

تأثیر کاشت هورمون ۱۱-کتوتستوسترون بر پارامترهای بیوشیمیایی و هماتولوژیک فیل ماهی (*Huso huso*) پرورشی در مرحله پیش زرده-سازی

عبدالعلی راهداری^۱، مجیدرضا خوش خلق^۲، مهتاب یارمحمدی^۳، بهرام فلاحتکار^{۴*}

۱. دانشجوی دکتری گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، گیلان، ایران.
۲. دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، گیلان، ایران.
۳. دانشیار بخش ژنتیک، انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت، گیلان، ایران.
۴. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، گیلان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۲۹ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱/۲۵

چکیده

درک و فهم نحوه تنظیم فرآیند تولیدمثل ماهیان خاویاری یکی از پیش‌نیازهای تکثیر مصنوعی این ماهیان می‌باشد. هر چند هورمون ۱۱-کتوتستوسترون (11-KT) در خون جنس ماده برخی ماهیان شناسایی شده ولی اهمیت این هورمون آندروژنی در فیل ماهی ماده تاکنون بررسی نشده است. به این منظور، اثر 11-KT در فیل ماهی‌های ماده مرحله پیش زرده‌سازی مطالعه شد. مجموعاً ۱۲ ماهی با وزن متوسط 55.80 ± 1.65 گرم به ۲ گروه تقسیم شده و در تانک‌های مدور تحت شرایط طبیعی (آب رودخانه و دمای طبیعی) پرورش داده شدند. گروه کنترل فقط با پلت‌های حاوی ۰.۹۵٪ کلسترول و ۰.۵٪ سلولز و گروه تیمار با پلت‌های حاوی ۲/۵ میلی‌گرم 11-KT ایمپلنت شدند. تغییرات پارامترهای خون‌شناسی و بیوشیمیایی خون پس از سه هفته و دو ماهه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج پارامترهای خون‌شناسی و شمارش افتراقی نشان داد که تعداد گلبول‌های قرمز و شاخص‌های مرتبط با آن و نیز تعداد گلبول‌های سفید در مراحل و گروه‌های مختلف با هم اختلاف معنی‌دار داشت ($P < 0.05$) و سایر پارامترها تحت تاثیر ایمپلنت‌های صورت گرفته و شرایط آزمایشی قرار نگرفتند. همچنین، پس از سه هفته، در گروه تیمار شده با 11-KT نسبت به گروه کنترل پارامترهایی بیوشیمیایی شامل گلوکز، آلومین، کلسیم، فسفر، آلکالین فسفاتاز، HDL و VLDL کاهش و کلسترول افزایش یافتند و پس از دو ماه همه پارامترهای بیوشیمیایی افزایش پیدا کردند که افزایش پارامترهای کلسترول و HDL معنی‌دار ($P < 0.05$) بود. نتایج این مطالعه نشان داد که ایمپلنت 11-KT می‌تواند پارامترهای فیزیولوژیک ماهی را تحت تاثیر قرار دهد و اثرات مثبت در راستای پیشرفت رسیدگی جنسی و توسعه گنادی فیل ماهی ماده پرورشی در مرحله پیش زرده‌سازی دارد.

واژگان کلیدی: هورمون، آندروژن، 11-KT، پارامترهای خونی، تولیدمثل.

۱. مقدمه

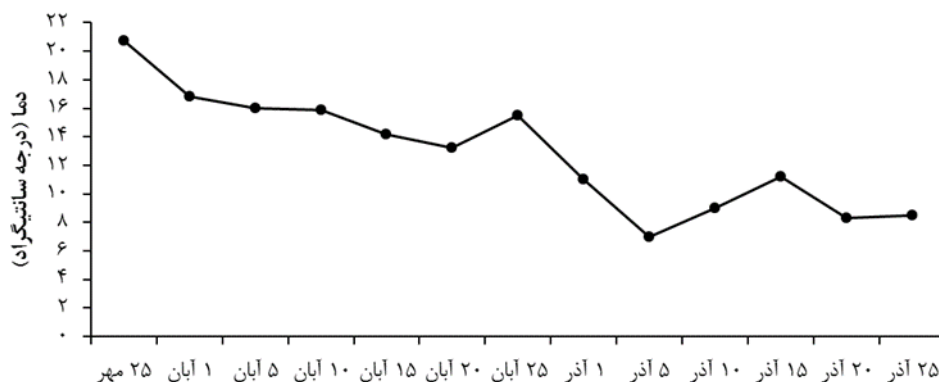
مهم‌ترین استروئیدها در جنس نر ماهی‌ها، آندروژن‌ها شامل تستوسترون (T) و ۱۱-کتو-تستوسترون (11-KT) هستند. نقش آندروژن‌ها نیز در تنظیم عملکرد تولیدمثلی جنس ماده در گروه‌های مختلف مانند دوزیستان (Lutz et al., 2001) و پستانداران (Gill et al., 2004) اثبات شده است. وجود گیرنده‌های آندروژنی تخمدان در گروه‌های متعدد مهره‌داران از قبیل انسان، موش، میمون، خوک و ماهی این نظر و عقیده را تقویت می‌کند که غلظت‌های پایین آندروژن‌ها برای پیشرفت طبیعی اووژنز مهم می‌باشد (Walters et al., 2010)، گرچه غلظت بالای آنها در پستانداران ماده معمولاً منجر به کاهش شانس باروری (Rocha et al., 2010) و حتی در مواردی موجب ناباروری می‌گردد (Hugues and Durnerin, 2005). بر اساس مطالعات جدید، شواهد خوبی وجود دارد که 11-KT حداقل در برخی ماهیان استخوانی تأثیر ژرفی بر رشد اووسیت‌های مراحل پیش‌زده‌سازی یا اوایل زده‌سازی دارد (Kazeto et al., 2011). این تأثیر اولین بار در مارماهیان آب شیرین نیوزلند (*Anguilla dieffenbachii*) و (*A. australis*) که در نیمکره جنوبی هستند مشاهده شد (Lokman et al., 1998; 2007). کارهای بعدی که روی مارماهیان اروپایی (*A. anguilla*) و ژاپنی (*A. japonica*) صورت گرفت، یافته‌های فوق را به هم‌تایان این مارماهیان در نیمکره شمالی گسترش داد (Matsubara et al., 2001). اخیراً، شواهدی به دست آمده که 11-KT در رشد اووسیت‌های مرحله پیش‌زده‌سازی ماهیان استخوانی که از نظر فیلوژنی خیلی دورتر از مارماهی‌ها هستند مانند کاد اطلس (Kortner et al., 2009) (*Gadus morhua*) و آزاد کوهو (Forsgren and Young, 2010) نقش دارد.

