

## بررسی میزان وقوع طبیعی هورمون‌های استروژنی در شیر گاو با روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مجهز به آشکار ساز فلورسانس

دکتر یاسر شهبازی<sup>۱</sup>، دکتر حسین تاجیک<sup>۲\*</sup>، دکتر حسن ملکی نژاد<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت ۸۹/۷/۲۵، تاریخ پذیرش ۸۹/۱۱/۱۹

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** هورمون‌های استروئیدی ترکیبات طبیعی با فعالیت بیولوژیک هستند که در دامپزشکی ممکن است به‌طور قانونی و غیرقانونی مورد استفاده قرار گیرند. مطالعه حاضر به منظور بررسی میزان وقوع هورمون‌های استروژنی شامل استرون، ۱۷-بتا- استرادیول و استریول در شیر خام و پاستوریزه گاوهای آبستن و غیر آبستن انجام گردید.

**مواد و روش کار:** نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده ( $n=32$ ) 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 نهایتاً استروژن‌ها با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با آشکار ساز فلورسانس آنالیز گردیدند. **یافته‌ها:** مقادیر آزاد و تام استرون دارای بیشترین مقدار و به‌دنبال آن ۱۷-بتا- استرادیول بیشترین سهم را به خود اختصاص داده بود در حالی که مقادیر استریول پایین‌تر از حد تشخیص بود ( $10 \text{ ng/L}$ ). کم‌ترین ( $E1: 369.5 \pm 97.5$ ,  $E2: 17.1 \pm 2.3 \text{ ng/L}$ ) و بیشترین ( $E1: 995.9 \pm 93.9$  and  $E2: 32.9 \pm 2.1 \text{ ng/L}$ ) غلظت استروژن‌ها در شیر خام به ترتیب در حیوانات غیر آبستن و در سه ماهه سوم آبستنی تشخیص داده شد. غلظت استروژن‌ها در شیرهای پاستوریزه تفاوت معنی‌داری را با غلظت آن‌ها در شیرهای خام نشان ندادند ( $P > 0.05$ ).

**بحث و نتیجه‌گیری:** مطالعه حاضر نشان می‌دهد که مصرف شیر حیوانات آبستن (که دارای بیشترین مقدار هورمون‌های استروئیدی هستند) باید به وسیله مصرف کنندگان با دقت بیشتری صورت گیرد و کنترل شدیدتری از سوی نهادهای کنترل مواد غذایی انجام گیرد تا از اثرات احتمالی استروژنیک و سرطان زایی ترکیبات فوق جلوگیری شود.

**کلید واژه‌ها:** هورمون‌های استروئیدی، شیر گاو، سرطان‌زایی، پاستوریزاسیون

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و دوم، شماره اول، ص ۷۰-۶۲، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۰

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، صندوق پستی ۱۱۷۷، تلفن: ۰۴۴۱-۲۷۷۰۵۰۸

Email: h.tajik@urmia.ac.ir

### مقدمه

هورمون‌های استروئیدی ترکیباتی هستند که از کلسترول مشتق می‌شوند. این هورمون‌ها ترکیباتی چربی‌دوست، با وزن مولکولی پایین و از لحاظ بیولوژیکی فعال هستند که بر اساس گروه عملکردی که به ساختار فنلی آن‌ها می‌چسبد از هم متفاوت می‌گردند. هورمون‌های استروئیدی بر اساس فعالیت فارماکولوژی و بیولوژیکی به دو گروه تقسیم می‌شوند. گروه نخست که تحت عنوان هورمون‌های جنسی شناخته می‌شوند، شامل استروژن‌ها و آندروژن‌ها هستند و گروه دوم که کورتیکواستروئیدها

نامیده می‌شوند شامل گلوکوکورتیکواستروئیدها و مینرالوکورتیکواستروئیدها هستند. طبقه بندی دیگر استروئیدها براساس منشاء آن‌ها است که به دو دسته با منشاء داخلی و خارجی تقسیم می‌شوند. استروئیدها با منشاء داخلی ترکیباتی هستند که در داخل بدن تولید می‌شوند و علاوه بر نقش کلیدی که در فرایند تولید مثل دارند، متابولیسم مینرال‌ها، چربی‌ها، قندها و پروتئین‌ها را هم در انسان و هم در حیوانات تحت تأثیر قرار می‌دهند (۱). اما هورمون‌های استروئیدی با منشاء خارجی ممکن است یا به وسیله دامپزشکان به صورت قانونی برای مقاصد

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری تخصصی گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

<sup>۲</sup> دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)

<sup>۳</sup> استادیار گروه فارماکولوژی و توکسیکولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

## مواد و روش کار

### معرف‌ها و مواد شیمیایی

مواد مصرفی در این مطالعه عبارتند از: استرون ( $E_1$ )، ۱۷بتا-استرادیول ( $E_2$ ) و استریول ( $E_3$ ) که از شرکت سیگما<sup>۱</sup> (St. Louis, MO) خریداری شدند. برای بدست آوردن غلظت  $10 \text{ mg/mL}$  استروژن‌ها در متانول حل شدند و محلول‌های ذخیره<sup>۲</sup> در دمای  $20^\circ\text{C}$  - نگهداری گردیدند. محلول‌های کاری<sup>۳</sup> در غلظت مناسب تهیه و در دمای  $4^\circ\text{C}$  نگهداری شدند. یک محلول استاندارد کاری<sup>۴</sup> با غلظت  $1/10 \text{ mg/mL}$  برای هر یک از مواد تهیه و در دمای  $4^\circ\text{C}$  نگهداری شدند.

