

## بررسی هورمون‌های استروئیدی در شیر گاومیش‌های غیر باردار و در دوره‌های مختلف بارداری

ياسر شهبازى<sup>۱\*</sup>؛ حسين تاجیک<sup>۲</sup>؛ حسن ملكى نژاد<sup>۳</sup>

### چکیده

زمینه: شیر یکی از منابع با ارزش تغذیه انسان است. اما اخیراً گزارشاتی وجود دارد که سلامت آن را به دلیل وجود هورمون‌های استروئیدی زیرسؤال برده است. مطالعه حاضر به منظور بررسی میزان وقوع هورمون‌های استروئیدی شامل استرون، ۱۷-بتا-استرادیول و استریول در شیر خام و پاستوریزه گاومیش‌های آبستن و غیرآبستن انجام گردید. روش‌ها: نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده با استفاده از روش‌های استخراج مایع-مایع، غیرکونژوکه شدن با آنزیم گلوکوکورونیداز/سولفاتاز و با کمک ستون‌های استخراج فاز جامد ۱۸ کربنه تخلیص شدند و استروژن‌ها با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با آشکارساز فلورسانس آنالیز گردیدند.

یافته‌ها: مقادیر آزاد ( $554/1 \pm 77/0 \text{ ng/L}$ ) و تام ( $70/1/16 \pm 44/7 \text{ ng/L}$ ) استرون دارای بیشترین مقدار بودند و به دنبال آن ۱۷-بتا-استرادیول ( $E_2$ ) بیشترین سهم را به خود اختصاص داده بود درحالی‌که مقادیر استریول ( $E_3$ ) پایین‌تر از حد تشخیص بود ( $1/0 \text{ ng/L}$ ). کمترین ( $E_1: 554/1 \pm 77/0$  و  $E_2: 28/1 \pm 4/4 \text{ ng/L}$ ) و بیشترین ( $E_1: 10/14/7 \pm 123/8$  و  $E_2: 10/8/2 \pm 9/1 \text{ ng/L}$ ) غلظت استروژن‌ها در شیر خام، به ترتیب در حیوانات غیرآبستن و در سه ماهه سوم آبستنی تشخیص داده شد. غلظت استروژن‌ها در شیرهای پاستوریزه، تفاوت معناداری ( $P > 0/05$ ) را با غلظت آنها در شیرهای خام نشان نداد. نتیجه‌گیری: شیر گاومیش به دلیل دارا بودن چربی بیشتر، حاوی مقادیر بیشتری از هورمون‌های استروئیدی است؛ از این رو مصرف شیر گاومیش، به ویژه شیر حاصله از حیوانات باردار در سه‌ماهه آخر آبستنی، شاید به‌عنوان یکی از فاکتورهای خطر ابتلا به سرطان محسوب شود.

کلیدواژه‌ها: هورمون‌های استروئیدی، شیر گاومیش، سرطانزایی، پاستوریزاسیون

«دریافت: ۱۳۸۹/۶/۵ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۱/۱۲»

۱. گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی کرمانشاه

۲. گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

۳. گروه فارماکولوژی و توکسیکولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

\* عهده‌دار مکاتبات: کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت مواد غذایی، صندوق پستی ۱۱۷۷، تلفن: ۰۸۳۱-۸۳۲۲۰۵۹۹، فاکس:

Email: Yasser.shahbazi@yahoo.com

۰۸۳۱-۸۳۲۰۰۴۱

### مقدمه

(استروژن‌های گلوکوکورونیده و سولفات) در شیر بیشترین اهمیت را دارد. شیر حاوی استروژن‌هایی از قبیل استرون ( $E_1$ )، استرادیول ( $E_2$ ) و استریول ( $E_3$ ) و متابولیت‌های گلوکوکورونیده و سولفات آن‌ها است. یکی از دلایل افزایش شیوع اختلالات تولیدمثلی در جنس نر، مانند سرطان بیضه، پروستات و کیفیت پایین منی به علت دریافت مقادیر بالای استروژن از طریق شیر مصرفی است. اخیراً شواهدی ارائه شده که نشان‌دهنده ارتباط قوی بین

شیر یکی از منابع با ارزش تغذیه انسان است. اما اخیراً گزارشاتی وجود دارد که سلامت آن را به دلیل وجود هورمون‌های استروئیدی زیر سؤال برده است. استروژن‌ها از جمله مواد موجود در شیر هستند که اگر با غلظت بالا در شیر وجود داشته باشند می‌توانند فرایندهای بیولوژیکی را در مصرف‌کننده تحت تأثیر قرار دهند. از این رو آنالیز استروژن‌ها و متابولیت‌های کونژوکه آن

اما شیر گاو ۳-۳/۵ درصد چربی دارد (۴).

گاومیش رودخانه‌ای (*Bubalus bubalis*) یکی از گونه‌های حیوانی است که در زمره حیوانات تولیدکننده محصولات با منشأ دامی قرار می‌گیرد. این گونه به همراه گونه‌های اهلی گاو به خانواده Bovina تعلق دارند (۵). گرچه گاومیش‌های رودخانه‌ای به مقدار زیادی در کشورهای آسیایی یافت می‌شوند ولی در دهه‌های اخیر به تعداد زیادی در کشورهای اروپایی، مانند ایتالیا وارد شده‌اند و از شیر گاومیش در تهیه نوع خاصی از پنیر به نام موزارلا استفاده می‌شود.