با وجود تأثیرات مثبت آندروژن‌ها بر توسعه تخمدانی گونه‌های اشاره شده، نقش آنها در ماهی‌های ماده به خوبی شناخته نشده است. بیشتر اطلاعاتی که تاکنون راجع به نقش مثبت آندروژن‌ها به دست آمده، از طریق مطالعاتی بوده که روی مارماهیان صورت گرفته است. به‌طور کلی، مارماهیان با توجه به نوع

چرخه زندگی‌شان ماهیانی غیرمعمولی (atypical) هستند و همین امر مارماهی را مدل منحصر به فردی برای انجام مطالعات اندوکراین می‌کند زیرا تغییر در مقدار آندروژن‌ها موجب ظهور یکسری تغییرات ریختی در ماهی می‌شود که این تغییرات به راحتی قابل مشاهده و اندازه‌گیری هستند (Kohn et al., 2013). علاوه بر این‌ها، در این ماهی‌ها مقدار طبیعی 11-KT در ماهی ماده بالا است. این پدیده (بالا بودن 11-KT در جنس ماده) در چند گونه دیگر از جمله تاسماهی سبیری (*Acipenser baerii* (در شرایط اسارت) (Hamlin et al., 2011) و آزاد کوهو (Fitzpatrick et al., 1986) مشاهده شده است، هرچند که این امر بنا به اظهارات Lokman و همکاران (۲۰۰۲) می‌تواند اشتباه اندازه‌گیری باشد. در همه این گونه‌ها مقدار طبیعی 11-KT نه تنها بالا است، بلکه در توسعه تخمدانی هم تأثیر مثبت دارد. مطلب بسیار جالب توجه این است که بالا بودن 11-KT یا نقش داشتن آن در ماهی ماده، در برخی از گونه‌های مارماهیان، تاسماهیان و آزادماهیان به اثبات رسیده که هر سه جزء ماهیان دیاوروموس هستند، ولی فعلاً نمی‌توان رابطه روشنی بین چرخه زندگی و مقادیر طبیعی 11-KT بیان نمود (Lokman et al., 2002).

پارامترهای مختلف هماتولوژیک و بیوشیمیایی خون به‌عنوان شاخص‌های وضعیت سلامت ماهی‌ها هستند. برخی از متابولیت‌ها مانند کلسترول، تری-گلیسرید و گلوکز تحت تأثیر شرایط پرورشی و تغییرات فصلی هم قرار می‌گیرند. کاربرد کلینیکی این شاخص‌ها بسیار محدود است زیرا تکنیک‌های استاندارد و منابع معتبر و قابل اعتمادی برای ماهیان خاویاری به ویژه ماهی‌های مرحله پری‌ویتلوژنیک که اووسیت‌های آنها سال‌ها در این مرحله می‌مانند وجود ندارد (Falahatkar, 2015).

فیل ماهی همانند دیگر ماهیان غضروفی استخوانی، دوره تولیدمثلی طولانی دارد و در شرایط طبیعی مدت طولانی طول می‌کشد تا به رسیدگی جنسی برسد، به طوری که ماهیان نر در ۱۴-۱۲ و ماهیان ماده در ۱۸-۱۶ سالگی برای اولین بار به رسیدگی جنسی می‌رسند (Chebanov and Galich, 2011). مسئله مهمی که در ماهیان خاویاری از جمله فیل ماهی مطرح می‌باشد این است که رشد



شکل ۱ - تغییرات دمای آب در طول دوره آزمایش.

نمونه‌های کوچکی از گنادهای ماهیان ماده به روش بیوپسی برای تشخیص دقیق مرحله رسیدگی جنسی و تهیه تصاویر بافت‌شناسی جدا شد (Falahatkar *et al.*, 2013). از میان ماهی‌های ماده، تعداد ۱۲ ماهی (۴-۵ ساله) با بیشترین قرابت وزنی (558.0 ± 165 گرم) که در مرحله پیش زرده‌سازی بودند انتخاب شده و توسط دستگاه پلاک‌زن پلاک‌گذاری شدند.

ماهی‌های انتخاب شده به دو گروه تحت تیمار و کنترل (هر گروه ۶ عدد ماهی) تقسیم و درون حوضچه‌های مدور (قطر ۳ متر، عمق ۵۰ سانتیمتر و حجم آبیگری حدود ۴ مترمکعب) مجهز به سیستم هوادهی نگهداری شدند. میانگین دمای آب در سه هفته اول دوره آزمایش $16/15 \pm 1/07$ و در کل دوره دو ماهه $12/88 \pm 1/14$ درجه سانتی‌گراد بود. میانگین اکسیژن محلول آب در طول دوره آزمایش $6/9 \pm 0/3$ میلی‌گرم در لیتر بود. تغذیه ماهیان به میزان ۱ درصد وزن بدن و دو وعده در روز با غذای تجاری GFS3 مخصوص ماهیان خاویاری (فراوانه، شهرکرد، ایران) با محتوای ۴۲ درصد پروتئین خام، ۱۴ درصد چربی خام، ۳ درصد فیبر خام، ۱۰ درصد خاکستر، ۱۰ درصد رطوبت و ۱ درصد فسفر صورت گرفت. ۲۴ ساعت قبل از کاشت پلت‌های هورمونی و نمونه‌گیری، تغذیه قطع شد.

۲.۲. تهیه ایمپلنت هورمونی

ایمپلنت‌های آهسته رهش با ترکیب کلسترول و سلولز ساخته شدند (Crim *et al.*, 1998). به طور خلاصه، هورمون 11-KT که به صورت خشک بود با مخلوط حاوی ۹۵٪ کلسترول و ۵٪ سلولز مخلوط شد. سپس اتانول ۵۰٪ به نسبت ۱ به ۴ (v/w) به این

تخمک در ماهیان ماده پرورشی در مرحله پیش زرده‌سازی بسیار کند بوده و سلول‌های اووگونیا در مرحله پروراز وارد سکون می‌شوند. طول این دوره نامشخص و بسیار طولانی می‌باشد. برای حل این مشکل و القا یا تسریع زرده‌سازی، روش‌های مختلفی به کار رفته است (Kaminski *et al.*, 2004; Poursaeid *et al.*, 2012; Akhavan *et al.*, 2015). تسریع در روند رسیدگی جنسی ماهی ماده حتی در حد چند ماه باعث خواهد شد که میزان هزینه‌ها و زحمات پرورش‌دهندگان به میزان زیادی کاهش پیدا کند و از طرفی موجب افزایش سودآوری و کاهش زمان بازگشت سرمایه که از موانع سرمایه‌گذاری در پرورش ماهیان خاویاری است می‌شود. مطالعه تأثیر یک هورمون آندروژنیک (11-KT) بر رسیدگی جنسی فیل ماهی برای نخستین بار انجام گردید و هدف این بود که پس از ایمپلنت هورمون 11-KT در فیل ماهی ماده مرحله پری‌ویتلوژنیک روند تغییرات پارامترهای بیوشیمیایی و هماتولوژیک به ویژه در جهت پیشرفت میزان رسیدگی جنسی مورد بررسی و ارزیابی قرار گیرد.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. تهیه ماهی و شرایط نگهداری

تعدادی فیل ماهی از مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان دریایی شادروان دکتر یوسف پور سیاهکل تهیه و از بین آنها ماهی‌های موردنظر جهت کاشت هورمون انتخاب شدند. روش انتخاب ماهیان به این صورت بود که یک شکاف کوچک یک سانتیمتری به وسیله اسکالپل شماره ۲۲ در بدن ماهیان ایجاد شد.

بیوشیمیایی به لوله های آزمایش دیگر منتقل شده و با سانتریفوژ یخچال دار (دمای °C ۴) به مدت ۱۰ دقیقه و ۱۵۰۰g سانتریفوژ و سرم به دست آمده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

۴.۲. سنجش پارامترهای بیوشیمیایی

مقدار گلوکز با استفاده از گلوکز اکسیداز (Bayunova *et al.*, 2002)، کلسترول به روش سنجش آنزیمی (Sharpe and MacLachy, 2007)، فعالیت آلکالین فسفاتاز، کلسیم، فسفر و HDL سرم به روش رنگ سنجی آنزیمی (enzymatic colorimetric) در طول موج ۵۷۰ نانومتر و آلبومین به همین روش و در طول موج ۵۸۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Unico UV-2100, New Jersey, USA) توسط کیت های تشخیص کمی شرکت پارس آزمون (کرج، ایران) اندازه گیری شدند. مقادیر LDL و VLDL بر اساس فرمول محاسبه شد (Friedewald *et al.*, 1972).

