>118</sup> und eine passive Diffusion in die Liquorräume über die Lamina cribrosa des Riechepithels <sup>119,120</sup>.

Im Rahmen von Proteom-Studien wurden in der Literatur bereits massenspektrometrische Untersuchungen an Muttermilch durchgeführt und eine Vielzahl von enthaltenen Proteinen beschrieben <sup>59</sup>. Auch vergleichende Proteom-Analysen mit Blick auf Wachstumsfaktoren wurden bereits publiziert <sup>114,121</sup>. Direkte massenspektrometrische Vergleiche von Kolostrum und reifer Milch derselben Frauen mit Analyse der angereicherten Proteine wurden allerdings bisher noch nicht durchgeführt.

## **4.2. Bedeutung der Muttermilchgabe auf der neonatologischen Intensivstation**

Es ist inzwischen klinischer Standard, auch frühgeborene und untergewichtige Kinder direkt nach der Geburt mit der Milch der eigenen Mutter zu ernähren, solange keine medizinischen Stillhindernisse vorliegen. Doch gerade bei frühgeborenen und damit noch unterentwickelten Kindern bedarf es zur raschen Gewichtszunahme vor allem einer energiereichen Kost <sup>122</sup>. Um den erhöhten Energiebedarf der Frühgeborenen zu decken, kann die Muttermilch mit Nährstoffen angereichert werden. So stehen den Kindern sowohl die biologisch aktiven

Substanzen in der Muttermilch als auch ein großes Angebot an Nährstoffen zur Verfügung. Falls keine Milch der eigenen Mutter zur Verfügung steht, wird an der Uniklinik Köln nach Möglichkeit zunächst auf Spendermilch zurückgegriffen. Diese wird von den stationär aufgenommenen Müttern bereitgestellt, die eine mehr als ausreichende Milchproduktion haben und wird vor Benutzung pasteurisiert. Durch diesen Prozess werden zwar potenzielle Pathogene abgetötet und eine Infektion des Neugeborenen beispielsweise mit dem Cytomegalievirus verhindert, allerdings geht auch ein Teil der bioaktiven Substanzen verloren. Erst wenn diese beiden Möglichkeiten, Milch der eigenen Mutter und Spendermilch, nicht genutzt werden können, kommt industriell gefertigte Frühchenmilch auf Basis von Kuhmilch zum Einsatz.

Besonders die Milch der eigenen Mutter zeigt eindeutige protektive Wirkungen auf die Entwicklung von klassischen Komplikationen der Frühgeburtlichkeit. Hierzu zählen unter anderem die „Late Onset Sepsis“, die Nekrotisierende Enterokolitis sowie die Frühgeborenen-Retinopathie. Jene Kinder, die noch auf atmungsunterstützende Maßnahmen angewiesen sind, werden per Magensonde und mit Bolusgaben der Muttermilch ernährt. Anders als beim physiologischen Stillvorgang kommt die Milch hierbei nicht in Kontakt mit der Mundschleimhaut und dem Nasopharynx des Neugeborenen. Für die Mundschleimhaut wäre die Benetzung mit Muttermilch jedoch schon aus immunologischer Sicht sehr sinnvoll, da sie Immunglobuline enthält, die die Schleimhaut vor Pathogenen schützen<sup>123,124</sup>. Weiterhin zeigte ein Review, dass die orale Administration von Kolostrum bei Frühgeborenen zu einer verminderten Inzidenz von beatmungsassoziierter Pneumonie führt<sup>125</sup>. Auch, dass intranasal applizierte Stoffe in das Gehirn aufgenommen werden können, um dort eine neuroprotektive Wirkung zu entfalten, wurde bereits durch Studien belegt. Unsere Darstellung der Wirkung von Muttermilchproteinen auf neuronales Wachstum zeigt einen weiteren potenziellen Nutzen der oralen bzw. intranasalen Gabe von Muttermilch.