ایران یکی از کشورهای است که گاومیش‌های رودخانه‌ای در استان‌های جنوب غربی (خوزستان) و شمال غربی (آذربایجان غربی) آن پراکنده شده‌اند. ولی محصولات لبنی تولیدشده از شیر گاومیش در مناطق زیادی از کشور ایران و تعدادی از کشورهای همسایه مصرف می‌شود (۶).

از آنجایی که شیر گاومیش دارای میزان چربی بالایی است لذا تصور می‌شود که حاوی مقدار زیادی از هورمون‌های استروئیدی باشد و مصرف آن ممکن است اثرات نامطلوب و ناخواسته‌ای بر روی سلامت انسان به‌خصوص سیستم اندوکروینی بگذارد. از این رو مطالعه حاضر برای مشخص کردن میزان آزاد و تام هورمون‌های استروئیدی شامل استرون ( $E_1$ )، ۱۷بتا- استرادیول ( $E_2$ ) و استریول ( $E_3$ ) طراحی شده است. علاوه بر این، امکان تغییر غلظت هورمون‌های استروئیدی در خلال آبستنی و اثر پروسس‌های غذایی مانند فرایند پاستوریزاسیون بر غلظت هورمون‌های استروئیدی نیز بررسی شده است.

### مواد و روش‌ها

نمونه‌های شیر خام از هشت گاومیش رودخانه‌ای غیرآبستن (*Bubalus bubali*) که در مزرعه آزمایشی پرورش و اصلاح نژاد گاومیش شمال غرب کشور نگهداری می‌شدند، جمع‌آوری شد. همچنین نمونه‌های شیر خام از گاومیش‌های رودخانه‌ای (*Bubalus bubali*)

گسترش سرطان سینه و افزایش میزان استروژن در گردش خون است (۱). مطالعات توکسیکولوژی در حیوانات و مطالعات اپیدمیولوژی در جمعیت‌های انسانی بیان می‌کنند که استرادیول و متابولیت‌های هیدروکسیله آن در دسته مواد سرطان‌زا قرار می‌گیرند. مقدار استروژن در شیر و فراورده‌های لبنی با افزایش میزان چربی، افزایش پیدا می‌کند، زیرا ترکیبات فوق چربی دوست هستند و در مرکز گلوبول چربی شیر تجمع پیدا می‌کنند. در کشورهای غربی، منشأ ۸۰-۶۰ درصد از استروژن‌هایی که از طریق غذا به انسان انتقال پیدا می‌کنند شیر و فراورده‌های لبنی است (۲). این مواد ترکیباتی هستند که به‌طور طبیعی در بافت‌ها و مایعات حیوانات حضور دارند و به‌همین دلیل به‌طور کامل از غذاهای با منشأ دامی، قابل حذف نیستند چرا که بخشی از متابولیسم و زندگی حیوان را پشتیبانی می‌کنند (۳).

میزان هورمون‌های استروئیدی در شیر و فراورده‌های لبنی ممکن است بر حسب شرایط جغرافیایی، نژاد حیوانات، تفاوت‌های تغذیه‌ای، شرایط فیزیولوژیکی و استفاده از محرک‌های رشد استروژنی، متفاوت باشد. مطالعات متعددی بر روی شیر گاو از نظر وجود این هورمون‌های استروژنی صورت گرفته است. گرچه منبع اصلی محصولات لبنی، شیر گاو است، در بیشتر کشورهای جهان منابع دیگری شامل شیر بز، گوسفند و گاومیش هم مصرف می‌شود. شیر گاومیش از نظر مقدار، دومین شیر تولیدی در جهان، با تولید سالانه ۸۲ بیلیون لیتر است. (۱۲/۵ درصد از شیر تولیدشده در جهان). ۹۱ درصد شیر گاومیش در جنوب غربی آسیا تولید می‌شود و در تولید محصولات مختلف لبنی از قبیل پنیرهای سخت و نرم، ماست، بستنی و غیره استفاده می‌شود. شیر گاومیش به‌خصوص از نظر چربی که مهم‌ترین جزء تشکیل‌دهنده شیر گاومیش است و مسئول انرژی بالا و ارزش غذایی بالای آن است از غنی‌ترین شیرها است. مقدار چربی شیر گاومیش در مقایسه با شیر گاو بالاتر است. چربی شیر گاومیش بین ۸/۵-۶/۵ درصد قرار دارد

لوله‌های شیشه‌ای (۱۶ mm i.d. ۱۵ mm) انتقال پیدا کردند. بعد از ورتکس به مدت ۱۵ ثانیه، نمونه‌ها در داخل حمام آب گرم اولتراسونیک به مدت ۳۰ دقیقه هموزن شدند.

برای تعیین مقدار تام (فرم آزاد و غیرکونژوکه شده) استروژن‌ها در نمونه‌های شیر، ۲mL از محلول (حجمی- حجمی) ۲ درصد اسید استیک به نمونه‌های هموزن شده اضافه شد و مخلوط با ۵۰۰ واحد آنزیم گلوکورونیداز/ سولفاتاز که در ۱۰۰µL بافر استات با غلظت ۴۰mM و با pH ۵/۳ حل شده بود تحت درمان قرار گرفتند. بعد از ورتکس، مخلوط به مدت یک شبانه روز (Over night) در دمای ۳۷°C انکوبه شد (۹). نمونه‌های کنترل با اسپایک شده (Spiking) نمونه‌های شیر به وسیله مخلوطی از استانداردهای استروژن برای به دست آوردن غلظت نهایی ۰/۵، ۱ و ۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای هر استروژن، آماده شدند.

