اثرکاشت مکرر هورمون تری یدوتیرونین بر عملکرد فیزیولوژیک فیل ماهی ماده پرورشی (*Huso huso*)

سمانه پورسعید[1]،بهرام فلاحتکار[1*]، باقر مجازی امیری[2]

۱.گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران

۲. استادگروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی اثرات کاشت هورمون تری یدوتیرونین (T_3) بر عملکرد فیزیولوژیک فیل ماهیان (*Huso huso*) ماده پرورشی انجام پذیرفت. در این مطالعه، سه گروه آزمایشی و پنج عدد ماهی به ازای هر گروه در نظر گرفته شد. تیمار های آزمایش شامل تیمار شاهد (دریافت کننده کپسول های حاوی کره کاکائو)، سطح پایین T_3 (T_1؛۱ میلی گرم T_3 به ازای هر کیلوگرم وزن بدن + کره کاکائو) و سطح بالای T_3 (T_{10}؛۱۰ میلی گرم T_3 به ازای هر کیلوگرم وزن بدن + کره کاکائو) بودند. کپسول های حاوی هورمون-کره کاکائو، به صورت داخل صفاقی در بدن فیل ماهیان پرورشی سه ساله در مرحله پیش زرده گیری (وزن متوسط ۱۰۰/۹ ± ۶۹۹۹/۷ گرم) هر ۶ هفته و به مدت شش ماه از بهمن ۸۸ تا مرداد ۸۹ کاشته شدند. تغییرات هورمونی (T_3، کورتیزول و ACTH) و پارامتر های بیوشیمیایی (گلوکز، کلسترول و کلسیم) در شروع آزمایش و سه هفته پس از هر مرحله ایمپلنت اندازه گیری شدند. شاخص های رشد (WG، SGR و CF) در شروع و پایان دوره آزمایش تعیین گردیدند. تغییرات معنی داری در غلظت هورمون های تیروئیدی در ماهیان تیمار شده با هورمون T_3مشاهده شد ($P< 0.05$). غلظت کورتیزولسرم خون در ماهیان تیمار شده با دوز های مختلف T_3به طور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود ($P< 0.05$). غلظت گلوکز و کلسیم سرم در ماهیان تیمار شده با دوز بالای T_3به طور معنی داری بیشتر از دو گروه آزمایشی دیگر بود ($P< 0.05$). اختلاف معنی داری در غلظت ACTH بین تیمارهای مختلف در آخرین نمونه گیری و کلسترول در دومین نمونه گیری مشاهده شد ($P< 0.05$). وزن نهایی ماهیان تیمار T_1 به طور معنی داری از گروه شاهد بیشتر بود ($P< 0.05$). نتایج این مطالعات نشان داد که ایمپلنت T_3 قادر است پارامترهای فیزیولوژیک فیل ماهی را تحت تاثیر قرار دهد و در دوزهای فیزیولوژیک اثرات مثبت بر رشد سوماتیک این گونه دارد.

واژگان کلیدی: هورمون تری یدو تیرونین، ایمپلنت، رشد،فیل ماهی

۱. مقدمه

هورمونهای تیروئیدی شامل تیروکسین (T_4) و تری یدو تیرونین (T_3) هورمونهایی مشتق شده از اسید آمینه تیروزین می باشند که توسط غده تیروئید ساخته و ترشح می شوند (Raine et al., 2001). تعداد اندام ها، دستگاه های بدن و روند سوخت و سازی که تحت تاثیراین هورمون هاقرار می گیرند بیش از هر هورمون دیگری است (Eales, 2006). در ماهیان، این هورمون‌ها بسیاری از فرآیندهای بیولوژیک نظیر رشد و نمو، متابولیسم، تنظیم اسمزی، دگردیسی، مصرف اکسیژن و تولید مثل را در ارتباط و هماهنگی با سایر هورمون ها تنظیم می کنند (Eales, 2006; Blanton and Specker, 2007; Raine, 2011).

هورمون های تیروئیدی قادر به تحت تاثیر قرار دادن رشد به صورت مستقیم از طریق گیرنده های مربوطه و یا غیر مستقیم از طریق ارتباط متقابل و اثرات مثبت با دیگر هورمون ها هستند (Eales, 2006). مطالعات انجام شده نشان داده است که هورمون های تیروئیدی در سطوح فیزیولوژیک باعث بهبود ضریب تبدیل غذایی، افزایش جذب غذا، تحریک مصرف غذا، افزایش تغذیه در ماهیان، افزایش فعالیت آنزیم های روده‌ای (Woo et al., 1991; Lee Moon et al., 1994)، افزایش سنتز RNA، افزایش سنتز پروتئین در بافت هایی مثل کبد و عضله (De et al., 1989)، افزایش رشد استخوان و غضروف (Takagi et al., 1994) و رشد فلس (Shinobu and Mugiya, 1994) می شود. البته اثرات هورمون های تیروئیدی بر رشد ماهیان متغیر می باشد و به عواملی همچون فاکتور های داخلی نظیر گونه، سن، سطوح پلاسمایی سایر هورمون های آنابولیک و کاتابولیک (Rousseau et al., 2002; Schimid et al., 2003; Eales et al., 2004) و فاکتورهای خارجی نظیر درجه حرارت، غذا، دفعات غذادهی، رژیم های نوری و عوامل استرس زا وابسته است (Martinez et al., 1995; Ansal and Kaur, 1998; Leiner and MacKenzie, 2001; Nankervis et al., 2000; Todd and Eales, 2002).