### **4.3. Limitationen und Ausblick**

Bei den untersuchten Riechhirnen handelt es sich um Material von Mäusen. Es ist möglich, dass die hier untersuchte menschliche Muttermilch sich auf menschliches neuronales Gewebe anders auswirkt. Auch ist das hier gezeigte Neuritenwachstum eine morphologische Beobachtung, inwieweit sich daraus funktionelle Veränderungen ergeben, bleibt offen. In der Massenspektrometrie wurden signifikant angereicherte Proteine im Kolostrum gefunden, die mit neuronalem Wachstum in Verbindung gebracht werden können. Aufgrund zahlreicher hochabundanter Proteine blieben einige Wachstumsfaktoren, die in der Literatur beschrieben wurden (u.a. *brain derived neurotrophic factor*, BDNF), von der erreichten Detektionstiefe ausgeschlossen. Die präanalytische Depletion dieser abundanten Proteine, sowie fraktionierte Proteomicsverfahren hätten die Sensibilität für niedrigkonzentriertere Proteine zwar erhöht,

eine vollständige Detektion vorhandener Wachstumsfaktoren bliebe jedoch weiterhin fraglich. Wir konnten zeigen, dass Kolostrum einen starken Effekt auf Neuritenwachstum in unserem Modell hat und dass es Proteine enthält, die dafür potenziell verantwortlich sein können. Ob diese Proteine tatsächlich das beobachtete Wachstum hervorrufen, könnte in weiteren Versuchen untersucht werden. Einzelne, vielversprechende Proteine wie *Klotho* oder *SPARC-like protein 1* könnten mittels rekombinanter Synthese isoliert hergestellt und in dem von uns etablierten Bulbusmodell auf ihre neuronenzwachstumsfördernden Eigenschaften untersucht werden. Wahrscheinlicher noch ist jedoch wie meistens in biologischen Systemen das Zusammenwirken mehrerer Faktoren bzw. Proteine. So wäre die Depletion von hochabundanten Proteinen aus der Muttermilch, wie den Kaseinen, sowohl für die Untersuchung des Effekts der niedrigabundanten Wachstumsfaktoren also auch für die erwähnte verbesserte Detektionstiefe in der Massenspektrometrie von Vorteil.

## 5. Literaturverzeichnis

1. WHO. Who: Recommended Definitions, Terminology and Format for Statistical Tables Related to The Perinatal Period And Use of A New Certificate For Cause of Perinatal Deaths. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica* 1977; **56**(3): 247-53.
2. Weichert A, Weichert T, Bergmann R, et al. Factors for Preterm Births in Germany – An Analysis of Representative German Data (KiGGS). *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 2015; **75**(08): 819-26.
3. Kiserud T, Piaggio G, Carroli G, et al. The World Health Organization fetal growth charts: a multinational longitudinal study of ultrasound biometric measurements and estimated fetal weight. *PLoS medicine* 2017; **14**(1).
4. Lawn JE, Cousens S, Zupan J. 4 million neonatal deaths: When? Where? Why? *The Lancet* 2005; **365**(9462): 891-900.
5. WHO. Causes of child mortality. 2018. [https://www.who.int/gho/child\\_health/mortality/causes/en/](https://www.who.int/gho/child_health/mortality/causes/en/) (accessed 07.06.2020)
6. Oskoui M, Coutinho F, Dykeman J, Jette N, Pringsheim T. An update on the prevalence of cerebral palsy: a systematic review and meta-analysis. *Dev Med Child Neurol* 2013; **55**(6): 509-19.
7. Volpe JJ. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *The Lancet Neurology* 2009; **8**(1): 110-24.
8. Platt MJ. Outcomes in preterm infants. *Public Health* 2014; **128**(5): 399-403.
9. Speer CP. Neonatologie. Springer Berlin Heidelberg; 2019: 77-133.
10. Volpe JJ. Confusions in Nomenclature: “Periventricular Leukomalacia” and “White Matter Injury”—Identical, Distinct, or Overlapping? *Pediatric Neurology* 2017; **73**: 3-6.