مخلوطی به حجم ۱۰ میلی‌لیتر از آب و متانول (به نسبت ۸:۲ حجمی- حجمی) به همه نمونه‌ها شامل اسپایک شده، اسپایک نشده، یا نمونه‌های تیمار شده با آنزیم بتا-گلوکورونیداز/ سولفاتاز اضافه شد. سپس نمونه‌ها به شدت به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰rpm بر روی شیکر پلات فرم مخلوط و سپس در ۲۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C ساتریفیوژ شدند. لایه بالایی چربی جدا شد و لایه پایینی به یک لوله جدید انتقال پیدا کرد. محلول حاوی نمونه با ۱۰mL هگزان مخلوط شد و در ۳۵۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه ساتریفیوژ شد. بعد از جدا کردن لایه هگزان، ۱۵mL از دی‌کلرومتان (DCM) به محلول باقیمانده اضافه شد و سپس به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰rpm بر روی شیکر پلات فرم مخلوط شدند و سپس مجدداً در ۲۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C ساتریفیوژ شدند. لایه پایینی به داخل یک لوله شیشه‌ای جدید انتقال پیدا کرد و استخراج لایه بالایی با ۱۵mL از دی‌کلرومتان تکرار شد. فاز دی‌کلرومتان در زیر جریان گاز نیتروژن ترکیب، هموزن و

که در سه ماهه اول آبستنی (هشت رأس حیوان)، سه ماهه دوم آبستنی (هشت رأس حیوان) و سه ماهه سوم آبستنی (هشت رأس حیوان) بودند و بر اساس زمان تلقیح و معاینه دامپزشک، سن آبستنی آن‌ها تعیین شده بود، جمع‌آوری شدند. نمونه‌های شیر خام (هشت نمونه با هم مخلوط شده از گاومیش‌های غیرآبستن و گاومیش‌های آبستن در سه ماهه اول، دوم و سوم آبستنی) در دمای ۶۵°C و به مدت ۵ دقیقه پاستوریزه شدند و میزان چربی نمونه‌ها با استفاده از روش ژربر (Gerber) تعیین گردید (۷ و ۸). نمونه‌های شیر تا زمان آنالیز در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند.

استرون (E<sub>1</sub>)، ۱۷بتا- استرادیول (E<sub>2</sub>) و استریول (E<sub>3</sub>) از شرکت سیگما (St. Louis, MO) خریداری شدند. برای به دست آوردن غلظت ۱۰mg/mL، استروژن‌ها در متانول حل شدند و محلول‌های ذخیره (Stock solutions) در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند. محلول‌های کاری (Working solutions) در غلظت مناسب، تهیه و در دمای ۴°C نگهداری شدند. یک محلول استاندارد (Standard solution) با غلظت ۱/۰mg/mL برای هر یک از استروژن‌ها از محلول‌های کاری تهیه و در دمای ۴°C نگهداری شدند.

متانول، استونیتریل، هگزان و دی‌کلرومتان (DCM) با خلوص HPLC از شرکت مرک (Merck) (آلمان) خریداری شدند. آنزیم گلوکورونیداز/سولفاتاز استخراج شده از Helix pomatia از شرکت سیگما خریداری شد. اسید با خلوص تجزیه‌ای از شرکت مرک (Merck) (آلمان) خریداری شد. ستون‌های C<sub>18</sub> SPE با مشخصات ۳mL و ۵۰۰mg از J.T.Baker (هلند) خریداری شدند. آب مصرفی هم با استفاده از سیستم Milli-Q خالص‌سازی شد (Millipore, Bedford, MA).

برای آماده‌سازی و تخلیص نمونه‌ها از روشی که قبلاً توصیف شده، استفاده شد (۲). نمونه‌های شیر یخ‌زده شده در دمای اتاق در داخل حمام آب گرم، گرم شدند. حجمی به اندازه ۱۰mL از نمونه‌های شیر به داخل

نهایتاً خشک شد.

تعیین غلظت هورمون‌های استروئیدی به وسیله منحنی‌های کالیبراسیون که نخست برای هر استاندارد به دست آمده بود، صورت گرفت. غلظت‌ها براساس میزان بازیابی آنالیت‌ها از ماتریکس شیر اصلاح شدند. حد تشخیص (Limit of Detection) برای هر آنالیت با تعیین نسبت سیگنال به نویز (S/N) برابر با ۳ محقق شد. کیفیت روش مورد استفاده با تصحیح سطح زیر پیک‌ها بر اساس سیگنال‌های زمینه در مورد سنجش استروژن‌های طبیعی نمونه‌های شیر صورت گرفت. سیگنال‌های زمینه با آنالیز نمونه‌های اسپایک‌نشده به دست آمد. تفاوت بین مقادیر استروژن در حیوانات غیرآبستن و آبستن و در ماه‌های مختلف آبستنی به ترتیب با ANOVA یک‌طرفه و تست bonferronic انجام شد.