بیشتر مطالعات در خصوص اثرات تجویز هورمون T_3 بر رشد و پاسخ های فیزیولوژی در ماهیان استخوانی و به ویژه در گونه های مختلف آزادماهیان انجام شده است و مطالعات اندکی در زمینه عملکرد تیروئید در ماهیان خاویاری وجود دارد. Detlaf و Davydova در سال ۱۹۷۴ با مطالعه بر روی ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) نشان دادند که هورمون های تیروئیدی برای بلوغ و اوولاسیون تخم ها لازم هستند.

دستکاری های هورمونی به عنوان یک ابزار مطالعاتی و کاربردی در جهت شناخت بهتر از نقش و عملکرد هورمون مربوطه روی سیستم های فیزیولوژیک ماهیان بکار گرفته می شود (Lankford et al., 2006). یکی از روش های دستکاری هورمونی، تجویز هورمون به صورت کاشت[۲۷] می‌باشد که باعث رهش آهسته (رسانش پایدار) و تاثیر طولانی مدت هورمون می‌شود. کاشت هورمون در مقایسه با روش تجویز خوراکی که عمدتا در ماهیان کوچک و جوان استفاده می شود برای ماهیانی با اوزان بالا کاربردی تر می باشد. نظر با اینکه اثرات متنوع هورمون های تیروئیدی روی رشد و متابولیسم ماهیان استخوانی به خوبی ثابت شده است بنابراین ضرورت انجام این گونه مطالعات روی ماهیان غضروفی- استخوانی احساس می شود. لذا این مطالعه با هدف بررسی اثر کاشت هورمون T_3 که شکل فعال و بیولوژیک هورمون های تیروئیدی است و دارای اثرات چند برابری نسبت بهT_4 می باشد بر عملکرد فیزیولوژی (شامل تغییرات T_3، کورتیزول، ACTH،گلوکز، کلسترول

1.Implantation

و کلسیم) در فیل ماهی (*Huso huso*) ماده پرورشی که یکی از مهم ترین گونه های ماهیان خاویاری با رشد سریع و دارای خاویار با کیفیت بالا است طراحی و اجرا گردید.

۲. مواد و روش ها

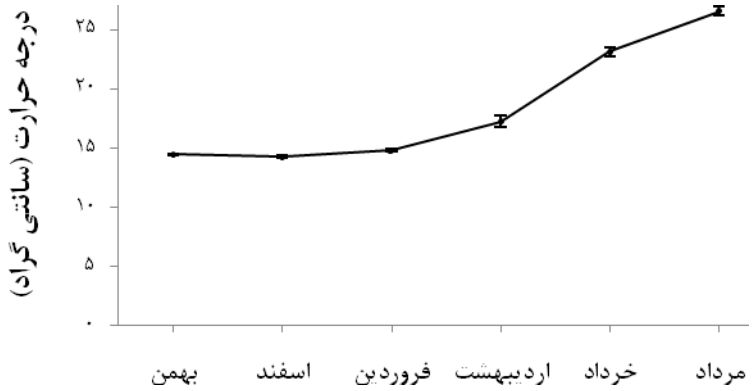
ماهی

کلیه مراحل اجرایی این تحقیق در مزرعه پرورش ماهیان خاویاری مروارید قروق تالش واقع در استان گیلان در سال ۸۹ -۱۳۸۸ انجام پذیرفت. فیل ماهیان مورد مطالعه حاصل تکثیر مصنوعی مولدین در مجتمع تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی در سال ۱۳۸۵ بودند که پس از عادت دهی به غذای دستی به مزرعه مذکور منتقل شدند و به مدت سه سال در حوضچه های بتونی پرورش یافتند. برای انجام این آزمایش ابتدا ۷۰ عدد فیل ماهی سه ساله از نظر وضعیت رسیدگی جنسی به کمک روش لاپاراسکوپی مورد ارزیابی قرار گرفتند تا از بین آنها ۱۵ عدد فیل ماهی ماده که از نظر رسیدگی جنسی در یک مرحله قرار داشتند انتخاب شوند. جنسیت و مرحله رسیدگی جنسی این ماهیان با استفاده از روش لاپاراسکوپی و تایید به وسیله بیوپسی تعیین شد (Hurvitz et al., 2007; Falahatkar et al., 2011).