11. Huang J, Zhang L, Kang B, et al. Association between perinatal hypoxic-ischemia and periventricular leukomalacia in preterm infants: A systematic review and meta-analysis. *PloS one* 2017; **12**(9): e0184993.
12. Folkerth RD. Periventricular Leukomalacia: Overview and Recent Findings. *Pediatric and Developmental Pathology* 2006; **9**(1): 3-13.
13. Kurinczuk JJ, White-Koning M, Badawi N. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic–ischaemic encephalopathy. *Early Human Development* 2010; **86**(6): 329-38.
14. Salmaso N, Jablonska B, Scafidi J, Vaccarino FM, Gallo V. Neurobiology of premature brain injury. *Nature neuroscience* 2014; **17**(3): 341-6.
15. Gunn A, Galinsky R, Davidson J, Dean J, Green C, Bennet L. Glia and hemichannels: key mediators of perinatal encephalopathy. *Neural Regeneration Research* 2018; **13**(2): 181.
16. Manuck TA, Rice MM, Bailit JL, et al. Preterm neonatal morbidity and mortality by gestational age: a contemporary cohort. *American journal of obstetrics and gynecology* 2016; **215**(1): 103.e1-.e14.
17. Vogel JP, Chawanpaiboon S, Moller A-B, Watananirun K, Bonet M, Lumbiganon P. The global epidemiology of preterm birth. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2018; **52**: 3-12.
18. Saigal S, Doyle LW. An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood. *The Lancet* 2008; **371**(9608): 261-9.
19. Moreira RS, Magalhães LC, Alves CRL. Effect of preterm birth on motor development, behavior, and school performance of school-age children: a systematic review. *Jornal de pediatria* 2014; **90**(2): 119-34.
20. Mehler K, Oberthuer A, Keller T, et al. Survival Among Infants Born at 22 or 23 Weeks' Gestation Following Active Prenatal and Postnatal Care. *JAMA pediatrics* 2016; **170**(7): 671-7.
21. Stanley FJ, Blair E. Why have we failed to reduce the frequency of cerebral palsy? *Med J Aust* 1991; **154**(9): 623-6.
22. Stolp HB, Fleiss B, Arai Y, et al. Interneuron Development Is Disrupted in Preterm Brains With Diffuse White Matter Injury: Observations in Mouse and Human. *Frontiers in Physiology* 2019; **10**.
23. Glover AV, Manuck TA. Screening for spontaneous preterm birth and resultant therapies to reduce neonatal morbidity and mortality: A review. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2018; **23**(2): 126-32.
24. Paul SP, Abdelrhim H, Heep A. Management of Hypoxic-ischemic Encephalopathy. *The Indian Journal of Pediatrics* 2015; **82**(6): 493-6.
25. Patel DR, Neelakantan M, Pandher K, Merrick J. Cerebral palsy in children: a clinical overview. *Translational Pediatrics* 2020; **9**(S1): S125-S35.
26. Jacobs SE, Berg M, Hunt R, Tarnow-Mordi WO, Inder TE, Davis PG. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013; (1).