### یافته‌ها

در تمام نمونه‌های شیر مورد مطالعه، میزان درصد چربی اندازه‌گیری شد و مقادیر به دست آمده ( $42 \pm 0.4/95\%$ ) با درصد چربی شیر گاو ( $14 \pm 0.3/2\%$ ) مقایسه شد. برای نشان دادن کارایی روش‌های استخراج و تشخیص، شاخص‌هایی نظیر درصد بازیابی (Recovery Percentage) و حد تشخیص برای هر سه ترکیب که شرط اولیه برای مطالعه هستند، مشخص شدند. بیشترین و کمترین درصد بازیابی به ترتیب برای استرون ( $E_1$ ) و استریول ( $E_3$ ) به دست آمد (جدول ۱). کروماتوگرام‌های HPLC برای هر سه استروژن مورد آنالیز در محلول استاندارد و در نمونه‌های شیر در نمودار ۱ و ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱- میانگین نتایج آنالیز HPLC استروژن‌ها در شیر گاومیش

استروژن	درصد بازیابی*	حد تشخیص
استروژن ( $E_1$ )	$75/53 \pm 13/17$	۵
استروژن ( $E_2$ )	$72/21 \pm 16/1$	۵
استروژن ( $E_3$ )	$55/39 \pm 8/91$	۱۰

\*درصد بازیابی با سه بار تکرار آزمایشات، محاسبه و به صورت مقادیر میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد بیان شده است.

مواد باقی‌مانده از استخراج شیمیایی مجدداً در ۰/۵mL از متانول حل شدند و به دنبال مخلوط کردن با ورتکس، ۴/۵mL آب به آن اضافه شد. بعد از هموژنیزاسیون، محلول با دقت از ستون‌های SPE  $C_{18}$  (رتیب فعال و آماده شده بود عبور داده شد. ستون سپس با ۵mL آب شسته شد و در زیر گاز نیتروژن خشک شد. استروژن‌ها به وسیله ۴mL اتانول شسته شدند و حلالی که حاوی اجزاء نمونه بود در زیر جریان گاز نیتروژن در دمای اتاق خشک شد. مواد باقی‌مانده در ۲۰۰ $\mu$ L فاز متحرک حل شده و ۲۰ $\mu$ L از مایع حاوی آنالیت به وسیله HPLC تحت آنالیز قرار گرفت.

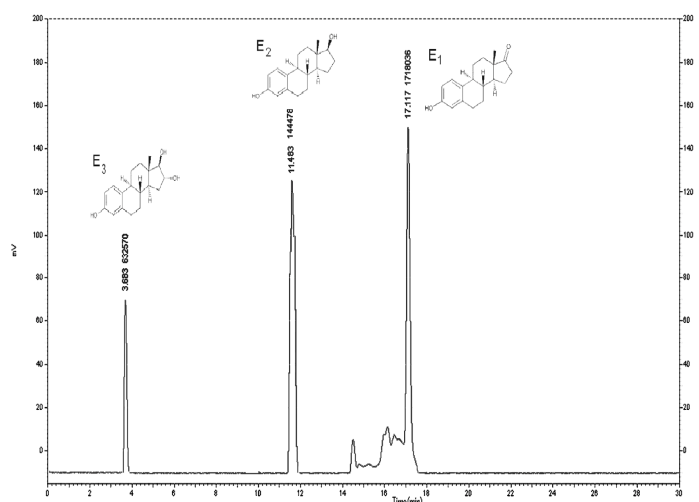
آنالیز HPLC استروژن‌ها در نمونه‌های شیر بر اساس روشی که قبلاً شرح داده شده بود با اندکی تغییر صورت گرفت (۳). سیستم کروماتوگرافی شامل یک اتوسمپلر (Autosampler Tirathlon ۹۰۰ Germany) و دو پمپ (KNAVER Germany) HPLC Wellchrom (K-1۰۰۱, pump) بود. ستون HPLC (Gravity), ۵ $\mu$ m, ۱۵۰ $\times$ ۴/۶mm  $C_{18}$  بود که با فاز متحرک A که شامل مخلوطی از استونیتریل، آب و اسید فرمیک به نسبت ۰/۴:۶۰:۹۰ (حجمی - حجمی - حجمی) و فاز متحرک B که شامل استونیتریل، آب و اسید فرمیک با نسبت ۰/۴:۰:۱۰ (حجمی - حجمی - حجمی) بود شسته شد. سرعت جریان در ۲۰۰ میکرولیتر در دقیقه تنظیم شد که به وسیله یک گرادیانت خطی به ترتیب ذیل اجرا شد: ۱۰۰ درصد A برای ۱ دقیقه که بعد از ۹ دقیقه به ۱۰۰ درصد B رسید و سپس به مدت ۱۴ دقیقه، ۱۰۰ درصد B ادامه پیدا کرد. سپس ستون HPLC به مدت ۱۰ دقیقه قبل از تزریق بعدی با ۱۰۰ درصد A شسته شد. استروژن‌ها به وسیله آشکارساز فلورسانس، دیتکت شدند (Germany), AXL (RF-1۰KNAUER). طول موج برانگیختگی و نشر به ترتیب ۲۸۰ و ۳۰۰ نانومتر بود.

نمونه های شیر سه ماهه دوم و سوم آنالیز شدند، معنادار بود ( $P < 0/05$ ). سطح استریول ( $E_3$ ) در نمونه های شیر سه ماهه سوم قابل اندازه گیری بود و این بیانگر افزایش قابل توجه این هورمون در طول دوره آبستى است (جدول ۲ و ۳).

