بررسی هورمون‌های استروئیدی در شیرگاومیش‌های غیر باردار و در دوره‌های مختلف بارداری

یاسر شهبازی[۱]*؛ حسین تاجیک[۲]؛ حسن ملکی‌نژاد[۳]

چکیده

زمینه: شیر یکی از منابع با ارزش تغذیه انسان است. اما اخیراً گزارشاتی وجود دارد که سلامت آن را به‌دلیل وجود هورمون‌های استروئیدی زیرسؤال برده است. مطالعه حاضر به‌منظور بررسی میزان وقوع هورمون‌های استروژنی شامل استرون، ۱۷بتا- استرادیول و استریول در شیر خام و پاستوریزه گاومیش‌های آبستن و غیرآبستن انجام گردید.

روش‌ها: نمونه‌های شیر جمع‌آوری‌شده با استفاده از روش‌های استخراج مایع- مایع، غیرکونژوکه شدن با آنزیم گلوکورونیداز/ 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 (۵۵٤/۱±۷۷/۰ng/L) و تام (۷۰۱/۱٦±٤٤/۷ng/L) استرون دارای بیشترین مقدار بودند و به‌دنبال آن ۱۷بتا- استرادیول (E_2) بیشترین سهم را به خود اختصاص داده بود درحالی‌که مقادیر استریول (E_3) پایین‌تر از حد تشخیص بود (۱۰ng/L). کمترین (E_2:۲۸/۱±٤/٤ng/L و E_1:۵۵٤/۱±۷۷/۰) و بیشترین (E_2:۱۰۸/۲±۹/۱ng/L و E_1:۱۰۱٤/۷±۱۲۳/۸) غلظت استروژن‌ها در شیرخام، به‌ترتیب در حیوانات غیرآبستن و در سه ماهه سوم آبستنی تشخیص داده شد. غلظت استروژن‌ها در شیرهای پاستوریزه، تفاوت معناداری ($P>۰/۰۵$) را با غلظت آنها در شیرهای خام نشان نداد.

نتیجه‌گیری: شیر گاومیش به‌دلیل دارا بودن چربی بیشتر، حاوی مقادیر بیشتری از هورمون‌های استروژنی است؛ از این‌رو مصرف شیر گاومیش، به‌ویژه 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: ۱۳۸۹/٦/۵ 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: ۰۸۳۱-۸۳۲۲۵۹۹، فاکس: ۰۸۳۱-۸۳۲۰۰٤۱

Email: Yasser.shahbazi@yahoo.com

مقدمه

شیر یکی از منابع با ارزش تغذیه انسان است. اما اخیراً گزارشاتی وجود دارد که سلامت آن را به‌دلیل 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 قراردهند. از این‌رو آنالیز استروژن‌ها و متابولیت‌های کونژوکه آن (استروژن‌های گلوکورونیده و سولفاته) در شیر بیشترین اهمیت را دارد. شیر حاوی استروژن‌هایی از قبیل استرون (E_1)، استرادیول (E_2) و استریول (E_3) و متابولیت‌های گلوکورونیده و سولفاته آن‌ها است. یکی از دلایل افزایش شیوع اختلالات تولیدمثلی در جنس نر، مانند سرطان بیضه، پروستات و کیفیت پایین منی به‌علت دریافت مقادیر بالای استروژن از طریق شیر مصرفی است. اخیراً شواهدی ارایه شده که نشان‌دهنده ارتباط قوی بین

Archive of SID

www.SID.ir

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 چربی‌دوست هستند و در مرکز گلبول 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 اما شیر گاو ۳/۵–۳ درصد چربی دارد (٤).

گاومیش رودخانه‌ای (*Bubalus bubalis*) یکی از گونه‌های حیوانی است که در زمره حیوانات تولیدکننده محصولات با منشأ دامی قرار می‌گیرد. این‌گونه به‌همراه 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 کشورهایی است که گاومیش‌های رودخانه‌ای در استان‌های جنوب غربی (خوزستان) و شمال‌غربی (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 (٦).