۵.۲. اندازه گیری پارامترهای خون شناسی

تعداد گلبول های قرمز (RBC) و سفید (WBC) خون پس از رقیق سازی توسط لام هموسیتمومتر اندازه گیری شد (Leonard and McCormick, 2005). میزان هموگلوبین (Hb) با استفاده از کیت سنجش هموگلوبین (شرکت زیست شیمی، تهران) به روش استاندارد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۴۶ نانومتر اندازه گیری شد (Houston, 1990). میزان هماتوکریت با سانتریفوژ کردن نمونه های خون در لوله های میکروههماتوکریت به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۵۰۰g با استفاده از دستگاه سانتریفوژ میکروههماتوکریت قرائت شد (Svetina *et al.*, 2002). شاخص های خونی شامل میانگین حجم یک گلبول قرمز (MCV)، میانگین هموگلوبین یک گلبول قرمز (MCH) و میانگین درصد غلظت هموگلوبین در یک گلبول قرمز (MCHC) با استفاده از روابط زیر محاسبه شد (Köprüci *et al.*, 2006):

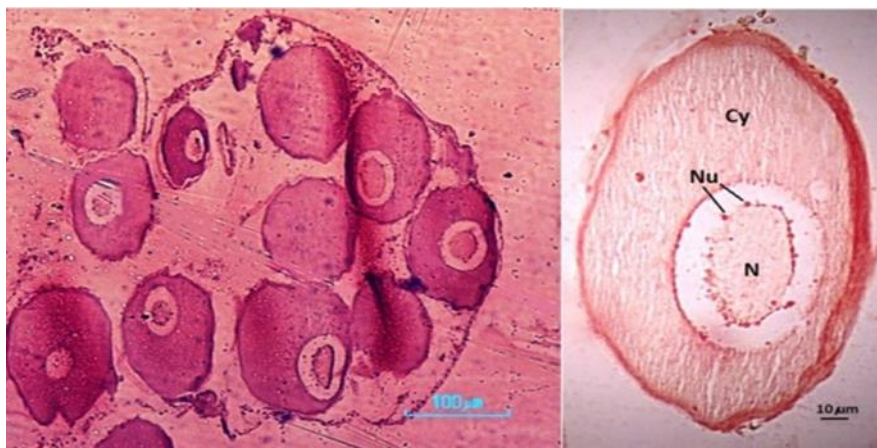
MCV (حجم متوسط گلبول های قرمز) (fL)

= (تعداد گلبول های قرمز/هماتوکریت) × ۱۰

مخلوط افزوده شد. محصول خمیر مانند حاصله به مدت ۹۰-۴۵ دقیقه در دمای °C ۳۷ خشک گردید. پودر به دست آمده با تور ۵۵۰ میکرون الک شد تا برای قرار گرفتن در دستگاه پرس پلت از کیفیت مناسب برخوردار باشد. ایمپلنت های 11-KT ساخته شده دارای ۸ میلی متر طول، ۲ میلی متر قطر و ۲۸-۳۱ میلی گرم وزن بودند که حاوی ۲/۵ میلی گرم هورمون ۱۱-کتوتستوسترون (11-KT) بودند، ولی ایمپلنت های کنترل بدون هورمون مذکور و فقط حاوی مخلوط کلسترول و سلولز بودند (Lokman *et al.*, 2015).

۳.۲. ایمپلنت هورمون و خون گیری

هر یک از ماهی ها در محلول پودر گل میخک با غلظت ۴۰۰ میلی گرم در لیتر (Poursaeid *et al.*, 2012) بی هوش شدند. پس از اندازه گیری طول و وزن ماهی ها، به گروه کنترل فقط مخلوط کلسترول و سلولز و به گروه تیمار، پلت های حاوی هورمون 11-KT به صورت درون صفاقی بعد از ایجاد شکافی به طول حدوداً یک سانتی متر در بدن ماهیان گذاشته شد. پس از کاشت پلت ها، محل شکاف با نخ ابریشمی غیر قابل جذب به قطر ۰/۹ میلی متر و با سوزن جراحی (No. G 414/4, ACUFIRM, Dreieich, Germany) بخیه زده شد. محل بخیه با محلول موضعی بتادین (Povidone Iodine-Najo 10%) (شرکت داروسازی ایران ناژو، تهران، ایران) ضد عفونی شد. همچنین، برای جلوگیری از عفونت های باکتریایی، مقدار یک میلی لیتر آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین ۱۰٪ (رازک، تهران، ایران) زیر باله پشتی ماهی ها به صورت عضلانی تزریق گردید (Falahatkar *et al.*, 2011). سپس، ماهی ها به حوضچه ها برگشت داده شده و به مدت دو ماه پرورش داده شدند. نمونه گیری ها سه هفته پس از شروع آزمایش و دو ماه بعد (پایان دوره آزمایشی) صورت گرفت. جهت نمونه گیری، ماهی ها بی هوش و سپس خون گیری شدند. خون گیری با سرنگ ۵ میلی لیتری از سیاهرگ دمی ماهی ها در کمتر از ۱ دقیقه انجام شد. مقداری از خون گرفته شده جهت اندازه گیری پارامترهای خون شناسی به لوله های آزمایش هپارینه شده منتقل شد. همچنین، مقداری از آن برای جداسازی سرم و سنجش پارامترهای



شکل ۲ - مقطع بافتی گناده فیل ماهی ماده مرحله پری ویتلوژنیک با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین. N= هسته، Nu= هستک و Cy= سیتوپلاسم.

مجازی امیری و همکاران (۱۹۹۶) تعیین شد (شکل ۲).

MCH (مقدار متوسط هموگلوبین گلبول قرمز)

$(pg.cell^{-1}) = (\text{تعداد گلبول‌های قرمز} / \text{هموگلوبین}) \times 10 \times$

۷.۲. آنالیز آماری

جهت آنالیز آماری داده‌ها، ابتدا وضعیت نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov و همگنی واریانس‌ها با آزمون Levene مورد بررسی قرار گرفت. جهت مقایسه پارامترهای بیوشیمیایی و هماتولوژیک به ترتیب از آنالیز واریانس دو طرفه (Two-Way ANOVA) و یک طرفه (One-Way ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی در سطح معنی‌داری ۵٪ استفاده گردید. اختلاف میانگین‌ها در کلیه موارد با سطح معنی‌داری $P < 0.05$ تعیین شد. سطوح پارامترها بین گروه‌های کنترل و تیمار، سه هفته و دو ماه پس از کاشت با استفاده از آزمون t مستقل مقایسه شدند. تجزیه و تحلیل با نرم‌افزار SPSS (Version 16, Chicago, IL, USA) انجام شد. تمامی داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد بیان شده‌اند.