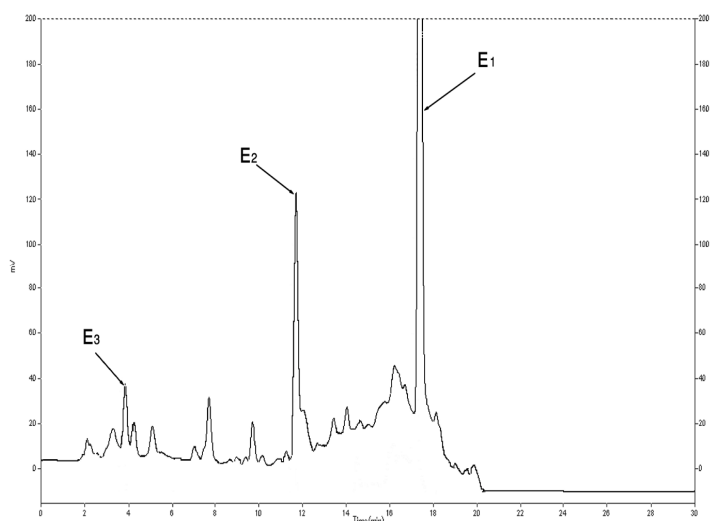
انکوبه کردن نمونه های شیر با آنزیم های دکونژوکه کننده به مدت یک شبانه روز و ارزیابی مقدار تام استروژن ها، نشان داد که همه استروژن های مورد آنالیز با توجه به زمان آبستى، افزایش معنادارى ( $P < 0/05$ ) پیدا کرده بودند (جدول ۳).

مقایسه غلظت استروژن ها در شیرهای خام و پاستوریزه نشان می دهد که پاستوریزاسیون، سطح استروژن ها را به میزان معنادارى تغییر نمی دهد ( $P > 0/05$ ). سطح استریول ( $E_3$ ) در هر دو شیرهای خام و پاستوریزه مشخص نشد زیرا مقدار آن پایین تر از حد تشخیص بود (نمودار ۳).

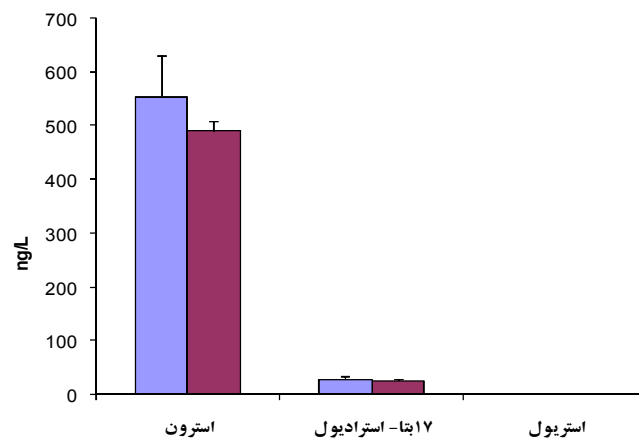
تعیین غلظت استروژن ها در نمونه های شیر در حیوانات آبستن در زمان های مختلف آبستى و مقایسه آن با حیوانات غیرآبستن نشان داد که غلظت استروژن ها بستگی به زمان دوره آبستى دارد. علاوه بر این، افزایش در سطح استرون ( $E_1$ ) و ۱۷ بتا- استرادیول ( $E_2$ ) وقتى



نمودار ۱- کروماتوگرام HPLC همراه با ساختار شیمیایی مربوط به  $E_1$ ,  $E_2$  و  $E_3$  در محلول استاندارد



نمودار ۲- کروماتوگرام HPLC مربوط به  $E_1$ ,  $E_2$  و  $E_3$  در شیر خام تخلیص شده به روش های استخراج شیمیایی و استخراج فاز جامد که به وسیله آشکارساز فلورسانس دیتکت شدند.



نمودار ۳- نمودار مقایسه‌ای تأثیر فرایند پاستوریزاسیون بر غلظت استروژن‌های آزاد در شیر گاومیش‌های غیرآبستن

جدول ۲- میانگین استروژن‌های آزاد (ng/L) در شیر خام حیوانات غیرآبستن و حیوانات آبستن در زمان‌های مختلف آبستنی

غیرآبستن	سه ماهه اول	سه ماهه دوم	سه ماهه سوم	
<sup>a</sup> ۷۷/۰±۵۵۴/۱	<sup>a</sup> ۱۳۶/۱±۷۱۱/۷	<sup>b</sup> ۴۲/۰±۷۷۳/۶	<sup>c</sup> ۱۲۳/۸±۱۰۱۴/۷	E <sub>1</sub>
<sup>a</sup> ۴/۴±۲۸/۱	<sup>a</sup> ۱۱/۴±۳۲/۴	<sup>b</sup> ۱۳/۴±۶۳/۹	<sup>c</sup> ۹/۱±۱۰۸/۲	E <sub>2</sub>
Nd	Nd	Nd	Nd	E <sub>3</sub>

توجه: اعدادی که با حروف انگلیسی غیرمشترک نشان داده شده‌اند بیانگر اختلاف معنادار ( $P < 0.05$ ) در غلظت استروژن‌ها در دوره‌های مختلف اندازه‌گیری شده است. غلظت استروژن‌ها در سه ماهه دوم در سطح  $P < 0.01$  و در سه ماهه سوم در سطح  $P < 0.001$  با غلظت استروژن‌ها در شیر حیوانات غیرآبستن اختلاف معنادار دارد (Nd: not detected).