از بین ماهیان بیوپسی شده، ۱۵ عدد فیل ماهی ماده سه ساله که در مرحله پیش زرده گیری قرار داشتند انتخاب و به سه گروه آزمایشی که هر گروه شامل ۵ عدد ماهی بود تقسیم بندی شدند. ماهیان انتخاب شده با پلاک های میکروچیپ توسط دستگاه پلاک زن در زیر باله پشتی علامت گذاری گردیدند. فیل ماهیان مورد مطالعه در شروع آزمایش دارای میانگین وزن ۱۰۰/۹ ± ۶۹۹۹/۷ (میانگین ±خطای معیار) گرم و طول ۰/۹±۱۰۷/۲ سانتیمتر بودند. وزن و طول کل ماهیان به ترتیب با دقت ۱۰۰ گرم و یک سانتی متر اندازه گیری شد.

شرایط نگهداری ماهیان

جهت انجام این مطالعه از یک تانک بتونی گرد (قطر ۲۹۷ سانتی متر، عمق ۵۷ سانتی متر و ظرفیت ۳۹۶۰ لیتر) که مجهز به سیستم هوادهی مداوم بودند استفاده شد. در طول دوره پرورش از آب چاه (در ماه های بهمن، اسفند، فروردین) و آب رودخانه کرکانرود (در ماه های اردیبهشت، خرداد، تیر و مرداد) استفاده شد. دبی آب ورودی به تانک پرورشی به طور متوسط ۶/۳ ± ۳۳/۹ لیتر در هر دقیقه بود. میانگین دمای آب در طول دوره ۰/۴ ± ۱۸/۴ سانتی گراد بود که نوسانات آن در طول دوره آزمایش در شکل ۱ آمده است. میانگین اکسیژن محلول در طول دوره نیز برابر ۰/۲ ± ۶/۱ میلی گرم در لیتر بود. سیستم پرورشی ماهیان به صورت باز بوده و شرایط نوری آن ها به صورت فتوپریود طبیعی در نظر گرفته شد. ماهیان در طول دوره آزمایش به میزان ۱/۵ درصد وزن بدن در سه نوبت (ساعت ۸ صبح، ۱۲ ظهر و ۴ بعد از ظهر) با استفاده از غذای تجاری GFT3 (فرادانه، شهرکرد، ایران) با محتوای پروتئین ۳۶٪، چربی ۱۴٪، خاکستر۱۰٪ و رطوبت ۱۱٪، به صورت دستی غذادهی شدند. در تمامی مراحل آزمایش، ۲۴ ساعت قبل از انجام کاشت کپسول های محتوی هورمون و نمونه گیری، غذادهی به ماهیان قطع شد.



شکل ۱. نوسانات دمای آب در طول دوره آزمایش (میانگین ± خطای معیار)

طراحی آزمایش و ساخت کپسول های حاوی هورمون

این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی شامل سه گروه آزمایشی که هر گروه شامل ۵ عدد ماهی بود انجام گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل موارد زیر بودند:

تیمار یک (شاهد؛ T_0): ۰/۲ میلی لیتر کره کاکائو

تیمار دوم (T_1):۱ میلی گرم T_3به ازای هر کیلو گرم وزن بدن + ۰/۲ میلی لیتر کره کاکائو

تیمار سوم (T_{10}):۱۰ میلی گرم T_3 به ازای هر کیلو گرم وزن بدن + ۰/۲ میلی لیتر کره کاکائو

سطوح هورمون های مورد نظر بر اساس مطالعات پیشین بر روی ماهیان استخوانی تعیین شد (Mylonas et al., 1994; Morgado et al., 2007). در این مطالعه هورمون T_3 (3, 3´, 5- triiodo-L- tironine; Sigma-Aldrich, St. Luis, Mo, USA) از شرکت سیگما تهیه شد و از کره کاکائو (Altinmarka, Istanbul, Turkey) و کپسول های ژلاتینی (با ابعاد ۵ × ۵ ×۲۰ میلی متر) برای ساخت کپسول های محتوی هورمون استفاده گردید.

به منظور آماده سازی کپسول ها، هورمون مذکور بر اساس وزن بدن ماهیان با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم وزن شده و به میزان مساوی به داخل دو کپسول ژلاتینی منتقل گردید. سپس به داخل کپسول های محتوی هورمون، ۰/۲ میلی لیتر کره کاکائو ذوب شده به عنوان حاملی برای رها سازی آهسته هورمون اضافه گردید (Trudeau et al., 1991; Zou et al., 1997). برای گروه شاهد، کپسول فقط حاوی ۰/۲ میلی لیتر کره کاکائو ذوب شده بود. کپسول های تهیه شده به صورت داخل صفاقی پس از ایجاد شکافی به طول کمتر از یک سانتی متر در بدن ماهیان گذاشته شدند. بعد از کاشت کپسول ها، محل شکاف با یک بخیه ساده با نخ ابریشمی غیر قابل جذب به قطر ۰/۹ میلی متر و با سوزن جراحی (no. G 414/4, ACUFIRM, Dreieich, Germany) بسته شد. محل بخیه با پوویدون آیوداین-مدیفارم ۱۰ درصد (شرکت تولید دارو، تهران، ایران) ضد عفونی گردید. همچنین جهت جلوگیری از عفونت های باکتریایی، ml ۱ آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین۱۰ درصد (رازک، تهران، ایران) به صورت عضلانی زیر باله پشتی ماهیان تزریق شد (Falahatkar et al., 2011).