27. Roberts D, Brown J, Medley N, Dalziel SR. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *The Cochrane database of systematic reviews* 2017; **3**(3): Cd004454.
28. DGGG. Leitlinie: Prävention und Therapie der Frühgeburt. Feb 2020 2020. [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/015-025l\\_S2k\\_Praevention-Therapie\\_Fruehgeburt\\_2020-02.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/015-025l_S2k_Praevention-Therapie_Fruehgeburt_2020-02.pdf) (accessed 14.06.2020).
29. Conde-Agudelo A, Romero R. Antenatal magnesium sulfate for the prevention of cerebral palsy in preterm infants less than 34 weeks' gestation: a systematic review and metaanalysis. *American journal of obstetrics and gynecology* 2009; **200**(6): 595-609.
30. Crowther CA, Middleton PF, Voysey M, et al. Assessing the neuroprotective benefits for babies of antenatal magnesium sulphate: An individual participant data meta-analysis. *PLOS Medicine* 2017; **14**(10): e1002398.
31. Rabe H, Diaz-Rossello JL, Duley L, Dowswell T. Effect of timing of umbilical cord clamping and other strategies to influence placental transfusion at preterm birth on maternal and infant outcomes. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2012; (8).
32. Katheria A, Reister F, Essers J, et al. Association of Umbilical Cord Milking vs Delayed Umbilical Cord Clamping With Death or Severe Intraventricular Hemorrhage Among Preterm Infants. *JAMA* 2019; **322**(19): 1877.
33. Fowlie PW, Davis PG, McGuire W. Prophylactic intravenous indomethacin for preventing mortality and morbidity in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2010; (7).
34. Dani C. Prophylactic Ibuprofen for the Prevention of Intraventricular Hemorrhage Among Preterm Infants: A Multicenter, Randomized Study. 2005; **115**(6): 1529-35.
35. Ohlsson A, Aher SM. Early erythropoiesis-stimulating agents in preterm or low birth weight infants. *The Cochrane database of systematic reviews* 2017; **11**(11): Cd004863.
36. Fischer HS, Reibel NJ, Bühner C, Dame C. Prophylactic Early Erythropoietin for Neuroprotection in Preterm Infants: A Meta-analysis. *Pediatrics* 2017; **139**(5): e20164317.
37. Natalucci G, Latal B, Koller B, et al. Effect of Early Prophylactic High-Dose Recombinant Human Erythropoietin in Very Preterm Infants on Neurodevelopmental Outcome at 2 Years. 2016; **315**(19): 2079.
38. Sheldon RA, Windsor C, Lee BS, Arteaga Cabeza O, Ferriero DM. Erythropoietin Treatment Exacerbates Moderate Injury after Hypoxia-Ischemia in Neonatal Superoxide Dismutase Transgenic Mice. *Developmental Neuroscience* 2017; **39**(1-4): 228-37.
39. Ochoa TJ, Sizonenko SV. Lactoferrin and prematurity: a promising milk protein? *Biochemistry and Cell Biology* 2017; **95**(1): 22-30.
40. Van De Looij Y, Ginet V, Chatagner A, et al. Lactoferrin during lactation protects the immature hypoxic-ischemic rat brain. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 2014; **1**(12): 955-67.
41. Wang B. Molecular Determinants of Milk Lactoferrin as a Bioactive Compound in Early Neurodevelopment and Cognition. *The Journal of pediatrics* 2016; **173**: S29-S36.
42. Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Annals of Neurology* 1981; **9**(2): 131-41.

43. Scafidi J, Hammond TR, Scafidi S, et al. Intranasal epidermal growth factor treatment rescues neonatal brain injury. *Nature* 2014; **506**(7487): 230-4.
44. Singhi S, Johnston M. Recent advances in perinatal neuroprotection. *F1000Research* 2019; **8**: 2031.
45. Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani MH. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Research & Therapy* 2018; **9**(1).
46. Sisa C, Kholia S, Naylor J, et al. Mesenchymal Stromal Cell Derived Extracellular Vesicles Reduce Hypoxia-Ischaemia Induced Perinatal Brain Injury. *Frontiers in Physiology* 2019; **10**.
47. Ahn SY, Chang YS, Park WS. Mesenchymal stem cells transplantation for neuroprotection in preterm infants with severe intraventricular hemorrhage. *Korean Journal of Pediatrics* 2014; **57**(6): 251.
48. Ahn SY, Chang YS, Sung SI, Park WS. Mesenchymal Stem Cells for Severe Intraventricular Hemorrhage in Preterm Infants: Phase I Dose-Escalation Clinical Trial. *STEM CELLS Translational Medicine* 2018; **7**(12): 847-56.
49. Keller T, Korber F, Oberthuer A, et al. Intranasal breast milk for premature infants with severe intraventricular hemorrhage-an observation. *European journal of pediatrics* 2019; **178**(2): 199-206.
50. FLR-Foundation. Breastfeeding and Breast Milk - From Biochemistry to Impact: A Multidisciplinary Introduction. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2018.
51. Jenness R. The composition of human milk. *Semin Perinatol* 1979; **3**(3): 225-39.
52. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev* 2015; **91**(11): 629-35.
53. Kaingade P, Somasundaram I, Sharma A, Patel D, Marappagounder D. Cellular Components, Including Stem-Like Cells, of Preterm Mother's Mature Milk as Compared with Those in Her Colostrum: A Pilot Study. *Breastfeeding medicine : the official journal of the Academy of Breastfeeding Medicine* 2017; **12**(7): 446-9.
54. Michaelsen KF, Skafté L, Badsberg JH, Jørgensen M. Variation in Macronutrients in Human Bank Milk. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 1990; **11**(2): 229-39.
55. Zhu J, Dingess KA. The Functional Power of the Human Milk Proteome. *Nutrients* 2019; **11**(8): 1834.
56. Lönnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2003; **77**(6): 1537S-43S.
57. Gidrewicz DA, Fenton TR. A systematic review and meta-analysis of the nutrient content of preterm and term breast milk. *BMC Pediatrics* 2014; **14**(1): 216.
58. Saarela T, Kokkonen J, Koivisto M. Macronutrient and energy contents of human milk fractions during the first six months of lactation. *Acta paediatrica* 2007; **94**(9): 1176-81.
59. Molinari CE, Casadio YS, Hartmann BT, et al. Proteome mapping of human skim milk proteins in term and preterm milk. *J Proteome Res* 2012; **11**(3): 1696-714.