جدول ۳- میانگین استروژن‌های تام (ng/L) در شیر خام حیوانات غیرآبستن و حیوانات آبستن در زمان‌های مختلف آبستنی

غیرآبستن	سه ماهه اول	سه ماهه دوم	سه ماهه سوم	
<sup>a</sup> ۷۰۱/۶±۴۴/۷	<sup>b</sup> ۱۱۲۷/۹±۹۱/۹	<sup>c</sup> ۱۳۸۲/۸±۱۱۷/۴	<sup>d</sup> ۲۰۵۳/۷±۲۵۲/۳	E <sub>1</sub>
<sup>a</sup> ۵۳/۲±۱۷/۳	<sup>a</sup> ۴۵/۹±۱۱/۲	<sup>b</sup> ۷۲/۷±۷/۳	<sup>c</sup> ۱۱۴/۷±۲۶/۲	E <sub>2</sub>
Nd	Nd	Nd	۱۳/۴±۱/۶	E <sub>3</sub>

توجه: اعدادی که با حروف انگلیسی غیرمشترک نشان داده شده‌اند بیانگر اختلاف معنادار ( $P < 0.05$ ) در غلظت استروژن‌ها در دوره‌های مختلف اندازه‌گیری شده است. غلظت استروژن‌ها در سه ماهه دوم در سطح  $P < 0.01$  و در سه ماهه سوم در سطح  $P < 0.001$  با غلظت استروژن‌ها در شیر حیوانات غیرآبستن اختلاف معنادار دارد (Nd: not detected).

## بحث

مطالعه نشان می‌دهد که پاستوریزاسیون، غلظت هورمون‌های استروژنی را در شیر گاومیش تغییر نمی‌دهد و پیشرفت در طول دوره آبستنی منجر به افزایش معنادار سطح هورمون‌های استروژنی مورد آزمایش در شیر می

مطالعه حاضر برای نخستین بار مقادیر وقوع طبیعی هورمون‌های استروژنی در شیر گاومیش را در ایران و جهان گزارش می‌کند. علاوه بر این، نتایج حاصل از

البته باید توجه شود که سطح همه استروژن‌های آنالیز شده در شیر گاومیش بالاتر از سطح آن‌ها در شیر گاو بر اساس گزارشات قبلی است و این خطر انتقال این ترکیبات از طریق شیر گاومیش را بیشتر می‌کند. تفاوت‌های قابل توجهی بین گاو و گاومیش بر حسب تفاوت‌های ژنتیکی، نیازمندی‌های تغذیه، تولیدمثل و ترکیبات شیر وجود دارد (۲۰-۱۸). بنابراین تفاوت در مقدار استروژن‌های جنسی که در این مطالعه گزارش شد، بین گاو و گاومیش قابل انتظار است. در کنار این، استروئیدهای جنسی، ترکیبات لیپوفیلیک هستند، بنابراین باید بر این حقیقت تأکید کرد که چربی دوستی بالای این ترکیبات سبب تجمع بیشتر آن‌ها در شیر گاومیش می‌شود (۱۳). علاوه بر این، از آنجایی که استروژن‌ها به وسیله ارگان‌های مختلف و بر حسب شرایط فیزیولوژیک حیوان تولید می‌شود، بنابراین تأثیر تفاوت‌های فیزیولوژیکی بین گونه‌های مختلف نباید مستثنی شود. مطالعه حاضر با مطالعات قبلی درباره نقش آبستنی بر روی مقدار هورمون‌های استروژنی در شیر گاو همخوانی دارد. همان‌طوری که در مطالعه‌ای توسط ملکی‌نژاد (Malekinejad) و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش شده است، سطح استروژن‌ها و به خصوص استرون در طول دوره آبستنی افزایش پیدا می‌کند و این افزایش بعد از سه ماهه دوم آبستنی، قابل توجه‌تر است (۲). افزایش مقدار استرون ( $E_1$ ) و ۱۷بتا- استرادیول ( $E_2$ ) در شیر حیوانات آبستن در مقایسه با شیر حیوانات غیرآبستن نشان می‌دهد که افزایش سطح استرون ( $E_1$ ) بیشتر از سطح ۱۷بتا- استرادیول ( $E_2$ ) است. این یافته ما با نتایج مطالعات قبلی که توسط زامبیتو (Zambito) و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام شد و نشان دادند که غلظت استرون ( $E_1$ ) و ۱۷بتا- استرادیول ( $E_2$ ) هم در پلازما و هم در شیر در طول دوره آبستنی افزایش پیدا می‌کند، همخوانی دارد (۲۱). استروژن‌های کونژوکه بیش از ۸۵ درصد مقدار استروژن‌ها را در شیر تشکیل می‌دهد، که از لحاظ فیزیولوژیکی فعال نیستند. در داخل لوله گوارش انسان،