اجرای تیمارهای هورمونی به مدت شش ماه، از بهمن ۸۸ لغایت تیر ۸۹ به طول انجامید. بر اساس منابع (Pickering and Duston, 1983; Carragher et al., 1989) و بررسی های اولیه (کاشت کپسول های حاوی هورمون به ماهیان و

خونگیری از ماهیان هر هفته به مدت یک ماه برای سنجش رهاسازی هورمون های ایمپلنت شده به منظور تعیین بهترین زمان نمونه گیری و مدت زمان تاثیر هورمون ها) مشخص گردید تاثیر هورمون ها در این روش کاشت، دو تا سه هفته می باشد، لذا کاشت هورمون هر شش هفته تکرار گردید و نمونه گیری از ماهیان هر سه هفته پس از هر مرحله ایمپلنت صورت گرفت. شایان ذکر است زخم های حاصل از جراحی کاشت کپسول ظرف دو تا سه هفته بهبود می یافتند. در مجموع، کاشت کپسول های حاوی هورمون در پنج نوبت و در تاریخ های ۱- بهمن، ۱۳- اسفند، ۲۶- فروردین، ۶- خرداد و ۱۷- تیر انجام گردید.

اندازه گیری شاخص های رشد

جهت بررسی اثر کاشت هورمون T_3 بر شاخص های رشد در انتهای آزمایش، وزن و طول کل ماهیان اندازه گیری شد (شایان ذکر است که برای ساخت کپسول، وزن ماهیان هر شش هفته اندازه گیری شد) و پارامترهایی شامل، وزن کسب شده (WG)، نرخ رشد ویژه (SGR) و فاکتور وضعیت (CF) در هر یک از گروه های آزمایشی با استفاده از فرمول های زیر تعیین شد (Falahatkar et al., 2006; Wangmi et al., 2009):

WG (گرم)= وزن اولیه (گرم) - وزن نهایی (گرم)
/ [دوره پرورش به روز ×۱۰۰

SGR (درصد در روز) = [Ln(وزن نهایی به گرم) – Ln(وزن اولیه به گرم)]
/ وزن نهایی به گرم) ×۱۰۰ (طول نهایی به سانتی متر^3)

CF =

اندازه گیری پارامترهای فیزیولوژیک

از تمام ماهیان در زمان صفر (قبل از کاشت هورمون؛ ۱- بهمن) و سه هفته بعد از هر مرحله کاشت هورمون، ml ۵ خون از سیاهرگ دمی در قسمت انتهای باله مخرجی توسط سرنگ های غیر هپارینه ۵ میلی لیتر (G-۱۸) اخذ شد. نمونه های خون به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت g ۱۶۰۰ سانتریفیوژ (Hettich, Tuttlingen, Germany) شدند. سپس سرم ها با استفاده از سمپلر جداسازی و تا زمان اندازه گیری پارامترهای هورمونی و بیوشیمیایی در دمای $-70^{\circ}C$ نگهداری شدند. انتخاب زمان های نمونه گیری متناسب با حداکثر زمان رهش هورمون تنظیم گردیدند (بر اساس مطالعه اولیه، اطلاعات منتشر نشده). در مجموع، از کلیه ماهیان در شش نوبت و در تاریخ های ۱- بهمن، ۲۲- بهمن، ۵- فروردین، ۱۶- اردیبهشت، ۲۷- خرداد و ۷- مرداد خونگیری شد.

سطوح هورمون T_3 سرم با استفاده از کیت تشخیص آزمایشگاهی Immunotech (Prague, Czech Republic) با روش رادیوایمیونواسی توسط دستگاه گاماکانتر (مدل LKB، فنلاند) سنجیده شد. کورتیزول سرم بر اساس روش ELISA با استفاده از کیت تجاری Radim (Pomezia, Roma, Italia) و به وسیله دستگاه الایزاریدر (Sirio S, Seac RADIM, Italy) اندازه گیری شد. اندازه گیری ACTH سرم با روش سنجش ایمیونورادیومتری (IRMA) با استفاده از کیت تشخیص آزمایشگاهی Immunotech (Marseille, France) و با دستگاه گاماکانتر (Genesys, Labroatory Technologies, USA) انجام پذیرفت. گلوکز و کلسترول سرم با روش آنزیم رنگ سنجی با استفاده از کیت پارس آزمون (کرج، ایران) به وسیله دستگاه اتوآنالایزر (Technicon RA-1000, USA) در طول موج ۵۴۶ -۵۰۰ نانومتر سنجش شد.کلسیم سرم به روش کالریمتریک با