60. Haschke F, Haiden N, Thakkar SK. Nutritive and Bioactive Proteins in Breastmilk. *Annals of Nutrition and Metabolism* 2016; **69**(2): 17-26.
61. Hurley WL, Theil PK. Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. *Nutrients* 2011; **3**(4): 442-74.
62. Nair RR, Warner BB, Warner BW. Role of Epidermal Growth Factor and Other Growth Factors in the Prevention of Necrotizing Enterocolitis. *Seminars in Perinatology* 2008; **32**(2): 107-13.
63. Nolan LS, Parks OB, Good M. A Review of the Immunomodulating Components of Maternal Breast Milk and Protection Against Necrotizing Enterocolitis. *Nutrients* 2019; **12**(1): 14.
64. Zou X-Q, Guo Z, Huang J-H, et al. Human Milk Fat Globules from Different Stages of Lactation: A Lipid Composition Analysis and Microstructure Characterization. 2012; **60**(29): 7158-67.
65. Koletzko B, Rodriguez-Palmero M, Demmelmair H, Fidler N, Jensen R, Sauerwald T. Physiological aspects of human milk lipids. *Early Human Development* 2001; **65**: S3-S18.
66. Koletzko B, Rodriguez-Palmero M. Polyunsaturated Fatty Acids in Human Milk and Their Role in Early Infant Development. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 1999; **4**(3): 269-84.
67. Schneider N, Hauser J, Oliveira M, et al. Sphingomyelin in brain and cognitive development: preliminary data. *eneuro* 2019: ENEURO.0421-18.
68. Tanaka K, Hosozawa M, Kudo N, et al. The pilot study: Sphingomyelin-fortified milk has a positive association with the neurobehavioural development of very low birth weight infants during infancy, randomized control trial. *Brain and Development* 2013; **35**(1): 45-52.
69. Demmelmair H, Koletzko B. Lipids in human milk. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2018; **32**(1): 57-68.
70. Uauy R, Hoffman DR, Peirano P, Birch DG, Birch EE. Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids* 2001; **36**(9): 885-95.
71. Coppa GV, Gabrielli O, Pierani P, Catassi C, Carlucci A, Giorgi PL. Changes in Carbohydrate Composition in Human Milk Over 4 Months of Lactation. *Pediatrics* 1993; **91**(3): 637.
72. Bode L. The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Human Development* 2015; **91**(11): 619-22.
73. Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, et al. Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *The Journal of pediatrics* 2004; **145**(3): 297-303.
74. Trend S, De Jong E, Lloyd ML, et al. Leukocyte Populations in Human Preterm and Term Breast Milk Identified by Multicolour Flow Cytometry. *PloS one* 2015; **10**(8): e0135580.
75. Witkowska-Zimny M, Kaminska-El-Hassan E. Cells of human breast milk. *Cellular & Molecular Biology Letters* 2017; **22**(1).
76. Hassiotou F, Beltran A, Chetwynd E, et al. Breastmilk is a novel source of stem cells with multilineage differentiation potential. *Stem cells* 2012; **30**(10): 2164-74.