درصد بازیابی برای استروژن‌های مورد آنالیز در نمونه‌های شیر، مقادیر متفاوتی را نشان می‌دهد. گرچه مقادیر بازیابی به دست آمده به نظر پایین می‌رسد، اما آن‌ها در گستره ۵۰- تا ۲۰ درصد که حداقل صحت متد اندازه گیری بر حسب دستورالعمل‌های کمیته اتحادیه اروپا (EU Commission, Decision ۲۰۰۲/۶۵۷) است، قرار دارند (۱۰). نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که پاستوریزاسیون نمونه‌های شیر گاومیش، تأثیر کم و غیر معناداری بر روی غلظت استروژن‌های مورد آنالیز دارد. نتایج ما با مطالعات قبلی که نشان می‌دهد پاستوریزاسیون گرچه سبب کاهش غلظت گلوبول‌های چربی را کاهش می‌دهد اما غلظت استروژن‌ها را در شیر گاو تغییر نمی‌دهد، همخوانی دارد. این مقاومت به گرما شاید به علت استقرار استروژن‌ها در مرکز گلوبول‌های چربی شیر باشد که سبب می‌شود حرارت کافی به آن‌ها نرسد (۱۱). علاوه بر این، خصوصیات مقاوم به گرما بودن ترکیبات استروژنی، ممکن است آن‌ها را در برابر نابودی به وسیله گرما محافظت کند (۱۲). یافته‌های ما در این مطالعه، برای نخستین بار وقوع هورمون‌های استروژنی در شیر گاومیش را تأیید می‌کند و با نتایج مطالعات گذشته در مورد وقوع هورمون‌های استروژنی در شیر گاو همخوانی دارد (۱۴-۱۲). دو منبع برای حضور هورمون‌های استروژنی در شیر شناخته شده است که شامل بیوسنتز استروژن‌ها به وسیله بافت پستانی و استروژن‌های موجود در پلازما است (۱۵ و ۱۶). فاکتورهایی که ممکن است سطح وقوع طبیعی هورمون‌های استروژنی را در شیر و پلازما تغییر دهند شامل شرایط فیزیولوژیک در دوره استروس و تخمک- گذاری حیوانات، ترکیبات جیره غذایی و تجویز داروهای استروژنی و ترکیباتی که به عنوان محرک رشد استفاده می‌شوند، هستند (۱۶ و ۱۷). نتایج نشان می‌دهد که همانند شیر گاو، بیشترین استروژن در نمونه‌های شیر گاومیش، استرون ( $E_1$ ) است و بعد از آن به ترتیب ۱۷بتا- استرادیول ( $E_2$ ) و استریول ( $E_3$ ) قرار دارند. یافته‌های ما با مطالعات قبلی در این مورد مطابقت دارد (۱ و ۲).

چنین اثرات بیولوژیکی از مصرف شیر خام در بین جمعیت‌های انسانی گزارش شده است، ولی شواهد و مدارک علمی کافی برای این ادعا وجود ندارد، زیرا رسیدن به این نتایج، مستلزم ارزیابی میزان کلی قرارگیری در برابر استروژن‌ها، فراهمی‌زیستی این ترکیبات، متابولیسم آن‌ها (به‌خصوص عبور اول کبدی) و حساسیت بافت‌های مختلف است.

### نتیجه‌گیری

این مطالعه حضور هورمون‌های استروئیدی را در شیر گاومیش و همچنین تفاوت در غلظت استروژن‌ها در نمونه‌های شیر در طول زمان‌های مختلف آبستنی را نشان می‌دهد. همچنین یافته‌های ما نشان می‌دهند که غلظت ترکیبات استروژنی در شیر گاومیش‌های آبستن به‌طور معناداری بیشتر از گاومیش‌های غیرآبستن است. از آنجایی که شیرهای تولیدی توسط کارخانجات محصولات لبنی در بعضی از نقاط کشور، مخلوطی از شیر گاو و گاومیش است، بنابراین این نگرانی وجود دارد که ممکن است مصرف این شیرها به‌عنوان مهم‌ترین فاکتور خطر در شروع سرطان‌ها عمل کنند؛ از این رو باید توجه بیشتری در ارتباط با مصرف شیر حیوانات آبستن به‌خصوص در اواخر دوره آبستنی به‌دلیل افزایش این هورمون‌ها صورت گیرد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از آقای زکریا وهاب‌زاده (انستیتو تحقیقاتی آرتمیا و جانوران آبی دانشگاه ارومیه) تشکر و قدردانی می‌نمایند.

استروژن‌های کونژوگه می‌توانند شکسته شوند و تبدیل به استروژن‌های آزاد شوند که فرم فعال آن‌ها است. این آزادسازی به‌کمک آنزیم‌های سولفاتاز باکتریایی یا گلوکورونیداز انسانی صورت می‌گیرد. فعالیت استروژنیک استروژن‌های دیتکت‌شده به‌ترتیب ذیل است:  $\beta E_2 > E_1 >> E_3$ . نشان داده شده استرون ( $E_1$ ) در سلول‌های هامستر، یک ماده سرطانزای قوی است. استرون ( $E_1$ ) و ۱۷بتا-استرادیول ( $E_2$ ) حدود ۸۰ درصد میزان کل استروژن‌های شیر را تشکیل می‌دهند که در صورت آزادسازی در داخل لوله گوارش ممکن است فعالیت استروژنیک و کارسینوژنیک قابل‌توجهی را بروز دهند (۲). در انسان بیشتر از ۳۰ فرم سیتوکروم P450 تشخیص داده شده که نقش بعضی از آن‌ها در تولید متابولیت‌های هیدروکسیله استروژن‌ها آشکار شده است. مطالعات نشان داده‌اند که سیتوکروم P450 1A1/1A2 و P450 1B1، استرون ( $E_1$ ) و ۱۷بتا-استرادیول ( $E_2$ ) را به‌ترتیب در موقعیت‌های ۲ و ۴ هیدروکسیله می‌کنند و متابولیت‌های ۴-هیدروکسی استرون و ۴-هیدروکسی ۱۷بتا-استرادیول در سرطانزایی نقش دارند (۲۲).