۳. نتایج

۱.۳. شاخص‌های بیوشیمیایی

آنالیز دو طرفه داده‌های بیوشیمیایی نشان داد که مقدار گلوکز گروه‌های کنترل و تیمار از ابتدای دوره تا سه هفته پس از آن بالا بود ولی در هر دو گروه روند کاهشی داشت و پس از دو ماه به کمترین میزان خود رسید ولی پس از دو ماه مقدار گروه تیمار بیشتر از

MCHC (غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز)

$(g.dL^{-1}) = (\text{هماتوکریت} / \text{هموگلوبین}) \times 100 \times$

همچنین شمارش افتراقی گلبول‌های سفید (شامل لنفوسیت، مونوسیت، ائوزینوفیل و نوتروفیل) با روش Gao و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد. به‌طور خلاصه، پس از تهیه گسترش خونی و خشک شدن لام‌ها با متانول خالص تثبیت شدند. سپس با گیمسا رنگ‌آمیزی شدند و پس از ۲۰ دقیقه لام‌ها شسته شدند و در دمای اتاق خشک شدند. پس از آن، لام‌ها در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $\times 100$ و روغن ایمرسیون مشاهده شدند و درصد هر نوع سلول به طور جداگانه محاسبه گردید.

۶.۲. بافت‌شناسی

برای تأیید مرحله رسیدگی جنسی ماهی‌ها، نمونه‌هایی از گناده با عمل بیوپسی برداشته شده و در محلول بوئن (مایع تثبیت کننده حاوی اسید پیکریک اشباع ۷۱/۴۳ درصد، فرمالین ۲۳/۸۱ درصد و اسید استیک گلاسیال ۴/۷۶ درصد) به مدت ۲۴ ساعت تثبیت و سپس به اتانول ۷۰ درصد منتقل شدند. بافت‌ها طبق روش‌های متداول بافت‌شناسی عمل‌آوری و برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون با میکروتوم تهیه شد. اسلایدها با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری (Nikon E600, Tokyo, Japan) مشاهده شدند. مرحله رسیدگی طبق روش

جدول ۱ - سرعت تغییرات شاخص های بیوشیمیایی سرم خون فیل ماهی ماده پرورشی در اثر کاشت هورمون ۱۱-کتوستوسترون (میانگین \pm خطای استاندارد؛ برای هر تیمار $n=6$)

زمان نمونه برداری	گروه	گلوکز (mg.dL ⁻¹)	آلبومین (g.dL ⁻¹)	کلسیم (mg.dL ⁻¹)	فسفر (mg.dL ⁻¹)	آلکالین فسفاتاز (IU.L ⁻¹)	کلیستول (mg.dL ⁻¹)	HDL (mg.dL ⁻¹)	LDL (mg.dL ⁻¹)	VLDL (mg.dL ⁻¹)	
ابتدای دوره	کنترل	7.0 ^a ± 0.11	0.87 ± 0.18	9.3 ± 0.3 ^a	12.6 ± 1.0 ^a	31.0 ± 0.3 ^a	47.97 ± 9.85 ^b	6.8 ± 0.3 ^b	33.0 ± 0.5 ³	38.4 ± 0.5 ^a	
	تیمار	62.57 ± 4.6 ^{ab}	0.73 ± 0.13	7.83 ± 0.8 ^{ab}	11.4 ± 0.17 ^{ab}	31.43 ± 2.6 ^a	5.4 ± 0.4 ^a	7.86 ± 0.9 ^b	31.71 ± 2.3 ^a	35.0 ± 0.4 ^{ab}	
	کنترل	6.81 ± 0.7 ^a	0.75 ± 0.07	8.46 ± 0.6 ^{ab}	12.36 ± 0.4 ^a	27.52 ± 0.11 ^{ab}	4.83 ± 0.7 ^{ab}	1.42 ± 0.3 ^a	32.2 ± 0.6 ^{ab}	33.2 ± 0.6 ^{ab}	
	تیمار	59.28 ± 0.6 ^{ab}	0.52 ± 0.06	6.38 ± 0.2 ^b	12.32 ± 0.5 ^{ab}	12.9 ± 0.11 ^{ab}	6.0 ± 0.8 ± 0.9 ^{ab}	11.57 ± 0.57 ^{ab}	27.14 ± 2.1 ^{ab}	31.0 ± 0.2 ^{ab}	
پس از سه هفته	کنترل	46.0 ± 0.7	0.47 ± 0.07	6.3 ± 0.3 ^b	8.24 ± 0.6 ^c	24.1 ± 0.3 ^a	6.1 ± 0.3 ^{ab}	11.4 ± 0.6 ^{ab}	28.2 ± 0.4 ⁴	21.0 ± 0.3 ^{ab}	
	تیمار	51.0 ± 0.1 ⁴	0.62 ± 0.03	6.88 ± 0.1 ^{ab}	9.3 ± 0.4 ^{bc}	27.0 ± 0.57 ^{bc}	7.7 ± 0.3 ^{ab}	16.0 ± 0.1 ^a	32.71 ± 1.1	28.14 ± 2.7 ^{ab}	
بعد از دو ماه	Two-Way ANOVA										
	زمان	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	تیمار	-	0.001	0.10	0.000	0.039	0.004	0.000	0.743	0.743	0.11
	زمان × تیمار	-	0.799	0.54	0.471	0.289	0.044	0.078	0.709	0.709	0.869
		0.258	0.178	0.085	0.189	0.092	0.015	0.11	0.242	0.325	

VLDL: very low density lipoprotein ،HDL: High-density lipoprotein ($P < 0.05$) است آن شاخص دار در آن کاشت هورمون ۱۱-کتوستوسترون (میانگین \pm خطای استاندارد؛ برای هر تیمار $n=6$)
حروف مختلف هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در آن شاخص است ($P < 0.05$)

جدول ۲ - تغییرات شاخص های هماتولوژیک خون فیل ماهی ماده پرورشی در اثر کاشت هورمون ۱۱-کتوستوسترون (میانگین \pm خطای استاندارد؛ برای هر تیمار $n=6$)

زمان نمونه برداری	گروه	RBC ($\times 10^3$ cell.mL ⁻¹)	هموگلوبین (g.dL ⁻¹)	هماتوکریت (%)	MCV (fL)	MCH (pg.cell ⁻¹)	MCHC (g.dL ⁻¹)
پس از سه هفته	کنترل	6.9/43 ± 1.6/17 ^b	6.17 ± 0.21	27.0 ± 1.0 ²	44.18 ± 6.79 ^a	10.86 ± 1.39 ^a	22.71 ± 0.18
	تیمار	58.71 ± 1.6/12 ^b	6.0 ± 0.19	26.57 ± 0.78	45.21 ± 1.94 ^a	10.35 ± 1.11 ^a	22.75 ± 0.20
بعد از دو ماه	کنترل	7.01 ± 0.23/9.8 ^a	5.6 ± 0.27	24.67 ± 1.33	35.1 ± 0.33/19 ^b	7.93 ± 0.21 ^b	22.5 ± 0.34
	تیمار	77.32 ± 2.0/9.1 ^a	6.2 ± 0.17	27.13 ± 0.77	35.0 ± 0.57/15.8 ^b	8.01 ± 0.48 ^b	22.75 ± 0.16

حروف مختلف هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در آن شاخص است ($P < 0.05$)

جدول ۳ - تغییرات تعداد و درصد افتراقی گلبول‌های سفید خون فیل ماهی ماده پرورشی در اثر کاشت هورمون ۱۱-کتوتستوسترون (میانگین \pm خطای استاندارد؛ برای هر تیمار $n=6$).