77. Aydin MS, Yigit EN, Vatandaslar E, Erdogan E, Ozturk G. Transfer and Integration of Breast Milk Stem Cells to the Brain of Suckling Pups. *Scientific reports* 2018; **8**(1): 14289.
78. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**(5259): 680-5.
79. Pini A. Chemorepulsion of axons in the developing mammalian central nervous system. *Science* 1993; **261**(5117): 95-8.
80. Ahmed G, Shinmyo Y, Naser IB, Hossain M, Song X, Tanaka H. Olfactory bulb axonal outgrowth is inhibited by draxin. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; **398**(4): 730-4.
81. Ba-Charvet KTN, Brose K, Marillat V, et al. Slit2-Mediated Chemorepulsion and Collapse of Developing Forebrain Axons. *Neuron* 1999; **22**(3): 463-73.
82. Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology* 2013; **106-107**: 1-16.
83. Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric clinics of North America* 2013; **60**(1): 49-74.
84. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research* 2019; **47**(D1): D607-D13.
85. Zalewski BM, Patro B, Veldhorst M, et al. Nutrition of infants and young children (one to three years) and its effect on later health: A systematic review of current recommendations (EarlyNutrition project). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2017; **57**(3): 489-500.
86. Ferreira A, Caceres A. Expression of the Class III  $\beta$ -tubulin isotype in developing neurons in culture. *Journal of neuroscience research* 1992; **32**(4): 516-29.
87. Sullivan MM, Barker TH, Funk SE, et al. Matricellular Hevin Regulates Decorin Production and Collagen Assembly. *Journal of Biological Chemistry* 2006; **281**(37): 27621-32.
88. Gan KJ, Südhof TC. SPARCL1 Promotes Excitatory But Not Inhibitory Synapse Formation and Function Independent of Neurexins and Neuroligins. *The Journal of Neuroscience* 2020; **40**(42): 8088-102.
89. Sandeep, Jeff, Nisha, et al. Astrocytes Assemble Thalamocortical Synapses by Bridging NRX1 $\alpha$  and NL1 via Hevin. *Cell* 2016; **164**(1-2): 183-96.
90. Gan KJ, Südhof TC. Specific factors in blood from young but not old mice directly promote synapse formation and NMDA-receptor recruitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2019; **116**(25): 12524-33.
91. Hambrock HO, Nitsche DP, Hansen U, et al. SC1/Hevin - an extracellular calcium-modulated protein that bind Collagen I. *Journal of Biological Chemistry* 2003; **278**(13): 11351-8.
92. Yagi H, Yanagisawa M, Suzuki Y, et al. HNK-1 Epitope-carrying Tenascin-C Spliced Variant Regulates the Proliferation of Mouse Embryonic Neural Stem Cells\*. *Journal of Biological Chemistry* 2010; **285**(48): 37293-301.

93. Midwood K, Sacre S, Piccinini AM, et al. Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nature medicine* 2009; **15**(7): 774-80.
94. Wiemann S, Reinhard J, Faissner A. Immunomodulatory role of the extracellular matrix protein tenascin-C in neuroinflammation. *Biochemical Society Transactions* 2019; **47**(6): 1651-60.
95. Rohm B, Ottemeyer A, Lohrum M, Püschel AW. Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. *Mechanisms of Development* 2000; **93**(1-2): 95-104.
96. Plein A, Fantin A, Ruhrberg C. Neuropilin Regulation of Angiogenesis, Arteriogenesis, and Vascular Permeability. *Microcirculation* 2014; **21**(4): 315-23.
97. Cantuti-Castelvetri L, Ojha R, Pedro LD, et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science* 2020; **370**(6518): 856-60.
98. Kumar J, Meena J, Yadav A, Kumar P. SARS-CoV-2 detection in human milk: a systematic review. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 2021: 1-8.
99. Salvatore CM, Han J-Y, Acker KP, et al. Neonatal management and outcomes during the COVID-19 pandemic: an observation cohort study. *The Lancet Child & Adolescent Health* 2020; **4**(10): 721-7.
100. van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2008; **65**(23): 3756-88.
101. Wong SHM, Fang CM, Chuah L-H, Leong CO, Ngai SC. E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2018; **121**: 11-22.
102. Philley JV, Kannan A, Dasgupta S. MDA-9/Syntenin Control. *Journal of Cellular Physiology* 2016; **231**(3): 545-50.
103. Das SK, Pradhan AK, Bhoopathi P, et al. The MDA-9/Syntenin/IGF1R/STAT3 Axis Directs Prostate Cancer Invasion. *Cancer research* 2018; **78**(11): 2852-63.
104. Menezes ME, Shen X-N, Das SK, Emdad L, Sarkar D, Fisher PB. MDA-9/Syntenin (SDCBP) modulates small GTPases RhoA and Cdc42 via transforming growth factor  $\beta$ 1 to enhance epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Oncotarget* 2016; **7**(49): 80175-89.
105. B A Eipper, D A Stoffers a, Mains RE. The Biosynthesis of Neuropeptides: Peptide alpha-Amidation. *Annual Review of Neuroscience* 1992; **15**(1): 57-85.
106. Prigge ST, Mains RE, Eipper BA, Amzel\* \*\* LM. New insights into copper monooxygenases and peptide amidation: structure, mechanism and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2000; **57**(8): 1236-59.
107. Baek J-H, Yun HS, Kwon GT, et al. PLOD3 promotes lung metastasis via regulation of STAT3. *Cell Death & Disease* 2018; **9**(12).
108. Ewans LJ, Colley A, Gaston-Massuet C, et al. Pathogenic variants in PLOD3 result in a Stickler syndrome-like connective tissue disorder with vascular complications. *Journal of Medical Genetics* 2019; **56**(9): 629-38.