متانول، استونیتریل، هگزان و دی‌کلرومتان (DCM) با خلوص HPLC از شرکت مرک<sup>۵</sup> (آلمان)، آنزیم گلوکوکورونیداز/سولفاتاز استخراج شده از *Helix pomatia* از شرکت سیگما خریداری شد. اسید استیک با خلوص تجزیه‌ای از شرکت مرک (آلمان) تهیه شد. ستون‌های  $\text{C}_{18}$  SPE با مشخصات  $500 \text{ mg}$ ،  $3 \text{ mL}$  از J. T. Baker (هلند) خریداری شدند. آب مصرفی هم با استفاده از سیستم Milli-Q خالص سازی شد (Millipore, Bedford, MA).

### جمع آوری نمونه‌ها

نمونه‌های شیر خام از هشت گاو غیر آبستن نژاد هلشتاین - فریژین که در مزرعه آزمایشی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه نگهداری می‌شدند، جمع آوری شدند. همچنین نمونه‌های شیر خام از گاوهای نژاد هلشتاین - فریژین که در سه ماهه اول آبستنی (هشت رأس حیوان)، در سه ماهه دوم آبستنی (هشت رأس حیوان) و در سه ماهه سوم آبستنی (هشت رأس حیوان) بودند و بر اساس زمان تلقیح و معاینه دامپزشک سن آبستنی آن‌ها تعیین شده بود، جمع آوری شدند. برای پاستوریزاسیون نمونه‌های شیر خام (هشت نمونه) از گاوهای غیر آبستن و گاوهای آبستن در سه ماهه اول، دوم و سوم آبستنی با هم مخلوط شده و در دمای  $65^\circ\text{C}$  و به مدت ۵ دقیقه پاستوریزه شدند و میزان چربی نمونه‌ها با استفاده از روش ژربر<sup>۶</sup> تعیین گردید (۹،۱۰). نمونه‌های شیر تا زمان آنالیز در دمای  $20^\circ\text{C}$  - نگهداری شدند.

### آماده سازی نمونه‌ها و هیدرولیز

نمونه‌های شیر یخ زده شده در دمای  $37^\circ\text{C}$  در داخل حمام آب گرم، گرم شدند. حجمی به اندازه  $10 \text{ mL}$  از نمونه‌های شیر به داخل لوله‌های شیشه‌ای ( $15 \text{ mm}$  i.d.  $16 \text{ mm}$ ) انتقال پیدا

درمانی تجویز شوند و یا این‌که به صورت غیرقانونی برای افزایش رشد در حیوانات بکار برده شوند، که در هر دو حالت استفاده نامناسب از استروژن‌ها موجب تجمع آن‌ها در بافت‌های خوراکی حیوانات و شیر می‌شود. شکی وجود ندارد که وقوع طبیعی هورمون‌های استروژنی نقش کلیدی در هموستاز بیولوژیکی در انسان و حیوانات بازی می‌کنند. به هر حال در دهه گذشته بیشترین مطالعات بر روی نقش این ترکیبات در تحریک و افزایش میزان سرطان سینه، پروستات و تخمدان متمرکز شده است (۳،۲).

مطالعات اپیدمیولوژیکی زیادی در ارتباط با مصرف محصولات لبنی و افزایش میزان سرطان سینه و پروستات وجود دارد. به عنوان مثال اخیراً یک ارتباط مثبت معنی‌دار بین میزان مصرف شیر و افزایش بروز سرطان تخمدان در زنان سوئدی مشاهده شده است (۴). در این خصوص یک مطالعه دیگر ارتباط قابل توجهی بین میزان سرطان سینه و پروستات و مصرف شیر را در جمعیت ژاپن بعد جنگ جهانی دوم نشان می‌دهد (۵،۶). بعلاوه، تعدادی مطالعات آزمایشگاهی در حیوانات وجود دارند که سرطان زائی استروژن‌ها را تأیید می‌کنند (۲). منبع اصلی استروژن‌های منتج شده از حیوانات در رژیم غذایی انسان ترکیبات لبنی و به خصوص شیر است (۷). در سال‌های اخیر با استفاده از ترکیب مناسب علوفه سبز و کنسانتره و همچنین تغییرات ژنتیکی و اصلاح نژاد به حیوانات (گاوها) اجازه داده می‌شود شیردهی خود را حدوداً تا اواخر دوره آبستنی حفظ کنند. گزارشاتی وجود دارد که به افزایش میزان وقوع طبیعی هورمون‌های جنسی در خلال آبستنی تأکید دارند (۸).