از آن‌جایی که شیر گاومیش دارای میزان چربی بالایی است لذا تصور می‌شود که حاوی مقدار زیادی از هورمون‌های استروژنی باشد و مصرف آن ممکن است اثرات نامطلوب و ناخواسته‌ای بر روی سلامت انسان به‌خصوص سیستم اندوکرینی بگذارد. از این‌رو 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 شمال‌غرب کشور نگه‌داری می‌شدند، جمع‌آوری شد. همچنین نمونه‌های شیر خام از گاومیش‌های رودخانه‌ای (*Bubalus bubali*)

Archive of SID

www.SID.ir

که در سه‌ماهه اول آبستنی (هشت رأس حیوان)، سه‌ماهه دوم آبستنی (هشت رأس حیوان) و سه‌ماهه 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 سه‌ماهه اول، دوم و سوم آبستنی) در دمای ٦٥°C و به‌مدت 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_1)، ۱۷بتا- استرادیول (E_2) و استریول (E_3) از شرکت سیگما (St. Louis, MO) خریداری شدند. برای به‌دست 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 ٤°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 ٤°C نگه‌داری شدند.

متانول، استونیتریل، هگزان و دی‌کلرومتان (DCM) با خلوص HPLC از شرکت مرک (Merck) (آلمان) خریداری شدند. آنزیم گلوکورونیداز/سولفاتاز استخراج‌شده ازHelix pomatia از شرکت سیگما خریداری شد. استیک اسید با خلوص تجزیه‌ای از شرکت مرک (Merck) (آلمان) خریداری شد. ستون‌های C_{18} 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 یخ‌زده‌شده در دمای اتاق در داخل حمام آب گرم، گرم شدند. حجمی به اندازه ۱۰mL از نمونه‌های شیر به داخل لوله‌های شیشه‌ای (١٦ mm i.d. ١٥ mm) انتقال پیدا کردند. بعد از ورتکس به‌مدت ۱۵ ثانیه، نمونه‌ها در داخل حمام آب گرم اولتراسونیک به‌مدت ۳۰ دقیقه هموژن شدند.

برای تعیین مقدار تام (فرم آزاد و غیرکونژوکه‌شده) استروژن‌ها در نمونه‌های شیر، ۲mL از محلول (حجمی- حجمی) ۲ درصد اسید استیک به نمونه‌های هموژن‌شده اضافه شد و مخلوط با ۵۰۰ واحد آنزیم گلوکورونیداز/ سولفاتاز که در ۱۰۰µLبافر استات با غلظت ٤۰mM و با pH ۵/۳ حل شده بود تحت درمان قرار گرفتند. بعد از ورتکس، مخلوط به‌مدت یک شبانه روز (Over night) در دمای ۳۷°C انکوبه شد (۹). نمونه‌های کنترل با اسپایک‌شده (Spiking) نمونه‌های شیر به‌وسیله مخلوطی از استانداردهای استروژن برای به‌دست 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 (به‌نسبت ۸:۲ حجمی- حجمی) به همه نمونه‌ها شامل اسپایک‌شده، اسپایک‌نشده، یا نمونه‌های تیمارشده با آنزیم بتا-گلوکورونیداز/ سولفاتاز اضافه شد. سپس نمونه‌ها به‌شدت به‌مدت ۱۰ دقیقه در۵۰۰rpm بر روی شیکر پلات فرم مخلوط و سپس در ۲۰۰۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤°C سانتریفیوژ 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 به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از جدا کردن لایه هگزان، ۱۵mL از دی‌کلرومتان (DCM) به محلول باقیمانده اضافه شد و سپس به‌مدت ۱۵ ثانیه ورتکس شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰rpm بر روی شیکر پلات فرم مخلوط شدند و سپس مجدداً در ۲۰۰۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤°C سانتریفیوژ 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، هموژن و

Archive of SID

www.SID.ir

نهایتاً خشک شد.

مواد باقی‌مانده از استخراج شیمیایی مجدداً در ۰/۵mL از متانول حل شدند و به‌دنبال مخلوط کردن با ورتکس، ٤/٥mL آب به آن اضافه شد. بعد از هموژنیزاسیون، محلول با دقت از ستون‌های SPE C_{18} (۵۰۰ mg;۳mL) که قبلاً با ۵mL متانول و ۵mL آب به ترتیب فعال و آماده شده بود عبور داده شد. ستون سپس با۵mL آب شسته شد و در زیر گاز نیتروژن خشک شد. استروژن‌ها به‌وسیله ٤mL اتانول شسته شدند و حلالی که حاوی اجزاء نمونه بود در زیر جریان گاز نیتروژن در دمای اتاق خشک شد. مواد باقی‌مانده در ۲۰۰µL فاز متحرک حل شده و ۲۰µL 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 (Autosapmpler Tirathlon ۹۰۰Germany) و دو پمپ (pump , K –۱۰۰۱, KNAVER Germany) HPLC Wellchrom بود. ستون HPLC (Gravity، ۵um، C۱۸ (۱۵۰×٤/٦mm) بود که با فاز متحرک A که شامل مخلوطی از استونیتریل، آب و اسید فرمیک به نسبت ۰/٤: ٦۰: ٤۰ (حجمی– حجمی– حجمی) و فاز متحرک B که شامل استونیتریل، آب و اسید فرمیک با نسبت ۰/٤: ۱۰: ۹۰ (حجمی– حجمی– حجمی) بود شسته شد. سرعت جریان در ۲۰۰ میکرولیتر در دقیقه تنظیم شد که به‌وسیله یک گرادیانت خطی به‌ترتیب ذیل اجرا شد: ۱۰۰ درصد A برای ۱ دقیقه که بعد از ۹ دقیقه به ۱۰۰ درصد B رسید و سپس به‌مدت ۱٤ دقیقه، ۱۰۰ درصد B ادامه پیدا کرد. سپس ستون HPLC به‌مدت ۱۰ دقیقه قبل از تزریق بعدی با ۱۰۰ درصد A شسته شد. استروژن‌ها به‌وسیله آشکارساز فلورسانس، دیتکت شدند (Germany، AXL RF-۱۰KNAUER) . طول موج برانگیختگی و نشر به‌ترتیب ۲۸۰ و ۳۰۰ نانومتر بود.