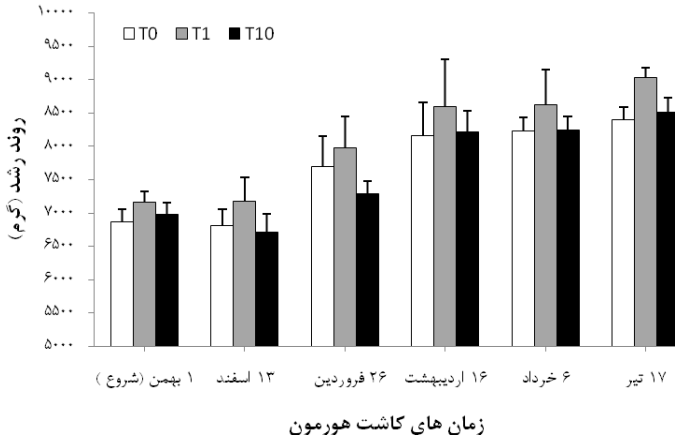
استفاده از کیت شرکت من (تهران، ایران) به وسیله دستگاه اتوآنالایزر اندازه گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

ابتدا وضعیت داده ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov براینرمال بودن داده ها و آزمون Levens برای همگنی واریانس ها، بررسی شد. بعد از اطمینان از نرمال بودن داده ها و همگنی واریانس ها، جهت تجزیه و تحلیل داده ها در طول دوره نمونه گیری از آنالیز واریانس یک طرفه با مقادیر تکراری جداگانه برای هر تیمار هورمونی استفاده شد. مقایسه میانگین ها در طول زمان با استفاده از t-test جفتی صورت پذیرفت و برای کنترل خطای نوع اول از آزمون Bonferroni استفاده گردید (Quinn and Keough, 2002). همچنین از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون چند دامنه Tukey برای مقایسه تفاوت آماری بین میانگین های سه گروه آزمایشی در هر زمان نمونه گیری و مقایسه وزن ماهیان در انتهای آزمایش استفاده شد (Zar, 1999). همچنین از آزمون t غیرجفتی برای مقایسه وزن ابتدایی و انتهایی ماهیان در هر گروه آزمایشی استفاده شد (Zar, 1999). از نرم افزار SPSS (Chicago, IL, USA, version 15) برای آنالیز آماری داده هادر سطح اعتماد ۵٪ و از Excel (Microsoft, 2007) برای رسم نمودار ها استفاده گردید. داده های درون متن به صورت میانگین ± خطای معیار (mean ± S.E) بیان شده اند.

۳. نتایج

شکل ۲ روند رشد ماهیان در طول دوره آزمایش نشان می دهد بطوری که یک روند صعودی در وزن ماهیان در تمامی تیمارها مشاهده شد. اختلاف معنی داری در وزن نهایی بین گروه های آزمایشی مشاهده شد (جدول ۱، $P=$ ۰/۰۴۶). آزمون t غیر جفتی اختلاف معنی داری بین وزن اولیه و نهایی در گروه های آزمایشی مختلف نشان داد (P<۰/۰۰۱). در پایان دوره آزمایش، اختلاف معنی داری در WG بین تیمارها مشاهده نشد ($P=$ ۰/۰۹). با وجود بالاتر بودن SGR در ماهیان تیمار شده با دوز کم T_3، اختلاف معنی داری در بین تیمارها مشاهده نشد ($P=$ ۰/۱۱۷). در خصوص CF نیز تفاوت معنی داری در بین گروه های آزمایشی مشاهده نشد (جدول ۱، $P=$ ۰/۴۷۳).



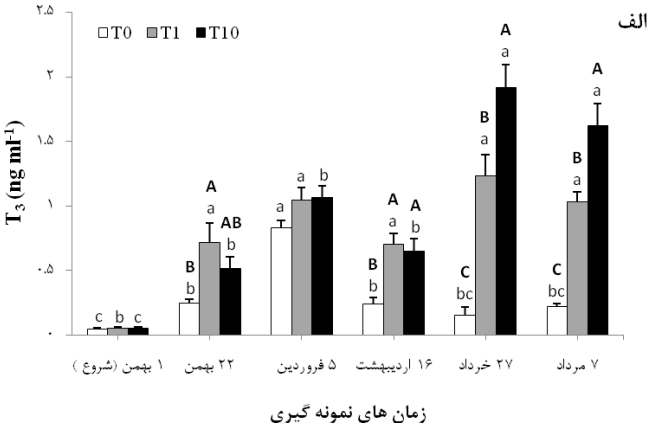
شکل ۲. روند رشد فیل ماهی ماده پرورشی پس از کاشت مکرر هورمون T_3. داده ها به صورت میانگین ± خطای معیار ارائه شده اند (برای هر تیمار ۵ =n).

جدول ۱. اثر کاشت دوز های مختلف هورمون T_3 بر شاخص های رشد فیل ماهی ماده پرورشی سه ساله، ۱۹۰ روز پس از شروع آزمایش. داده ها به صورت میانگین ± خطای معیار ارائه شده اند.