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. براساس اطلاعات مندرج، هیچ سابقه چاپ شده‌ای در ارتباط با میزان هورمون‌های استروئیدی در فراورده‌های لبنی در ایران وجود ندارد. از اینرو این مطالعه 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 فرایند پاستوریزاسیون بر غلظت هورمون‌های استروئیدی نیز بررسی شده است.

<sup>1</sup> Sigma

<sup>2</sup> Stock solutions

<sup>3</sup> Working solutions

<sup>4</sup> Standard solution

<sup>5</sup> Merck

<sup>6</sup> Gerber

ستون سپس با ۵ mL آب شسته شد و در زیر گاز نیتروژن خشک شد. استروژن‌ها به وسیله ۴ mL اتانول شسته شدند و حلالی که حاوی اجزاء نمونه بود در زیر جریان گاز نیتروژن در دمای اتاق خشک شد. مواد باقی مانده در ۲۰۰  $\mu$ L فاز متحرک حل شده و ۲۰  $\mu$ L از مایع حاوی آنالیت به وسیله HPLC تحت آنالیز قرار گرفت (۸).

#### آنالیز کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)

آنالیز HPLC استروژن‌ها در نمونه‌های شیر بر اساس روشی که قبلاً شرح داده شده بود با اندکی تغییر صورت گرفت (۸). سیستم کروماتوگرافی شامل یک اتوسمپلر (900, Germany, Autosampler Tirathlon) و دو پمپ HPLC Wellchrom (KNAUER Germany, K-1001, pump) بود. ستون HPLC (Gravity, ۱۵۰  $\times$  ۴/۶ mm, ۵  $\mu$ m, C18) بود که با فاز متحرک A که شامل مخلوطی از استونیتریل، آب و اسید فرمیک به نسبت ۳۹٫۸۰ : ۵۹٫۸۰ : ۰٫۴ (حجمی - حجمی - حجمی) و فاز متحرک B که شامل استونیتریل، آب و اسید فرمیک با نسبت ۸۹٫۸۰ : ۹٫۸۰ : ۰٫۴ (حجمی - حجمی - حجمی) بود شسته شد. سرعت جریان در ۲۰۰ میکرولیتر در دقیقه تنظیم شد که به وسیله یک گرادیانت خطی به ترتیب زیر اجرا شد: ۱۰۰ درصد A برای یک 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 آشکار ساز فلورسانس، دیتکت شدند (RF-10 AXL KNAUER, Germany). طول موج برانگیختگی و نشر به ترتیب ۲۸۰ و ۳۰۰ نانومتر بودند.

#### ارزیابی داده‌ها و آنالیز آماری

تعیین غلظت هورمون‌های استروئیدی به وسیله منحنی‌های کالیبراسیون که نخست برای هر استاندارد (۵۰، ۲۵، ۱۰، ۵، ۱ ng/L) به دست آمده بود، صورت گرفت. غلظت‌ها براساس میزان بازیابی آنالیت‌ها از ماتریکس شیر اصلاح شدند. حد تشخیص<sup>۵</sup> برای هر آنالیت با تعیین نسبت سیگنال به نویز (S/N) برابر با سه محقق شد. تفاوت بین مقادیر استروژن در حیوانات غیرآبستن و آبستن و در ماه‌های مختلف آبستنی به ترتیب با ANOVA یک طرفه و تست bonferroni انجام شد و ( $P < 0/05$ ) به عنوان تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شد.

کردند. بعد از ورتکس به مدت ۱۵ ثانیه، نمونه‌ها در داخل حمام آب گرم و در دمای ۳۷ °C اولتراسونیک به مدت ۳۰ دقیقه هموژن شدند.

برای تعیین مقدار تام (فرم آزاد و غیرکونژوگه شده) استروژن‌ها در نمونه‌های شیر، ۲ mL از محلول (حجمی - حجمی) ۲ درصد اسید استیک به نمونه‌های هموژن شده اضافه شد و مخلوط با ۵۰۰ واحد آنزیم گلوکونیداز/سولفاتاز که در ۱۰۰  $\mu$ L بافر استات با غلظت ۴۰ mM و با pH=۵/۳ حل شده بود تحت درمان قرار گرفتند. بعد از ورتکس، مخلوط به مدت یک شبانه روز<sup>۱</sup> در دمای ۳۷ °C انکوبه شد (۱۱). نمونه‌های کنترل با اسپایک<sup>۲</sup> نمونه‌های شیر به وسیله مخلوطی از استانداردهای استروژن برای بدست آوردن غلظت نهایی ۰/۵، ۱ و ۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای هر استروژن، آماده شدند.