تعیین غلظت هورمون‌های استروئیدی به‌وسیله منحنی‌های کالیبراسیون که نخست برای هر استاندارد به‌دست 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 به‌دست آمد. تفاوت بین مقادیر استروژن در حیوانات غیرآبستن و آبستن و در ماه‌های مختلف آبستنی به‌ترتیب با ANOVA یک‌طرفه و تست bonferronic انجام شد.

یافته‌ها

در تمام نمونه‌های شیر مورد مطالعه، میزان درصد چربی اندازه‌گیری شد و مقادیر به‌دست‌آمده (٤/٩٥±۰/٤۲٪) با درصد چربی شیر گاو (۳/۲±۰/۱٤٪) 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 به‌ترتیب برای استرون (E_1) و استریول (E_3) به‌دست 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)	۷۵/۵۳±۱۳/۱۷	۵
استروژن (E_2)	۷۲/۲۱±۱٦/۱	۵
استروژن (E_3)	۵۵/۳۹± ۸/۹۱	۱۰

*درصد بازیابی با سه بارتکرار آزمایشات، محاسبه و به‌صورت مقادیرمیانگین± انحراف استاندارد بیان شده است.

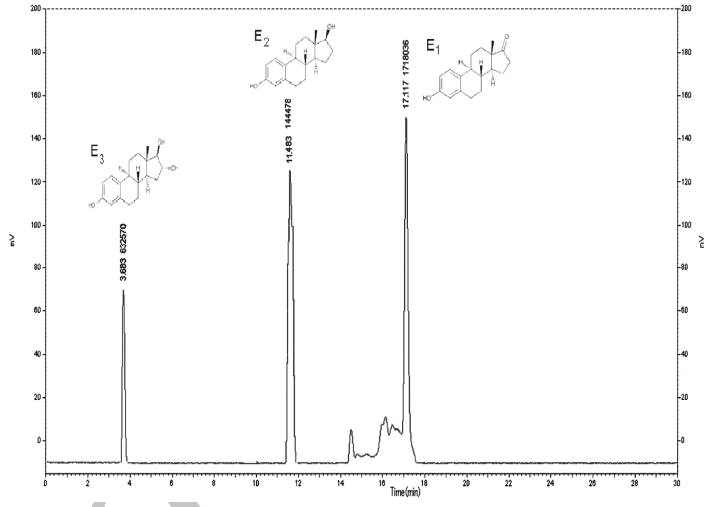
Archive of SID

www.SID.ir

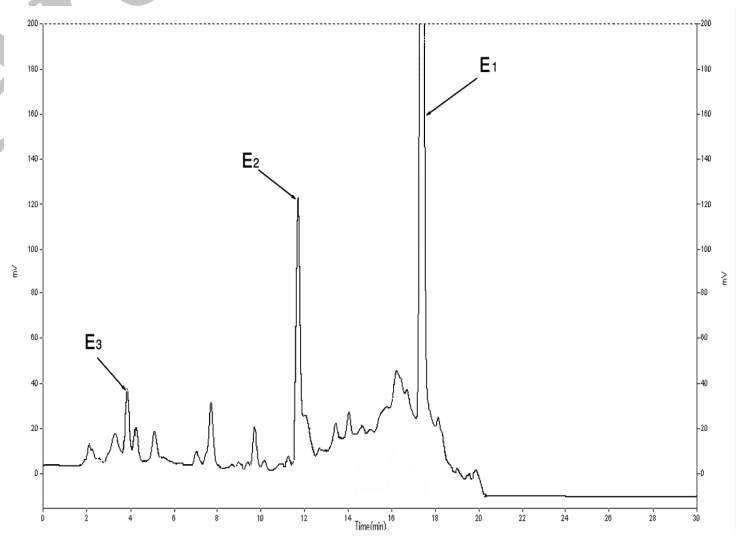
مقایسه غلظت استروژن‌ها در شیرهای خام و پاستوریزه نشان می‌دهد که پاستوریزاسیون، سطح استروژن‌ها را به‌میزان معناداری تغییر نمی‌دهد (P>۰/۰۵). سطح استریول (E_3) در هر دو شیرهای خام و پاستوریزه مشخص نشد زیرا مقدار آن پایین‌تر از حد تشخیص بود (نمودار ۳).