زمان نمونه‌برداری	WBC (cell.mL ⁻¹)	لنفوسیت (%)	نوتروفیل (%)	مونوسیت (%)	ائوزینوفیل (%)
کنترل	۴۵۲۸/۵۷ \pm ۵۳۳/۹۵ ^b	۷۵/۴۳ \pm ۱/۰۹	۱۹/۸۶ \pm ۰/۹۱	۳/۸۵ \pm ۰/۳۴	۰/۸۶ \pm ۰/۲۶
تیمار	۴۵۲۸/۵۷ \pm ۵۴۸/۹۰ ^b	۷۲/۸۶ \pm ۱/۱۲	۲۱/۸۵ \pm ۰/۸۳	۴/۸۶ \pm ۰/۴۶	۰/۴۳ \pm ۰/۲۰
کنترل	۵۸۶۶/۶۷ \pm ۵۹۰/۲۹ ^{ab}	۷۳/۸۳ \pm ۱/۸۳	۲۰/۶۷ \pm ۱/۶۱	۴/۵۰ \pm ۰/۴۳	۱/۰۰ \pm ۰/۳۷
تیمار	۸۲۲۵/۰۰ \pm ۱۳۳۷/۸۸ ^a	۷۱/۸۸ \pm ۲/۱۴	۲۳/۰۰ \pm ۱/۵۴	۴/۶۲ \pm ۰/۶۰	۰/۵۰ \pm ۰/۲۷

حروف مختلف هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در آن شاخص است ($P<0/05$).

($P>0/05$)

۲.۳. پارامترهای خون‌شناسی

همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) پس از دو ماه افزایش معنی‌داری پیدا نمود و بیشترین مقدار آن در گروه تیمار مشاهده شد ($P>0/05$). به تبع این افزایش، شاخص‌های MCV و MCH پس از دو ماه در هر دو گروه کنترل و تیمار کاهش معنی‌داری پیدا نمود ($P<0/05$). سایر شاخص‌های هماتولوژیک (هموگلوبین، هماتوکریت و MCHC) تغییر معنی‌داری نداشتند ($P>0/05$).

تعداد گلبول‌های سفید گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری داشتند ($P<0/05$) و بیشترین مقدار آن در گروه تیمار و دو ماه پس از کاشت هورمون 11-KT ملاحظه شد ولی درصد انواع مختلف گلبول‌های سفید (لنفوسیت، نوتروفیل، مونوسیت و ائوزینوفیل‌ها) با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول ۳؛ $P>0/05$).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

۱.۴. شاخص‌های بیوشیمیایی

با توجه به اینکه گلوکز منبع تامین انرژی می باشد، در مرحله زرده سازی مقدار آن افزایش می یابد تا انرژی مورد نیاز برای توسعه تخمدانی فراهم شود. چنین نتیجه ای در مطالعه مراحل توسعه تخمدانی ماهی استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) (Akhavan et al., 2016) و تاسماهی ایرانی (A. persicus) به دست آمده است (Asadi et al., 2006). کاهش گلوکز پس از ایملنت حاوی هورمون 11-KT و یا بدون آن در این مطالعه نشان می دهد که این اتفاق تحت تاثیر هورمون 11-KT صورت

کنترل بود (جدول ۱؛ $P<0/05$). تفاوت معنی‌داری در غلظت آلبومین مشاهده نشد ($P<0/05$) ولی تقریباً روند کاهشی داشته است و پس از دو ماه مقدار گروه تیمار بیشتر از کنترل بود. بالاترین غلظت کلسیم در ابتدای دوره و در گروه کنترل بود و غلظت بقیه گروه ها و تیمارها اگرچه روند کاهشی داشت ولی اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول ۱؛ $P<0/05$). میزان فسفر از ابتدای دوره تا سه هفته بعد از ایمپلنت هورمون در هر دو گروه کنترل و تیمار با هم تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>0/05$) ولی پس از دو ماه غلظت گروه تیمار نسبت به کنترل افزایش یافت. بالاترین غلظت آنزیم ALP در اول دوره در گروه کنترل و کمترین مقدار آن سه هفته بعد در گروه تیمار مشاهده شد و پس از دو ماه روند افزایشی پیدا نمود. در این مطالعه، مقدار کلسترول و HDL در ابتدای دوره کم بود ولی پس از سه هفته افزایش یافت و به بیشترین مقدار خود پس از دو ماه در گروه تیمار شده با هورمون 11-KT رسیدند و تفاوت معنی‌داری با ابتدای دوره نداشتند ($P<0/05$). مقدار LDL در گروه‌ها و زمان‌های مختلف اختلاف معنی‌داری با هم نداشت ($P>0/05$). مقدار VLDL در ابتدای دوره بالا بود ولی سه هفته پس از ایمپلنت در گروه تیمار شده با 11-KT و پس از دو ماه در هر دو گروه کاهش یافت (جدول ۱). بر اساس نتایج آزمون t نمونه‌های مستقل بین دو گروه کنترل و تیمار، پس از سه هفته مقدار همه پارامترها به جز کلسترول کاهش یافت. مقدار این کاهش برای پارامترهای ALP، کلسیم و آلبومین معنی‌دار ($P<0/05$) و برای سایر پارامترها معنی‌دار نبود ($P>0/05$). از طرف دیگر پس از دو ماه همه پارامترهای بیوشیمیایی در گروه تیمار شده با 11-KT نسبت به گروه کنترل افزایش یافتند که این افزایش برای پارامترهای کلسترول و HDL معنی‌دار ($P<0/05$) و برای سایر پارامترها معنی‌دار نبود

حاضر روی ماهیانی صورت گرفته که همه آنها در مرحله پیش‌زرده‌سازی بودند نمی‌توان روند تغییرات این یون را مرتبط با مراحل رسیدگی جنسی قلمداد نمود. از طرفی کاهش کلسیم پس از دو ماه در گروهی که تحت تیمار هورمونی هم قرار نگرفته بودند نشان می‌دهد که این کاهش لزوماً تحت تأثیر ایمپلنت هورمون 11-KT رخ نداده است. غلظت یون‌های کلسیم و منیزیم نشان دهنده وضعیت هومئوستازی بدن موجودات نیز می‌باشد (Asadi et al., 2006). بنابراین، با توجه به کاهش مقدار کلسیم نسبت به ابتدای دوره، احتمالاً شرایط آزمایشی بر وضعیت هومئوستازی بدن ماهی‌ها تأثیر داشته است. در مهره‌داران بین غلظت‌های کلسیم و فسفر ارتباط نزدیکی وجود دارد. فسفات یکی از ترکیبات مهم در ویتلوژنین است، بنابراین ماهیان ماده‌ای که در مرحله زرده‌سازی هستند دارای مقادیر بالاتر کلسیم و فسفات هستند. در ماهیان استخوانی مانند قزل‌آلای رنگین کمان ارتباط مستقیمی بین ترکیبات پروتئینی فسفری و افزایش ویتلوژنین ماهیان ماده به اثبات رسیده است (Nagler et al., 1987). در ماهی *Channa punctatus* نیز مقدار فسفر پلاسمای خون همزمان با افزایش شاخص گنادوسوماتیک افزایش یافته است (Srivastav and Srivastav, 1998). در مطالعه حاضر، با توجه به عدم تفاوت معنی‌دار غلظت فسفر بین گروه کنترل و گروه تیمار شده با هورمون 11-KT از ابتدای دوره تا سه هفته پس از آن می‌توان گفت که این هورمون تأثیری بر غلظت فسفر نداشت اما کاهش معنادار آن پس از دو ماه در هر دو گروه کنترل و تیمار را نمی‌توان به تأثیر هورمون ارتباط داد. در مجموع بر اساس نتایج غلظت کلسیم و فسفر در این مطالعه که ایمپلنت 11-KT موجب افزایش آنها نشد می‌توان نتیجه گرفت هورمون آندروژنیک 11-KT موجب القای تولید ویتلوژنین نشد که عکس نتیجه حاصل از ایمپلنت هورمون استروژنی E2 در فیل ماهی‌های ماده مرحله پری‌ویتلوژنیک (Akhavan et al., 2015) و یا تاسماهی سبیری (*A. baerii*) تغذیه شده با هورمون E2 (Mei-Ping et al., 2009) و مطالعاتی می‌باشد که تأثیر E2 بر افزایش کلسیم را در گونه‌های مختلف نشان داده‌اند (Stahl et al., 2009; Falahatkar et al., 2014).