#### تخلیص نمونه‌ها (استخراج شیمیایی)

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 به تا-گلوکونیداز/سولفاتاز اضافه شد. سپس نمونه‌ها به شدت به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰ rpm بر روی شیکر مخلوط شدند و سپس در ۲۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شدند. لایه بالایی چربی جدا شد و لایه پایینی به یک لوله جدید انتقال پیدا کرد. محلول حاوی نمونه با ۱۰ mL هگزان مخلوط شد و در ۳۵۰۰ g به مدت ۱۰ سانتریفیوژ شد. بعد از جدا کردن لایه هگزان، ۱۵ mL از دی‌کلرومتان (DCM) به محلول باقیمانده اضافه شد و سپس به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰ rpm بر روی شیکر پلات فرم مخلوط شدند و سپس مجدداً در ۲۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شدند. لایه پایینی به داخل یک لوله شیشه‌ای جدید انتقال پیدا کرد و استخراج لایه بالایی با ۱۵ mL از دی‌کلرومتان تکرار شد. فاز دی‌کلرومتان در زیر جریان گاز نیتروژن ترکیب، هموژن و نهایتاً خشک شد (۸).

#### استخراج فاز جامد (SPE)<sup>۳</sup>

مواد باقی‌مانده از استخراج شیمیایی مجدداً در ۰/۵ mL از متانول حل شدند و به دنبال مخلوط کردن با ورتکس، ۴/۵ mL آب به آن اضافه شد. بعد از هموژنیزاسیون، محلول با دقت از ستون‌های SPE C<sub>18</sub> (۵۰۰ mg; ۳ mL) که قبلاً با ۵ mL متانول و ۵ mL آب به ترتیب فعال و آماده شده بود عبور داده شد.

<sup>۱</sup> Over night

<sup>۲</sup> Spiking

<sup>۳</sup> Solid Phase Extraction

<sup>۴</sup> High Performance Liquid Chromatography

<sup>۵</sup> Limit of Detection

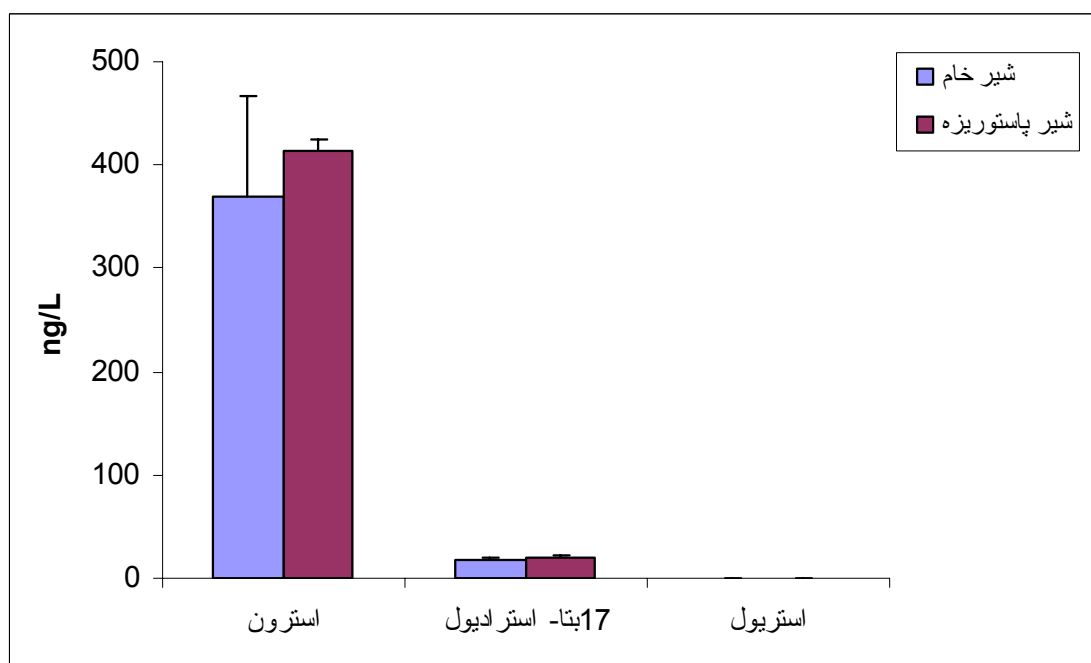
## یافته‌ها

برای نشان دادن کارایی روش‌های استخراج و تشخیص، شاخص‌هایی نظیر درصد بازیابی 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 شماره ۱). کروماتوگرام‌های HPLC برای هر سه استروژن مورد آنالیز در محلول استاندارد و در نمونه‌های شیر در کروماتوگرام شماره ۱ نشان داده شده است. زمان ماندگاری برای استرون ۱۷،۱۱، استراذیول ۱۱،۴۸ و استریول ۳،۶۸ دقیقه بدست آمد.