تعیین غلظت استروژن‌ها در نمونه‌های شیر در حیوانات آبستن در زمان‌های مختلف آبستنی و مقایسه آن با حیوانات غیرآبستن نشان داد که غلظت استروژن‌ها بستگی به زمان دوره آبستنی دارد. علاوه بر این، افزایش در سطح استرون (E1) و ۱۷ بتا- استرادیول (E2) وقتی نمونه های شیر سه ماهه دوم وسوم آنالیز شدند، معنادار بود (P< ۰/۰۵). سطح استریول (E_3) در نمونه‌های شیر سه‌ماهه سوم قابل اندازه‌گیری بود و این بیانگر افزایش قابل‌توجه این هورمون در طول دوره آبستنی است (جدول ۲ و۳).

انکوبه کردن نمونه‌های شیر با آنزیم‌های دکونژوکه‌کننده به‌مدت یک شبانه روز و ارزیابی مقدار تام استروژن‌ها، نشان داد که همه استروژن‌های مورد آنالیز باتوجه به زمان آبستنی، افزایش معناداری (P<۰/۰۵) پیدا کرده بودند (جدول ۳).

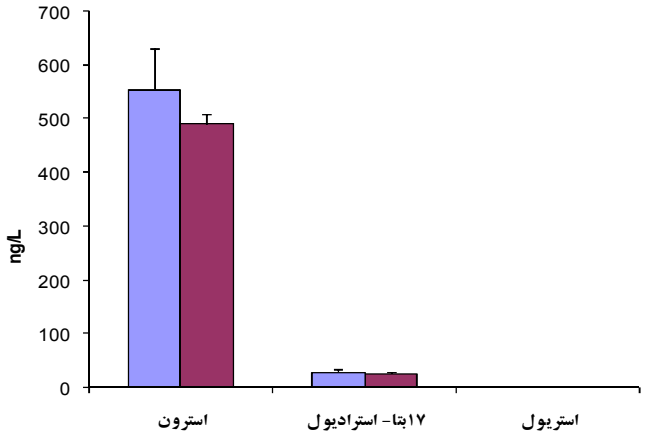


نمودار ۱- کروماتوگرام HPLC همراه با ساختار شیمیایی مربوط به E_1، E_2 وE_3 در محلول استاندارد



نمودار ۲- کروماتوگرام HPLC مربوط به E_1، E_2 وE_3 در شیر خام تخلیص‌شده به روش‌های استخراج شیمیایی و استخراج فاز جامد که به‌وسیله آشکارساز فلورسانس دیتکت شدند.

www.SID.ir



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
E_1	^{a}۷۷/۰±۵۵٤/۱	^{a}۱۳٦/۱±۷۱۱/۷	^{b} ٤۲/ ۰±۷۷۳/٦	^{c}۱۲۳/۸±۱۰۱٤/۷
E_2	^{a}٤/٤±۲۸/۱	^{a}۱۱/٤±۳۲/٤	^{b}۱۳/٤±٦۳/۹	^{c} ۹/۱±۱۰۸/۲
E_3	Nd	Nd	Nd	Nd

توجه: اعدادی که با حروف انگلیسی غیرمشترک نشان داده شده‌اند بیانگر اختلاف معنادار (P<۰/۰۵) در غلظت استروژن‌ها در دوره‌های مختلف اندازه‌گیری شده است. غلظت استروژن‌ها در سه‌ماهه دوم در سطح P< ۰/۰۱ و در سه ماهه سوم در سطح P<۰/۰۰۱ 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