نگرفته است. شاید بتوان روند تغییرات گلوکز آزمایش حاضر را با پدیده استرس توجیه نمود. معمولاً مقدار گلوکز خون پس از اینکه ماهی در معرض استرس قرار می‌گیرد افزایش پیدا می‌کند که این افزایش، پاسخ ثانویه ماهی به استرس می‌باشد، کما اینکه افزایش کورتیزول پاسخ اولیه ماهی به استرس است (Percin and Konyalioglu, 2008). در این مطالعه بالا بودن مقدار گلوکز از ابتدای دوره تا سه هفته پس از آن را می‌توان به استرس ناشی از دستکاری‌های ماهی در هنگام انتخاب ماهیان مورد نظر (یک هفته قبل از شروع دوره)، انجام عمل بیوپسی و کاشت هورمون نسبت داد. افزایش مجدد گلوکز در گروه تیمار شده با 11-KT در مقایسه با گروه کنترل پس از دو ماه، حاکی از تأثیر این هورمون بر غلظت گلوکز خون است که تأثیر مثبتی در راستای تامین انرژی برای توسعه تخمدانی ماهی است. مقدار پروتئین موجود در خون با توسعه گناد ارتباط دارد. از بین پروتئین‌های خون، آلبومین مهمترین پروتئینی است که با هورمون‌های استروئیدی مانند هورمون‌های جنسی پیوند برقرار نموده و آنها را حمل و نقل می‌کند (Baker, 2002). در مطالعه حاضر مقدار آلبومین سه هفته پس از ایمپلنت در گروه تیمار به کمترین مقدار رسید، هر چند مجدداً پس از دو ماه مقداری افزایش یافت ولی به مقدار ابتدای دوره نرسید. کاهش آلبومین خلاف نتایجی است که در مطالعات تغییرات ترکیبات بیوشیمیایی خون سایر ماهیان خاویاری طی مراحل رسیدگی جنسی به دست آمده است. در ماهی ماده استرلیاد (Akhavan et al., 2016) و تاسماهی آمور (*Acipenser schrenckii*) (Zhang et al., 2014) مقدار آلبومین از مرحله پری‌ویتلوژنیک به بعد افزایش پیدا کرده است.

پیرامون نقش کلسیم در تولیدمثل بررسی‌های که در مورد برخی ماهیان استخوانی از قبیل آزادماهیان صورت گرفته حاکی از آن است که میزان نیاز کلسیم طی مرحله ویتلوژنز افزایش پیدا می‌کند (Norberg et al., 1989). مطالعات نشان می‌دهد در تاسماهی سفید (*A. transmontanus*) و تاسماهی ایرانی مقدار یون کلسیم در مرحله زرده‌سازی افزایش و در مراحل نهایی رسیدگی اووسیت کاهش یافته است (Linares-Casenave et al., 1994). با توجه به اینکه مطالعه

(Henderson and Tocher, 1987). در این مطالعه، افزایش قابل توجه و معنی‌دار HDL در گروه تیمار که پس از دو ماه به بیش از دو برابر مقدار اولیه خود رسید حاکی از تاثیر مثبت هورمون 11-KT در راستای توسعه گنادی می‌باشد زیرا افزایش HDL و کلسترول خون همزمان با حضور ویتلوژنین که پروتئین پیش‌ساز ساخت زرده می‌باشد رخ می‌دهد و HDL تامین کننده کلسترول برای گنادها است (Akhavan *et al.*, 2016).

به طور کلی، تغییرات شاخص‌های بیوشیمیایی در این مطالعه نشان می‌دهد که ایمپلنت 11-KT مقادیر گلوکز، آلبومین، کلسیم، فسفر و آلکالین فسفاتاز را تا سه هفته پس از ایمپلنت افزایش نداد ولی پس از دو ماه مقدار هر یک از این پارامترها در گروه تیمار نسبت به کنترل افزایش داشت. از طرفی، مقادیر کلسترول و HDL از سه هفته پس از ایمپلنت افزایش یافت که به توسعه گنادی کمک می‌کند. نکته حائز اهمیت این است که افزایش پارامترهای مذکور در ماهی استرلیاد و دیگر ماهی‌های اشاره شده طی مراحل مختلف رسیدگی جنسی (پیش زرده‌سازی، زرده-سازی و پس از زرده‌سازی) رخ داده است، در حالی که فیل ماهی‌هایی که مطالعه حاضر روی آنها صورت گرفت در یک مرحله رسیدگی جنسی (پیش زرده‌سازی) بودند و قطعاً روند تغییرات شاخص‌های بیوشیمیایی آنها تحت تاثیر ایمپلنت هورمونی با روند تغییرات در مراحل مختلف رسیدگی جنسی ماهی‌ها متفاوت می‌باشد.

۲.۴. پارامترهای خون‌شناسی و شمارش افتراقی

فاکتورهای متعددی مانند استرس ناشی از شرایط اسارت و دستکاری، تنوع ژنتیکی، سن، جنسیت، کیفیت آب، فصل و مراحل رسیدگی جنسی بر پارامترهای خون‌شناسی تاثیر می‌گذارند (Knowles *et al.*, 2006). مقدار RBC بیانگر ظرفیت حمل اکسیژن محلول یک موجود است و افزایش آن نشان دهنده نیاز بیشتر به اکسیژن جهت انجام متابولیسم بیشتر می‌باشد. در این مطالعه تعداد RBC پس از دو ماه افزایش معنی‌داری پیدا کرد و بیشترین مقدار آن در گروه تیمار شده با 11-KT

آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) یک آنزیم هیدرولاز مسئول حذف گروه‌های فسفات از انواع بسیاری از مولکول‌ها از جمله نوکلئوتیدها و پروتئین‌ها می‌باشد. در دستگاه تولیدمثل، سلول‌های تکای فولیکول‌های تخمدانی محل اصلی فعالیت این آنزیم هستند. در این سلول‌ها احتمالاً آنزیم ALP با جدا کردن و انتقال گروه‌های فسفات می‌تواند در فرآیند استروئیدسازی کمک کند. مطالعات نشان داده که ساخت آنزیم‌ها از قبیل ALP به وسیله هورمون‌های تخمدانی کنترل می‌شود (Bukovskaya *et al.*, 1997). بنابراین، با تغییر مقدار هورمون‌های گنادوتروپینی و تخمدانی احتمالاً میزان فعالیت آنزیم‌ها تغییر می‌کند. در مطالعه حاضر غلظت این آنزیم سه هفته پس از ایمپلنت 11-KT کاهش قابل ملاحظه‌ای پیدا نمود ولی پس از دو ماه در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. آنزیم ALP برای زرده‌سازی مورد نیاز می‌باشد و همزمان با رشد اووسیت‌ها مقدار آن افزایش می‌یابد و به تدریج در هنگام زرده سازی مصرف می‌شود. با توجه به نیاز ماهی به این هورمون برای زرده سازی، افزایش مقدار آن در گروه تیمار نسبت به کنترل بعد از دو ماه به لحاظ تولیدمثلی تاثیر مثبت ایمپلنت 11-KT تلقی می‌شود.