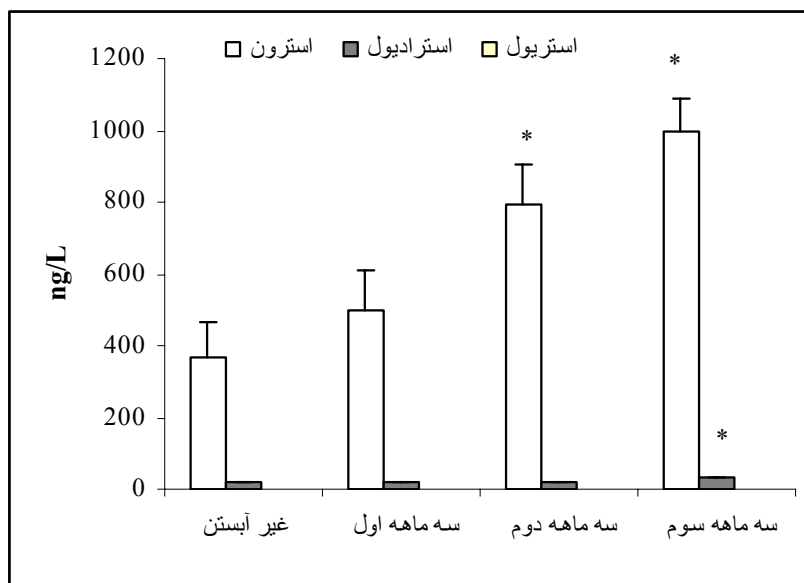
مقایسه غلظت استروژن‌ها در شیرهای خام و پاستوریزه نشان می‌دهد که پاستوریزاسیون، سطح استروژن‌ها را به میزان معنی‌داری تغییر نمی‌دهد ( $P > 0.05$ ). سطح استریول ( $E_3$ ) در هر دو شیرهای خام و پاستوریزه مشخص نشد زیرا مقدار آن پایین‌تر از حد تشخیص بود (نمودار شماره ۱).

تعیین غلظت استروژن‌ها در نمونه‌های شیر در حیوانات آبستن در زمان‌های مختلف آبستنی و مقایسه آن با حیوانات غیر آبستن نشان داد که غلظت استروژن‌ها بستگی به زمان دوره آبستنی دارد. علاوه بر این، افزایش در سطح استرون (نمودار شماره ۲) وقتی نمونه‌های شیر سه ماهه دوم و سوم آنالیز شدند، معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). اما افزایش در سطح ۱۷ به تا-استراذیول فقط در سه ماهه سوم معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). سطح استریول آزاد در نمونه‌های شیر قابل اندازه‌گیری نبود (نمودار شماره ۲).

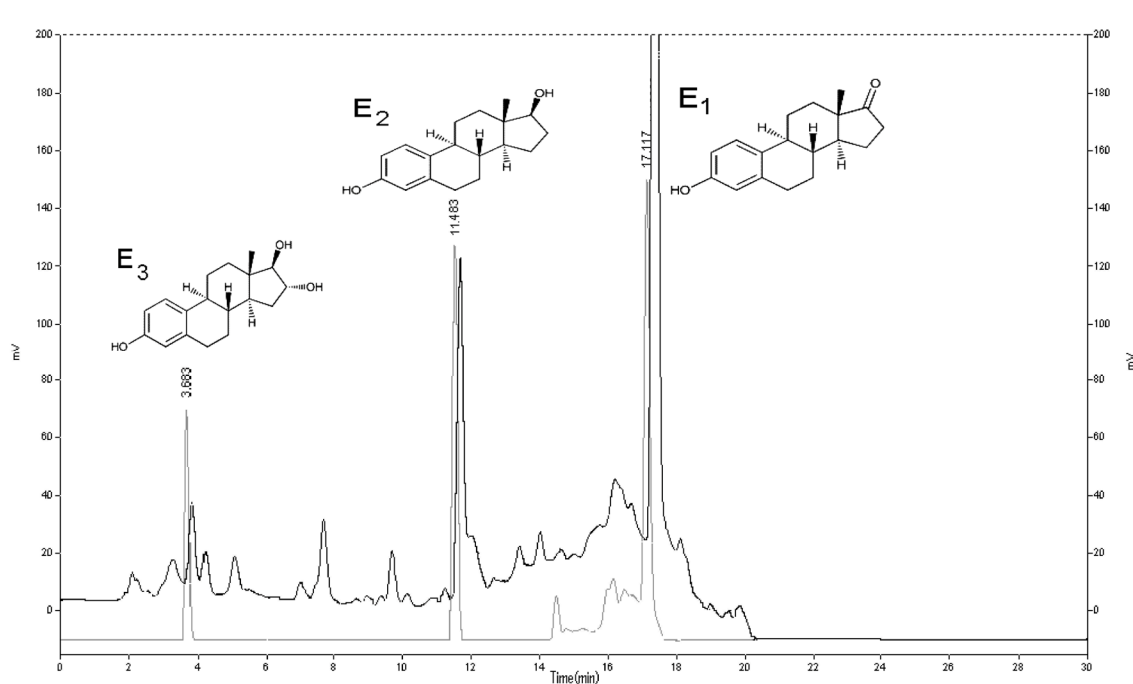
انکوبه کردن نمونه‌های شیر با آنزیم‌های دکونژوکه کننده به مدت یک شبانه روز و ارزیابی مقدار تام استروژن‌ها، نشان داد که همه استروژن‌های مورد آنالیز با توجه به زمان آبستنی افزایش معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) پیدا کرده بودند (جدول شماره ۲). سطح استریول تام در نمونه‌های شیر سه ماهه سوم قابل اندازه‌گیری بود و این بیانگر افزایش قابل توجه این هورمون در طول دوره آبستنی است.