109. Kuro-O M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; **390**(6655): 45-51.
110. Kurosu H. Suppression of Aging in Mice by the Hormone Klotho. *Science* 2005; **309**(5742): 1829-33.
111. Cararo-Lopes MM, Mazucanti CHY, Scavone C, Kawamoto EM, Berwick DC. The relevance of  $\alpha$ -KLOTTHO to the central nervous system: Some key questions. *Ageing Research Reviews* 2017; **36**: 137-48.
112. Dubal DB, Zhu L, Sanchez PE, et al. Life Extension Factor Klotho Prevents Mortality and Enhances Cognition in hAPP Transgenic Mice. *Journal of Neuroscience* 2015; **35**(6): 2358-71.
113. Yokoyama JS, Sturm VE, Bonham LW, et al. Variation in longevity gene KLOTTHO is associated with greater cortical volumes. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 2015; **2**(3): 215-30.
114. Bardanzellu FF, V.; Reali, A. "Omics" in Human Colostrum and Mature Milk: Looking to Old Data with New Eyes. *Nutrients* 2017; **9**(8): 843.
115. Pignatelli A BO. Neurogenesis in the Adult Olfactory Bulb. In: A M, ed. *The Neurobiology of Olfaction*. Boca Raton, Florida: CRC Press/Taylor & Francis; 2010.
116. Born J, Lange T, Kern W, McGregor GP, Bickel U, Fehm HL. Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. *Nature neuroscience* 2002; **5**(6): 514-6.
117. Thorne RG, Pronk GJ, Padmanabhan V, Frey WH. Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience* 2004; **127**(2): 481-96.
118. Dhuria S, Hanson L, Frey 2nd W. Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J Pharm Sci* 99: 1654-1673. *Journal of pharmaceutical sciences* 2009; **99**: 1654-73.
119. Erdő F, Bors LA, Farkas D, Bajza Á, Gizurarson S. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. *Brain Research Bulletin* 2018; **143**: 155-70.
120. Trevino JT, Quispe RC, Khan F, Novak V. Non-Invasive Strategies for Nose-to-Brain Drug Delivery. *Journal of clinical trials* 2020; **10**(7).
121. Palmer DJ, Kelly VC, Smit A-M, Kuy S, Knight CG, Cooper GJ. Human colostrum: Identification of minor proteins in the aqueous phase by proteomics. *PROTEOMICS* 2006; **6**(7): 2208-16.
122. Belfort MB, Ehrenkranz RA. Neurodevelopmental outcomes and nutritional strategies in very low birth weight infants. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2017; **22**(1): 42-8.
123. Lee J, Kim HS, Jung YH, et al. Oropharyngeal Colostrum Administration in Extremely Premature Infants: An RCT. *Pediatrics* 2015; **135**(2): e357-e66.
124. Sauer S, Altmiller G. Colostrum Swabbing as an Infection Prevention Strategy: A Retrospective Study. *International Journal for Human Caring* 2018; **22**(1): 3-9.
125. Ma A, Yang J, Li Y, Zhang X, Kang Y. Oropharyngeal colostrum therapy reduces the incidence of ventilator-associated pneumonia in very low birth weight infants: a systematic review and meta-analysis. *Pediatric research* 2021; **89**(1): 54-62.