کلسترول به وسیله ترکیبات لیپوپروتئینی به نام‌های LDL، VLDL و HDL در جریان خون حمل و جابجا می‌شود. بر اساس مطالعه صورت گرفته روی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، مقادیر انواع چربی‌های مذکور در مراحل مختلف تولیدمثل ماهی (قبل از رسیدگی جنسی تا اوولاسیون، تخم‌ریزی و پس از تخم‌ریزی) تغییر می‌کند (Kocaman *et al.*, 2005). در ماهی استرلیاد نقش لیپوپروتئین‌ها در حمل و نقل چربی به تخمدان اثبات شده است (Akhavan *et al.*, 2016). LDL (لیپوپروتئین با چگالی کم) واسط جذب کلسترول و استر کلسترول به درون بسیاری از بافت‌ها می‌باشد. VLDL (لیپوپروتئین با چگالی بسیار کم) مهم‌ترین تری‌گلیسرید است که نقش مهمی در حمل و نقل چربی‌ها به تخمدان ایفا می‌کند (Ando and Matsuzaki, 1996). در ماهی لیپوپروتئین غالب HDL می‌باشد و بنابراین بخش اعظم کلسترول پلاسما به وسیله HDL حمل و نقل می‌شود

گلبول‌های سفید نمی‌توان بیان کرد. بررسی پارامترهای هماتولوژیک و شمارش افتراقی نشان داد که تعداد گلبول‌های قرمز و شاخص‌های مرتبط با آن و نیز تعداد گلبول‌های سفید در مراحل و گروه‌های مختلف با هم اختلاف معنی‌دار داشت و سایر پارامترها تحت تاثیر ایمپلنت‌های صورت گرفته و شرایط آزمایشی قرار نگرفتند.

افزایش مقدار برخی از پارامترهای بیوشیمیایی طی مدت دو ماه پس از ایمپلنت هورمون آندروژنیک 11-KT در فیل ماهی‌های ماده مرحله پری‌ویتلوژنیک، نشان دهنده تاثیر مثبت این هورمون در جهت تسریع روند رسیدگی جنسی این ماهی می‌باشد. با این حال لازم است بررسی روند تغییرات پارامترهای مذکور همراه با تغییرات سایر ویژگی‌های فیزیولوژیک ماهی تحت تیمارهای مختلف هورمونی و در مدت طولانی‌تر مورد مطالعه قرار گیرد تا مشخص گردد ماهی در چه زمانی وارد مرحله زرده‌سازی می‌گردد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از پژوهشکده حوضه آبی دریای خزر دانشگاه گیلان بابت حمایت پژوهشی طی قرارداد شماره ۱۸۵۳۹۵۹ از پژوهش حاضر تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

References

- Akhavan, S.R., Falahatkar, B., Tolouei Gilani, M.H., Lokman, P.M., 2015. Effects of estradiol-17 implantation on ovarian growth, sex steroid levels and vitellogenin proxies in previtellogenic sturgeon *Huso huso*. *Animal Reproduction Science*, 157, 1-10.
- Akhavan, S.R., Salati A.P., Falahatkar, B., Jalali S.A.H., 2016. Changes of vitellogenin and Lipase in captive Sterlet sturgeon *Acipenser ruthenus* females during previtellogenesis to early atresia. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42, 967-978.
- Ando, S., Matsuzaki, M., 1996. A unique lipoprotein profile found in the plasma of cultured Japanese eel. *Fish Physiology and Biochemistry*, 15, 469-479.
- Asadi, F., Masoudifar, M., Valhi, A., Lee, K., Pourkabir, M., Khazraeinia, P., 2006. Serum biochemical parameters of *Acipenser persicus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 32, 43-47.
- Baker, M.E., 2002. Albumin, steroid hormones and the origin of vertebrates. *Journal of Endocrinology*, 175, 121-127.
- Bukovskaya, O.S., Lambert, J.G.D., Kime, D.E., 1997. In vitro steroidogenesis by gonads of the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedti* Brandt. *Fish Physiology and Biochemistry*, 16, 345-353.
- Bayunova, L., Barannikova, I., Semenkova, T., 2002. Sturgeon stress reactions in aquaculture. *Journal of Applied Ichthyology*, 18, 397-404.
- Chebanov, M.S., Galich, E.V., 2011. Sturgeon hatchery manual. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 558. Ankara, FAO. 303 p.
- Crim, L.W., Sherwood, N.M., Wilson, C.E., 1988. Sustained hormone release. II. Effectiveness LHRH analog (LHRHa) administration by either single time injection or cholesterol pellet implantation on plasma gonadotropin levels in a bioassay model fish, the juvenile rainbow trout. *Aquaculture*, 74, 87-95.

- Falahatkar, B., Tolouei Gilani, M.H., Falahatkar, S., Abbasalizadeh, A., 2011. Laparoscopy, a minimally-invasive technique for sex identification in cultured great sturgeon *Huso huso*. *Aquaculture*, 321, 273-279.
- Falahatkar, B., Akhavan, S.R., Tolouei Gilani, M.H., Abbasalizadeh, A., 2013. Sex identification and sexual maturity stages in farmed great sturgeon, *Huso huso* L. through biopsy. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 14, 133-139.
- Falahatkar, B., Poursaeid, S., Meknatkhah, B., Khara, H., Efatpanah, I., 2014. Long-term effects of intraperitoneal injection of estradiol-17 on the growth and physiology of juvenile stellate sturgeon *Acipenser stellatus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40, 365-373.
- Falahatkar, B., 2015. Endocrine changes during the previtellogenic stage of the great sturgeon, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). *Journal of Applied Ichthyology*, 31, 830-838.
- Fitzpatrick, M.S., Van Der Kraak, G., Schreck, C.B., 1986. Profiles of plasma sex steroids and gonadotropins in Coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, during final maturation. *General and Comparative Endocrinology*, 62, 437-451.
- Forsgren, K.L., Young, G., 2010. The regulatory role of sex steroids during primary growth of ovarian follicles of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Integrative and Comparative Biology*, 50 (1), 54.
- Friedewald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S., 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 18, 499-502.
- Gao, Z., Wang, W., Abbas, K., Zhou, X., Yang, Y., Diana, J.S., Wang, H., Wang, H., Li, Y., 2007. Haematological characterization of loach *Misgurnus anguillicaudatus*: a comparison among diploid, triploid and tetraploid specimens. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 147A, 1001-1008.
- Gill, A., Jamnongjit, M., Hammes, S.R., 2004. Androgens promote maturation and signaling in mouse oocytes independent of transcription: a release of inhibition model for mammalian oocyte meiosis. *Molecular Endocrinology*, 18, 97-104.
- Hamlin, H.J., Milnes, M.R., Beaulaton, C.M., Albergotti, L.C., Guillette, L.J., 2011. Gonadal stage and sex steroid correlations in Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*, habituated to a semitropical environment. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42, 313-320.
- Henderson, R.I., Tocher, D.R., 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Progress in Lipid Research* 26, 281-347.
- Hugues, J.N., Durnerin, I.C., 2005. Impact of androgens on fertility - physiological, clinical and therapeutic aspects. *Reproductive BioMedicine Online*, 11, 570-580.
- Houston, C.B., 1990. Blood and Circulation. In: Shreck, C.B., Moyle, P.B. (Eds.). *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, U.S.A. 273-322.
- Kaminski, R., Kuszniierz, J., Myszkowski, L., Wolnicki, J., 2004. The first attempt to artificially reproduce the endangered cyprinid lake minnow *Eupallasea perenurus* (Pallas). *Aquaculture International*, 12, 3-10.
- Kazeto, Y., Tosaka, R., Matsubara, H., Ijiri, S., Adachi, S., 2011. Ovarian steroidogenesis and the role of sex steroid hormones on ovarian growth and maturation of the Japanese eel. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 127, 149-154.
- Knowles, S., Hrubec, T.C., Smith, S.A., Bakal, R.S., 2006. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*). *Veterinary Clinical Pathology*, 35, 434-440.
- Kohn, Y.Y., Symonds J.E., Lokmana, P.K., 2013. The effects of 11-ketotestosterone on ovarian physiology of previtellogenic captive hapuku (*Polyprion oxygeneios*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 166A, 496-502.
- Kocaman, E.M., Yamk, T., Erdogan, O., Ciltas, A.K., 2005. Alterations in cholesterol, glucose and triglyceride levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 4, 801-804.
- Köprücü, S.S., Köprücü, K., Ural, M.S., İspir, U., Palac, M., 2006. Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86, 99-105.
- Kortner, T.M., Rocha, E., Arukwe, A., 2009. Androgenic modulation of early growth of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) previtellogenic oocytes and zona radiate related genes. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 72A, 184-195.
- Leonard, J.B.K., McCormick, S.D., 2005. Changes in haematology during upstream migration to American shad. *Journal of Fish Biology*, 54, 1218-1230.
- Linares-Casenave, J.L., Kroll K.G., Eenennaam V.J.P., Doroshov S.I., 1994. Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plasma vitellogenin in white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. In: D.D. Mackinlay, (Ed.). *High performance fish*. Fish Physiology Association, Vancouver, 165-169.
- Lokman, P.M., Vermeulen, G.J., Lambert, J.G.D., Young, G., 1998. Gonad histology and plasma steroid profiles in wild New Zealand freshwater eels (*Anguilla dieffenbachii* and