نمودار شماره (۱): نمودار مقایسه‌ای تأثیر فرایند پاستوریزاسیون بر غلظت استروژن‌های آزاد در شیر گاوهای غیر آبستن



**نمودار شماره (۲):** نمودار مقایسه‌ای مقادیر آزاد استرون، ۱۷-بتا-استرادیول و استریول در شیر خام در گاوهای غیر آبستن و در زمان‌های مختلف آبستنی، \*در سطح احتمال آماری کمتر از ۵ درصد ( $P < 0.05$ ) بین داده‌ها اختلاف معنی‌دار وجود دارد.



**کروماتوگرام شماره (۱):** کروماتوگرام HPLC مربوط به E<sub>1</sub>، E<sub>2</sub> و E<sub>3</sub>: کروماتوگرام تیره استروژن‌ها را در شیر و کروماتوگرام روشن استروژن‌ها را در محلول استاندارد نشان می‌دهد. E<sub>1</sub>: استرون، E<sub>2</sub>: ۱۷-بتا-استرادیول و E<sub>3</sub>: استریول

جدول شماره (۱): آنالیز HPLC استروژن‌ها در شیر

|    | حد تشخیص | *درصد بازیابی    |
|----|----------|------------------|
| E1 | ۵        | $9/47 \pm 70/86$ |
| E2 | ۵        | $7/51 \pm 68/53$ |
| E3 | ۱۰       | $4/73 \pm 59/11$ |

درصد بازیابی با سه بار تکرار آزمایشات محاسبه و به صورت مقادیر میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد بیان شده است. E1 : استرون، E2 : ۱۷ بتا-استرادیول و E3 : استریول

جدول شماره (۲): مجموع استروژن‌های آزاد و غیر کونژوگه شده (ng/L) در شیر خام حیوانات غیر آبستن و حیوانات آبستن در زمان‌های

مختلف آبستنی

|    | سه ماهه سوم        | سه ماهه دوم      | سه ماهه اول       | غیر آبستن        |
|----|--------------------|------------------|-------------------|------------------|
| E1 | $124/8 \pm 1032/7$ | $61/5 \pm 997/5$ | $115/0 \pm 775/6$ | $32/7 \pm 545/6$ |
| E2 | $4/4 \pm 43/3$     | $1/7 \pm 35/1$   | $8/7 \pm 29/9$    | $7/2 \pm 31/1$   |
| E3 | $0/9 \pm 11/3$     | nd               | nd                | nd               |

توجه: اعدادی که با حروف انگلیسی غیرمشترک نشان داده شده‌اند بیانگر اختلاف معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) در غلظت استروژن‌ها در یک سطر است. E1 : استرون، E2 : ۱۷ بتا-استرادیول و E3 : استریول

## بحث

غلظت استروژن‌های مورد آنالیز دارد. نتایج ما با مطالعات قبلی که نشان می‌دهد پاستوریزاسیون اگر چه سبب کاهش غلظت استروژن‌ها را در شیر گاو تغییر نمی‌دهد، همخوانی دارد. این مقاومت به گرما شاید به علت استقرار استروژن‌ها در مرکز گلبول‌های چربی شیر باشد که سبب می‌شود حرارت کافی به آن‌ها نرسد (۱۳). علاوه بر این، خصوصیات مقاوم به گرما بودن ترکیبات استروژنی ممکن است آن‌ها را در برابر نابودی به وسیله گرما محافظت کند (۱۴). یافته‌های ما در این مطالعه، نتایج مطالعات گذشته در مورد وقوع هورمون‌های استروژنی در شیر را تأیید می‌کند (۱۴، ۱۵، ۱۶). دو منبع برای حضور هورمون‌های استروژنی در شیر شناخته شده است که شامل بیوسنتز استروژن‌ها به وسیله بافت پستانی و استروژن‌های موجود در پلاسما است (۱۷، ۱۸). فاکتورهایی که ممکن است سطح وقوع طبیعی هورمون‌های استروژنی را در شیر و پلاسما تغییر دهند