گروه های آزمایشی	وزن اولیه (گرم)	وزن نهایی (گرم)	WG (گرم)	SGR (%/day)	CF
T_0	۶۸۶۹± ۱۸۷	۸۳۹۵ ± ۱۹۹/۵ ^{b*}	۱۵۲۶ ± ۹۸/۶	۰/۱ ± ۰/۰۲	۰/۶۱ ± ۰/۰۲
T_1	۷۱۵۵ ± ۱۶۹/۲	۹۰۳۵ ± ۱۴۰/۴ ^{a*}	۱۸۸۰ ± ۱۷۲/۹	۰/۱۲ ± ۰/۰۲	۰/۶ ± ۰/۰۲
T_{10}	۶۹۷۵ ± ۱۸۰/۱	۸۵۱۵ ±۲۱۰/۳ ^{ab*}	۱۵۴۰ ± ۳۰۸/۹	۰/۱ ± ۰/۰۲	۰/۵۷ ± ۰/۰۲

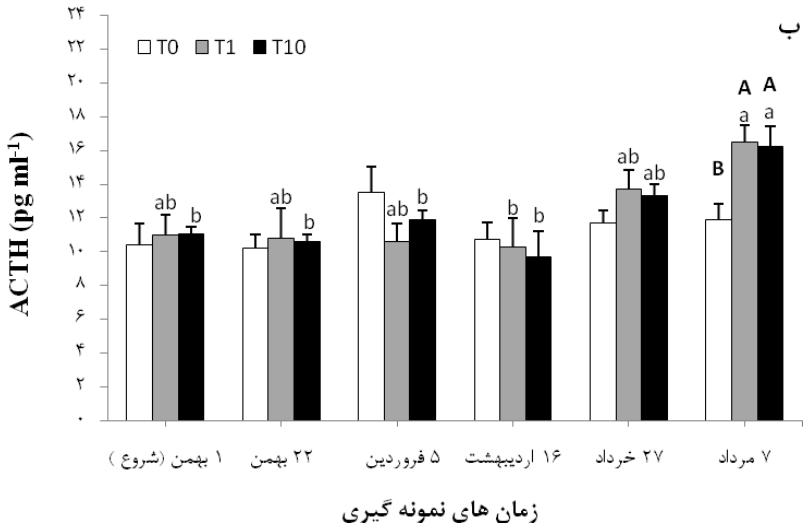
علامت * بیانگر اختلاف معنی دار بین وزن اولیه و نهایی است و حروف a و b بیانگر اختلاف معنی دار بین گروه های آزمایشی است (P<۰/۰۵).

در یک الگوی کلی، غلظت T_3سرم خون در گروه آزمایشی T_1 و T_{10} نسبت به گروه شاهد بالاتر بود. در کلیه مراحل نمونه گیری به استثنای شروع آزمایش و سه هفته پس از دومین مرحله از کاشت هورمون (۵- فروردین)، غلظت T_3سرم خون در گروه آزمایشی T_1 و T_{10} به طور معنی داری نسبت به گروه شاهد بالاتر بود (شکل ۳ الف، P<۰/۰۵). در گروه شاهد، غلظت T_3 سرم به طور معنی داری در طول دوره آزمایش تغییر کرد بطوریکه در سومین مرحله نمونه گیری (۵- فروردین) به بالاترین سطح خود رسید (شکل ۳الف، P= ۰/۰۰۰). غلظت T_3 سرم خون ماهیان تیمار T_1 در کلیه مراحل نمونه گیری پس از کاشت کپسول های هورمونی نسبت به شروع آزمایش به طور معنی داری بالاتر بود (شکل ۳الف، P= ۰/۰۰۵). پس از کاشت کپسول هایی حاوی ۱۰ میلی گرم T_3 به ازای هر کیلو گرم وزن بدن، غلظت T_3 سرم در تمامی مراحل خونگیری به طور معنی داری از شروع آزمایش بالاتر بود بطوری که در پنجمین و آخرین مرحله از نمونه گیری، غلظت آن به ترتیب ۳۶ و ۳۱ برابر شروع آزمایش اندازه گیری شد (شکل ۳الف، P= ۰/۰۰۰).



شکل ۳. روند تغییرات پارامترهای هورمونی و بیوشیمیایی سرم پس از کاشت هورمون T_3 در فیل ماهی ماده پرورشی در زمان های متفاوت نمونه برداری در طول دوره آزمایش. حروف A، B و C بیانگر اختلاف معنی دار در یک زمان نمونه گیری بین تیمار های مختلف است (P<۰/۰۵). حروف a، bو c بیانگر اختلاف معنی دار بین میانگین های یک تیمار در طول آزمایش است (P<۰/۰۵). ستون های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر تیمار فاقد اختلاف معنی دار هستند (P>۰/۰۵). داده ها به صورت میانگین ± خطای معیار ارائه شده اند (برای هر تیمار n= ۵).