	غیر آبستن	سه ماهه اول	سه ماهه دوم	سه ماهه سوم
E_1	^{a} ۷۰۱/٦±٤٤/۷	^{b}۱۱۲۷/۹±۹۱/۹	^{c}۱۳۸۲/۸±۱۱۷/٤	^{d}۲۰۵۳/۷±۲۵۲/۳
E_2	^{a}۵۳/۲±۱۷/۳	^{a}٤۵/۹±۱۱/۲	^{b}۷۲/۷±۷/۳	^{c}۱۱٤/۷±۲٦/۲
E_3	Nd	Nd	Nd	۱۳/٤±۱/٦

توجه: اعدادی که با حروف انگلیسی غیرمشترک نشان داده شده‌اند بیانگر اختلاف معنادار (P<۰/۰۵) در غلظت استروژن‌ها دردوره‌های مختلف اندازه‌گیری شده است. غلظت استروژن‌ها در سه ماهه دوم در سطح P<۰/۰۱ و در سه ماهه سوم در سطح P<۰/۰۰۱ با غلظت استروژن‌ها در شیر حیوانات غیرآبستن اختلاف معنادار دارد (Nd: not detected).

بحث

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

Archive of SID

www.SID.ir

شود. درصد بازیابی برای استروژن‌های مورد آنالیز در نمونه‌های شیر، مقادیر متفاوتی را نشان می‌دهد. گرچه مقادیر بازیابی به‌دست‌آمده به‌نظر پایین می‌رسد، اما آن‌ها در گستره ۵۰- تا ۲۰ درصد که حداقل صحت متد اندازه گیری بر حسب دستورالعمل‌های کمیته اتحادیه اروپا (EUCommission, Decision ۲۰۰۲/٦٥٧) 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 سایز گلبول‌های چربی را کاهش می‌دهد اما غلظت استروژن‌ها را در شیر گاو تغییر نمی‌دهد، همخوانی دارد. این مقاومت به گرما شاید به‌علت استقرار استروژن‌ها در مرکز گلبول‌های 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 به‌وسیله گرما محافظت کند (۱۲). یافته‌های ما در این مطالعه، برای نخستین‌بار وقوع هورمون‌های استروژنی در شیر گاومیش را تأیید می‌کند و با نتایج مطالعات گذشته در مورد وقوع هورمون‌های استروژنی در شیر گاو همخوانی دارد (۱٤-۱۲). دو منبع برای حضور هورمون‌های استروژنی در شیر شناخته شده است که شامل بیوسنتز استروژن‌ها به‌وسیله بافت پستانی و استروژن‌های موجود در پلاسما است (۱۵ و ۱٦). فاکتورهایی که ممکن است سطح وقوع طبیعی هورمون‌های استروژنی را در شیر و پلاسما تغییر دهند شامل شرایط فیزیولوژیک در دوره استروس و تخمک-گذاری حیوانات، ترکیبات جیره غذایی و تجویز داروهای استروژنی و ترکیباتی که به‌عنوان محرک رشد استفاده می‌شوند، هستند (۱٦ و ۱۷). نتایج نشان می‌دهد که همانند شیر گاو، بیشترین استروژن در نمونه‌های شیر گاومیش، استرون (E_1) است و بعد از آن به‌ترتیب ۱۷بتا- استرادیول (E_2) و استریول (E_3) قرار دارند. یافته‌های ما با مطالعات قبلی در این مورد مطابقت دارد (۱ و ۲).

البته باید توجه شود که سطح همه استروژن‌های آنالیزشده 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 قابل‌توجهی 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 چربی‌دوستی بالای این ترکیبات سبب تجمع بیشتر آن‌ها در شیر گاومیش می‌شود (۱۳). علاوه بر این، از آنجایی‌که استروژن‌ها به‌وسیله 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. همان‌طوری‌که در مطالعه‌ای توسط ملکی‌نژاد (Malekinejad) و همکاران در سال ۲۰۰٦ گزارش شده است، سطح استروژن‌ها و به‌خصوص استرون در طول دوره آبستنی افزایش پیدا می‌کند و این افزایش بعد از سه‌ماهه دوم آبستنی، قابل‌توجه‌تر 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 پلاسما 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،

Archive of SID

www.SID.ir

استروژن‌های کونژوکه 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 ٤ هیدروکسیله می‌کنند و متابولیت‌های ٤- هیدروکسی استرون و ٤-هیدروکسی۱۷بتا- 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 (۲٦-۲۳). باید توجه شود گرچه 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 این‌رو 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 آبزی دانشگاه ارومیه) تشکر و قدردانی می‌نمایند.

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.

Archive of SID

www.SID.ir

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. 1st 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.

www.SID.ir