مطالعه حاضر برای نخستین بار مقادیر وقوع طبیعی هورمون‌های استروژنی در شیر را از ایران گزارش می‌کند. علاوه بر این نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که پاستوریزاسیون، غلظت هورمون‌های استروژنی را در شیر تغییر نمی‌دهد و پیشرفت در طول دوره آبستنی منجر به افزایش معنی‌دار سطح هورمون‌های استروژنی مورد آزمایش در شیر می‌شود. درصد بازیابی برای استروژن‌های مورد آنالیز در نمونه‌های شیر مقادیر متفاوتی را نشان می‌دهد. اگر چه مقادیر بازیابی به دست آمده به نظر پایین می‌رسد، اما آن‌ها در گستره ۵۰- تا ۲۰ درصد که حداقل صحت روش اندازه‌گیری بر حسب دستورالعمل‌های کمیته اتحادیه اروپا (EU Commission, Decision ۲۰۰۲/۶۵۷) هستند، قرار دارند (۱۲). نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که پاستوریزاسیون نمونه‌های شیر، تأثیر کم و غیر معنی‌داری ( $P > 0/05$ ) بر روی

شامل شرایط فیزیولوژیک در دوره استروس و تخمک‌گذاری حیوانات، ترکیبات جیره غذایی و تجویز داروهای استروژنی و ترکیباتی که به عنوان محرک رشد استفاده می‌شوند، هستند (۱۸، ۱۹). نتایج نشان می‌دهد که بیشترین استروژن در نمونه‌های شیر استرون ( $E_1$ ) است و بعد از آن به ترتیب شامل ۱۷بتا-استرادیول ( $E_2$ ) و استریول ( $E_3$ ) است. یافته‌های ما با مطالعات قبلی در این مورد مطابقت دارد (۸، ۲۰). مهم‌ترین دلیل برای این یافته، ممکن است به علت میزان چربی دوستی متفاوت هر یک از هورمون‌های استروئیدی و مسیر بیوسنتز استروژن‌های با منشأ درونی در بدن باشد. این امر ممکن است به وسیله فعالیت کم آنزیمی برای تبدیل استرون ( $E_1$ ) به ۱۷بتا-استرادیول ( $E_2$ ) و استریول ( $E_3$ ) نیز شرح داده شود که منجر به تجمع استرون ( $E_1$ ) در شیر می‌شود. مطالعه حاضر، مطالعات قبلی درباره نقش آبستنی بر روی مقدار هورمون‌های استروژنی در شیر را تأیید می‌کند. همان طوری که در مطالعه قبلی توسط ملکی‌نژاد و همکاران در ۲۰۰۶ سال 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 (۸). افزایش مقدار استرون ( $E_1$ ) و ۱۷بتا-استرادیول ( $E_2$ ) در شیر حیوانات آبستن در مقایسه با شیر حیوانات غیر آبستن 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<sup>۱</sup> 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). افزایش استروژن‌ها در طول دوره آبستنی، در جوندگان و انسان هم گزارش شده است (۲۲). شواهد نشان می‌دهند که هورمون‌های آبستنی به وسیله تخمدان‌ها و جفت تولید می‌شوند که این‌ها مسئول تشکیل و بالغ شدن ارگان‌هایی مثل کبد، شش، کلیه‌ها و غدد آدرنال هستند و همچنین استروژن‌ها در تنظیم تراکم استخوانی و در تنظیم جریان خون از مادر به طرف جنین در دوره بارداری نقش دارند (۲۳). منابع افزایش سطح استروژن‌ها در شیر در طول دوره آبستنی ممکن است نه تنها به علت افزایش اندازه جفت در طول دوره آبستنی باشد بلکه ارگان‌های دیگری نظیر تخمدان‌ها و جسم زرد نیز در این امر نقش دارند. مطالعه دیگری نشان داد که تولید

استروژن‌ها در غدد پستانی بز در اواخر دوره آبستنی به وسیله آروماتیزاسیون<sup>۲</sup> آندروژنها صورت می‌گیرد (۲۴). اگرچه بدون شک شیر یکی از منابع با ارزش تغذیه انسان و حیوانات جوان به شمار می‌آید، نگرانی‌های رو به رشدی در ارتباط با سلامت شیر به علت 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 طولانی مدت فرآورده‌های لبنی که حاوی این ترکیبات باشند، ممکن است ریسک سرطان‌هایی از قبیل سرطان سینه، پروستات و رحم را افزایش دهند (۲۵-۲۸). باید توجه شود، اگر چه 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، فراهمی زیستی این ترکیبات، متابولیسم آنها به خصوص (عبور اول کبدی) و حساسیت بافت‌های مختلف که در برابر استروژن‌ها قرار می‌گیرند، است.