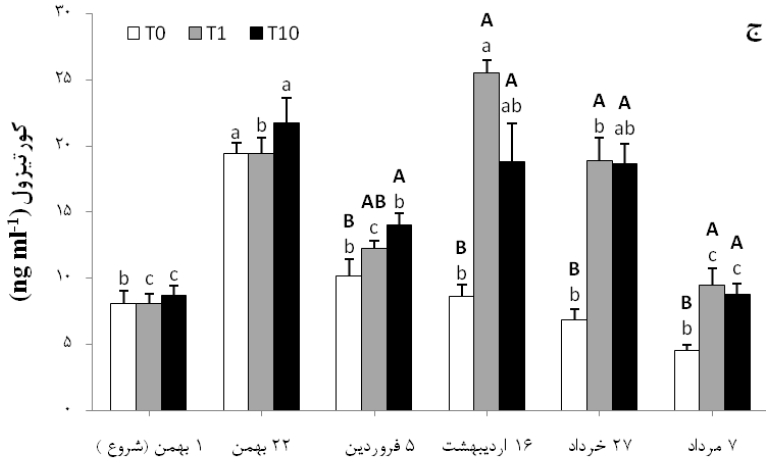
مقایسه بین تیمارها نشان داد که تنها در آخرین مرحله از نمونه گیری (۷- مرداد) اختلاف معنی داری در غلظت هورمون ACTH بین تیمارها مشاهده شد بطوریکه غلظت آن درگروه های آزمایشی T_1 و T_{10} به طور معنی داری نسبت به گروه شاهد بالاتر بود (شکل ۳ب، $P=$ ۰/۰۱۵). غلظت هورمون ACTH ماهیان گروه شاهد در طول دوره آزمایش معنی داری نبود (شکل ۳ب، $P=$ ۰/۲۴۶). در گروه آزمایشی T_1، غلظت ACTH سه هفته پس از پنجمین مرحله کاشت هورمون (۷- مرداد) به طور معنی داری بالاتر از چهارمین زمان خونگیری (۱۶- اردیبهشت) بود (شکل ۳ ب، $P=$ ۰/۰۰۲). ایمپلنت مکرر هورمون T_3 به میزان ۱۰ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تغییرات محسوسی را در غلظت ACTH سرم از شروع آزمایش تا چهارمین مرحله هورمون تراپی نشان نداد ($P>$۰/۰۵) در حالی که بعد از پنجمین مرحله هورمون تراپی، میزان ACTH سرم به طور معنی داری نسبت به سایر زمان های نمونه برداری بالاتر بود (شکل ۳ب، $P=$ ۰/۰۰۱).

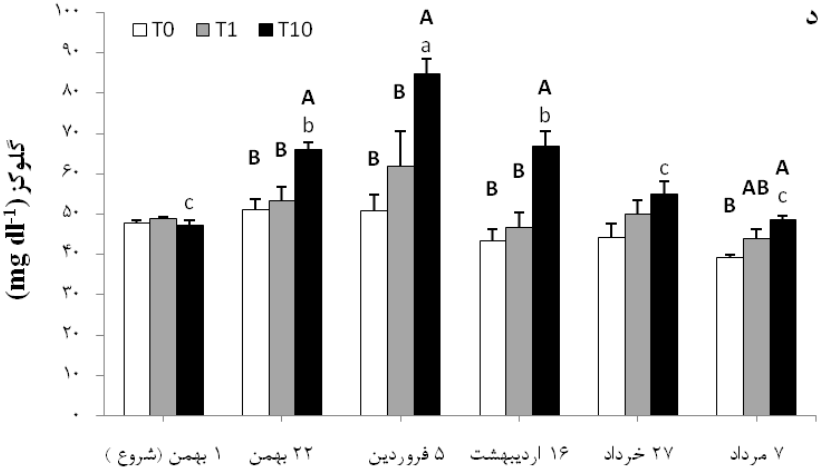


غلظت کورتیزول در ماهیان ایمپلنت شده با سطح بالای T_3 در سومین مرحله نمونه گیری (۵- فروردین) به طور معنی داری بالاتر از گروه شاهد بود (شکل ۳ج، $P=$ ۰/۰۵). در سایر زمان های نمونه گیری غلظت این هورمون استروئیدی در گروه های آزمایشی T_1 و T_{10} به طور معنی داری نسبت به گروه شاهد بالاتر بود ($P<$۰/۰۱). در گروه شاهد غلظت کورتیزول سه هفته پس از اولین مرحله کاشت کپسول های فاقد هورمون به طور معنی داری افزایش یافت (شکل ۳ج، $P=$ ۰/۰۰۰) اما در سایر مراحل نمونه گیری اختلاف معنی داری با شروع آزمایش مشاهده نشد ($P>$۰/۰۵). تغییرات این هورمون در ماهیان ایمپلنت شده با دوزهای مختلف T_3 در طول دوره آزمایش معنی دار بود بطوریکه بیشترین غلظت کورتیزول درگروه های آزمایشی T_1 و T_{10}به ترتیبدر چهارمین (۱۶- اردیبهشت) و دومین (۲۲- بهمن) مرحله از نمونه گیری اندازه گیری شد (شکل ۳ج، $P=$ ۰/۰۰۰).