- A. australis*) before and at the onset of the natural spawning migration. I. Females. *Fish Physiology and Biochemistry*, 19, 325-338.
- Lokman, P.M., Harris, B., Kusakabe, M., Kime, D.E., Schulz, R.W., Adachi, S., Young, G., 2002. 11-oxygenated androgens in female teleosts: prevalence, abundance, and life history implications. *General and Comparative Endocrinology*, 129, 1-12.
- Lokman, P.M., George, K.A.N., Divers, S.L., Algie, M., Young, G., 2007. 11-Ketotestosterone and IGF-1 increase the size of previtellogenic oocyte from shortfinned eel, *Anguilla australis*, in vitro. *Reproduction*, 133, 955-967.
- Lokman P.M., Wylie, M.J., Downes, M., Di Biase, A., Damsteegt, E.L., 2015. Artificial induction of maturation in female silver eels, *Anguilla australis*: The benefits of androgen pre-treatment. *Aquaculture*, 437, 111-119.
- Lutz, L.B., Cole, L.M., Gupta, M.K., Kwist, K.W., Auchus, R.J., Hammes, S.R., 2001. Evidence that androgens are the primary steroids produced by *Xenopus laevis* ovaries and may signal through the classical androgen receptor to promote oocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 13728-13733.
- Matsubara, H., Kazeto, Y., Ijiri, S., Lokman, P.M., Abe, T., Seki, S., Inaba, K., Hirai, T., Adachi, S., Yamauchi, K., 2001. Changes in expression of steroidogenic enzyme genes in the Japanese eel ovary during artificial maturation, In: Aida, K., Tsukamoto, K., Yamauchi, K. (Eds.), *Proceedings of the International Symposium Advances in Eel Biology*, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, 213-215.
- Mei-Ping, T., Ping, Z., Tao, Z., Long-Zhen, Z., Shi-Wei, Y., 2009. Effects of dietary estradiol-17 β on reared juvenile Siberian sturgeon *Acipenser baerii*. 6th International Symposium on Sturgeon. Wuhan, China.
- Mojazi Amiri, B., Maebayashi, M., Hara, A., Adachi, S., Yamauchi, K. 1996. Ovarian development and serum sex steroid and vitellogenin profiles in the female cultured sturgeon hybrid, the bester. *Journal of Fish Biology*, 48, 1164-1178.
- Nagler, J.J., Ruby, S.M., Idler, D.R., So, Y.P., 1987. Serum phosphoprotein phosphorus and calcium levels as reproductive indicators of vitellogenin in highly vitellogenic mature female and estradiol-injected immature rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Zoology*, 65, 2421-2425.
- Norberg, B., Bjornsson, B.T., Brown, C.L., Wichardt, U.P., Deftos, L.J., Haux, C.L., 1989. Changes in plasma vitellogenin, sex steroids, calcitonin and thyroid hormones related to sexual maturation in female brown trout (*Salmo trutta*). *General and Comparative Endocrinology*, 75, 316-326.
- Percin, P., Konyalioglu, S., 2008. Serum biochemical profiles of captive and wild northern bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L. 1758) in the Eastern Mediterranean. *Aquaculture Research*, 39, 945-953.
- Poursaeid, S., Falahatkar, B., Mojazi Amiri, B., Van Der Kraak, G., 2012. Effects of long-term cortisol treatments on gonadal development, sex steroids levels and ovarian cortisol content in cultured great sturgeon *Huso huso*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 163A, 111-119.
- Rocha, M.P., Maranhao, R.C., Seydell, T.M., Barcellos, C.R., Baracat, E.C., Hayashida, S.A., Bydlowski, S.P., Marcondes, J.A., 2010. Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins and lipid transfer to high-density lipoprotein in young obese and normal-weight patients with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 93, 1948-1956.
- Sharpe, R.L., MacLachy, D.L., 2007. Lipid dynamics in goldfish (*Carassius auratus*) during a period of gonadal recrudescence: effects of b-sitosterol and 17 β -estradiol exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 145C, 507-517.
- Srivastav, S.K., Srivastav, A.K., 1998. Annual changes in serum calcium and inorganic phosphate levels and correlation with gonadal status of a freshwater murrel, *Channa punctatus* (Bloch). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 31, 1069-1073.
- Stahl, M.T., Whitledge, G.W., Kelly, A.M., 2009. Reproductive biology of middle Mississippi River shovel nose sturgeon: insights from seasonal and age variation in plasma sex steroid and calcium concentrations. *Journal of Applied Ichthyology*, 25, 75-82.
- Svetina, A., Matasin, Z., Tofant, A., Vucemilo, M., Fijan, N., 2002. Hematology and some blood chemical parameters of young carp till the age of three years. *Acta Veterinaria Hungarica*, 50, 459-467.
- Walters, K.A., Simanainen, U., Handelsman, D.J., 2010. Molecular insights into androgen actions in male and female reproductive function from androgen receptor knockout models. *Human Reproduction Update*, 16, 543-558.
- Zhang, L.Z., Zhang, T., Zhuang, P., Zhao, F., Wang, B., Feng, G.P., Song, C., Wang, Y., Xu, S.J., 2014. Discriminant analysis of blood biochemical parameters at different developmental gonad stages and gender identification for controlled breeding of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*, Brandt, 1869). *Journal of Applied Ichthyology*, 30, 1207-1211.