### نتیجه‌گیری

در پایان، این مطالعه حضور هورمون‌های استروئیدی را در شیر گاو و همچنین تفاوت در غلظت استروژن‌ها در نمونه‌های شیر در طول زمان‌های مختلف آبستنی را نشان می‌دهد. همچنین یافته‌های ما نشان می‌دهد که غلظت ترکیبات استروژنی در شیر گاوهای آبستن به طور معنی‌داری بیشتر از گاوهای غیر آبستن است. از آنجایی که شیرهای تولیدی توسط کارخانجات محصولات لبنی مخلوطی از شیر حیوانات آبستن و غیر آبستن است، بنابراین این نگرانی وجود دارد که ممکن است مصرف این شیرها به عنوان مهم‌ترین فاکتور خطر در شروع سرطان‌ها عمل کنند، از این‌رو باید توجه بیشتری در ارتباط با مصرف شیر حیوانات آبستن به خصوص در اواخر دوره آبستنی به دلیل افزایش این هورمون‌ها صورت گیرد.

### تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از آقای زکریا وهاب زاده (انسیتو تحقیقاتی آرتمی و جانوران آبی دانشگاه ارومیه) و آقایان حامد جانباز و مهرداد فروغ تشکر و قدردانی می‌نمایند.

<sup>2</sup> Aromatization

<sup>1</sup> Zambito

## References

1. Noppe H, Le Bizec B, Verheyden K, De Brabander HF. Novel analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices. *Anal Chim Acta* 2008; 6(11): 1–16.
2. Liehr JG. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr Rev* 2000; 21(1): 40-54.
3. Yager JD, Davidson, NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 254: 270-82.
4. Larsson SC, Bergkvist L, Wolk A. Milk and lactose intakes and ovarian cancer risk in the Swedish mammography cohort. *Am J Clin Nutr* 2004; 80(5): 1353-357.
5. Ganmaa D, Wang PY, Qin LQ, Hoshi K, Sato A. Is milk responsible for male reproductive disorders?. *Med Hypotheses* 2001; 57: 510-14.
6. Ganmaa D, Li XM, Wang J, Qin LQ, Wang PY, Sato A. Incidence and mortality of testicular and prostatic cancer in relation to world dietary practices. *Int J Cancer* 2002; 98: 262-67.
7. Farlow DW, Xu Xia, Veenstra TD. Quantitative measurement of endogenous estrogen metabolites, risk-factors for development of breast cancer, in commercial milk products by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed* 2009; 877: 1327–334.
8. 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: 9785-791.
9. James CS. *Analytical chemistry of foods*, 1<sup>st</sup> Ed. Glasgow UK, Chapman & Hall; 1995.
10. 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 concentration of starter. *J Dairy Sci* 2006; 89: 3318-325.
11. Xu X, Keefer L K, Waterhouse D J, Saavedra J E, Veenstra T D, Ziegler R G. Measuring seven endogenous ketolic estrogens simultaneously in human urine by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem* 2004; 76: 5829-836.
12. 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.
13. 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): 2533-540.
14. Fritsche S, Steinhart H. Occurrence of hormonally active compounds in food: a review. *Euro Food Res Technol* 1999; 209: 153-79.
15. Hartmann S, Lacorn M, Steinhart H. Natural occurrence of steroid hormones in food. *Food Chem* 1998; 62: 7-20.
16. Pape-Zambito D A, Magliaro A L, Kensinger, R S. Concentrations of 17β-Estradiol in Holstein Whole Milk. *J Dairy Sci* 2007; 90: 3308–313.
17. Batra SK, Arora RC, Bachlaus NK, Pahwa GS, Pandey RS. Quantitative relationships between oestradiol-17β in the milk and blood of lactating buffaloes. *J Endocrinol* 1980; 84: 205–209.
18. Janowski T, Zdunczyk S, Malecki-Tepicht J, Baranski W, Ras, A. Mammary secretion of oestrogens in the cow. *Domest Anim Endocrinol* 2002; 23: 125-37.
19. Lopez H, Bunch TD, Shipka MP. Estrogen concentrations in milk at estrus and ovulation in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2002; 72: 37-46.
20. 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: 4784-795.



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: 127-35.
22. Ding J, Zhu BT. Unique effect of the pregnancy hormone estriol on antigen-induced production of specific antibodies in female BALB/c mice. *Steroids* 2008; 73: 289-98.
23. Stabenfeldt GH, Daels PF, Munro CJ, Kindahl H, Hughes JP, Lasley B. An oestrogen conjugated enzyme immunoassay for monitoring pregnancy in the mare: limitations of the assay between days 40 and 70 of gestation. *J Reprod Fertil Suppl* 1991; 44: 37-44.
24. Peaker M, Taylor E. Oestrogen production by the goat mammary gland: transient aromatase activity during late pregnancy. *J Endocrinol* 1990; 125: R1-3.
25. 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* 2005a; 65: 1028-1037.
26. Ganmaa D, Tezuka H, Enkhmaa D, Hoshi K, Sato A. Commercial cows' milk has uterotrophic activity on the uterous of young ovariectomized rats and immature rats. *Int J Cancer* 2005b; 118: 2363-365.
27. 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; 9: 186-90.
28. 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: 133-42.