گرچه بدون شک شیر یکی از منابع با ارزش تغذیه انسان و حیوانات جوان به‌شمار می‌آید، نگرانی‌های روبه‌رشدی در ارتباط با سلامت شیر به‌علت وجود هورمون‌های استروئیدی وجود دارد. نتایج مطالعات اپیدمیولوژیک متعددی نشان می‌دهد که حضور هورمون‌های استروئیدی در شیر گاو این خطر را به وجود می‌آورد که مصرف طولانی‌مدت فرآورده‌های لبنی حاوی این ترکیبات، ممکن است ریسک سرطان سینه، پروستات و رحم را افزایش دهند (۲۶-۲۳). باید توجه شود گرچه

### References

1. Tso J, Aga DS. A systematic investigation to optimize simultaneous extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of estrogens and their conjugated metabolites in milk. *J Chromatogr A* 2010;1217(29):4784-95.
2. Malekinejad H, Scherpenisse P, Bergwerff AA. Naturally occurring estrogens in processed milk and in raw milk (from gestated cows). *J Agric Food Chem* 2006;54(26):9785-91.
3. Gatti R, Gioia MG, Di Pietra AM, Cavrini V. HPLC-fluorescence determination of unconjugated estrogens in pharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal* 1998;18(1-2):187-92.



4. Ménard O, Ahmad S, Rousseau F, Briard-Bion V, Gaucheron F, Lopez C. Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane. *Food Chem* 2010; 120(2): 544-51.
5. Amaral ME, Grant JR, Riggs PK, Stafuzza NB, Filho EA, Goldammer T, et al. A first generation whole genome RH map of the river buffalo with comparison to domestic cattle. *BMC Genomics* 2008;9:631.
6. Hassan M, Fatemeh R, Kobra B. Zearalenone is bioactivated in the river Buffalo (*Bubalus bubalis*): hepatic biotransformation. *Trop Anim Health Prod* 2010;42(6):1229-34.
7. James CS. Analytical chemistry of foods. 1<sup>st</sup> ed. Glasgow UK: Chapman & Hall 1995
8. Khosrowshahi A, Madadlou A, Ebrahim zadeh Mousavi M, Emam-Djomeh Z. Monitoring the chemical and textural changes during ripening of Iranian White cheese made with different concentrations of starter. *J Dairy Sci* 2006;89(9):3318-25.
9. Xu X, Keefer LK, Waterhouse DJ, Saavedra JE, Veenstra TD, Ziegler RG. Measuring seven endogenous ketolic estrogens simultaneously in human urine by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem* 2004;76(19):5829-36.
10. EU Commission. Commission Decision EC 2002/657 of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eur Communities* 2002; L221/8, 17.8.2002.
11. Pape-Zambito DA, Roberts RF, Kensinger RS. Estrone and 17beta-estradiol concentrations in pasteurized-homogenized milk and commercial dairy products. *J Dairy Sci* 2010;93(6):2533-40.
12. Fritsche S, Steinhart H. Occurrence of hormonally active compounds in food: a review. *Euro Food Res Technol* 1999; 209(3-4): 153-79.
13. Hartmann S, Lacorn M, Steinhart H. Natural occurrence of steroid hormones in food. *Food Chem* 1998; 62(1): 7-20.
14. Pape-Zambito DA, Magliaro AL, Kensinger RS. Concentrations of 17beta-estradiol in Holstein whole milk. *J Dairy Sci* 2007;90(7):3308-13.
15. Batra SK, Arora RC, Bachlaus NK, Pahwa GS, Pandey RS. Quantitative relationships between oestradiol-17beta in the milk and blood of lactating buffaloes. *J Endocrinol* 1980;84(2):205-9.
16. Janowski T, Zduńczyk S, Malecki-Tepicht J, Barański W, Raś A. Mammary secretion of oestrogens in the cow. *Domest Anim Endocrinol* 2002;23(1-2):125-37.
17. Lopez H, Bunch TD, Shipka MP. Estrogen concentrations in milk at estrus and ovulation in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2002;72(1-2):37-46.
18. Jindal SR, Maiti NK, Oberoi MS. Genomic diversity and prevalence of Rotavirus in cow and buffalo calves in northern India. *Rev Sci Tech* 2000;19(3):871-6.
19. Perera BM. Reproduction in domestic buffalo. *Reprod Domest Anim* 2008;43 Suppl 2:200-6.
20. Zicarelli L. Buffalo milk: its properties, dairy yield and mozzarella production. *Vet Res Commun* 2004;28 Suppl 1:127-35.
21. Pape-Zambito DA, Magliaro AL, Kensinger RS. 17Beta-estradiol and estrone concentrations in plasma and milk during bovine pregnancy. *J Dairy Sci* 2008;91(1):127-35.
22. Bolton JL, Thatcher GR. Potential mechanisms of estrogen quinone carcinogenesis. *Chem Res Toxicol* 2008;21(1):93-101.
23. Ganmaa D, Sato A. The possible role of female sex hormones in milk from pregnant cows in the development of breast, ovarian and corpus uteri cancers. *Med Hypotheses* 2005;65(6):1028-37.
24. Ganmaa D, Tezuka H, Enkhmaa D, Hoshi K, Sato A. Commercial cows' milk has uterotrophic activity on the uteri of young ovariectomized rats and immature rats. *Int J Cancer* 2006;118(9):2363-5.
25. Li XM, Ganmaa D, Qin LQ, Liu XF, Sato A. The effects of estrogen-like products in milk on prostate and testes. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2003 Jun;9(3):186-90.
26. Qin LQ, Wang PY, Kaneko T, Hoshi K, Sato A. Estrogen: one of the risk factors in milk for prostate cancer. *Med Hypotheses* 2004;62(1):133-42.