در اکثر زمان های نمونه گیری غلظت گلوکز سرم ماهیان گروه T_{10} به طور معنی داری نسبت به گروه های T_1 و شاهد بالاتر بود (شکل ۳د، $P<$۰/۰۵). تغییرات دوره ای گلوکز سرم ماهیان گروه شاهد و ماهیان تیمار شده با ۱ میکروگرم

T_3 به ازای هر کیلو گرم وزن بدن در طول دوره آزمایش معنی داری نبود (شکل ۳د، $P>0/05$). غلظت گلوکز سرم در ماهیان تیمار T_{10}به طور معنی داری در طول دوره آزمایش تغییر کرد و به بالاترین سطح خود در سومین مرحله نمونه گیری (۵- فروردین) رسید (شکل ۳د، ۰/۰۰۰ =P).

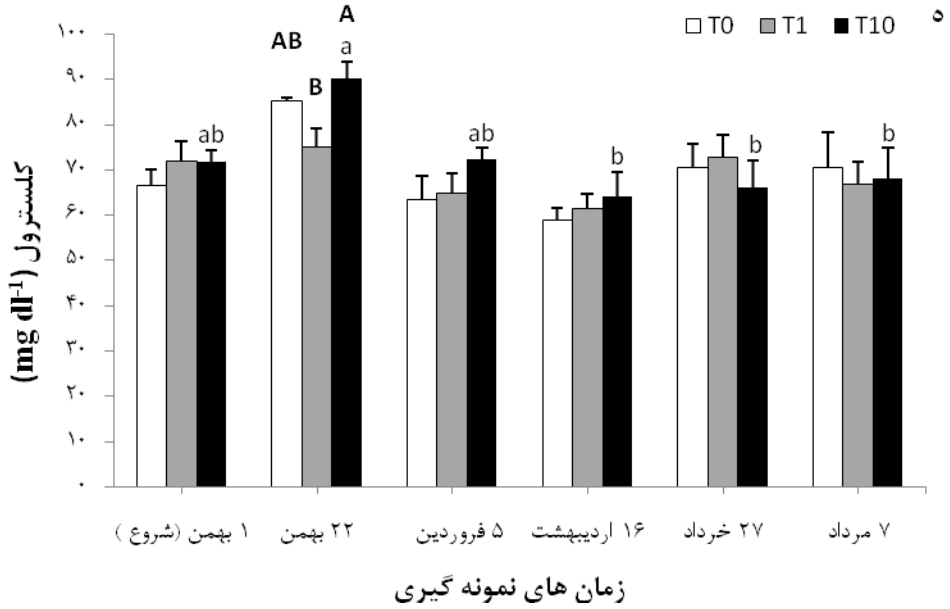


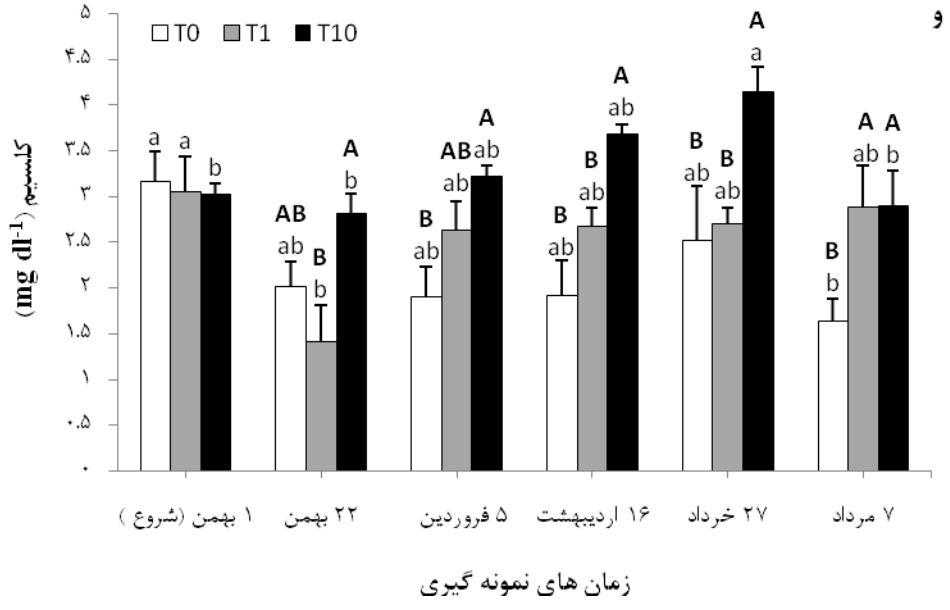


غلظت کلسترول سرم سه هفته پس از اولین مرحله کاشت هورمون در ماهیان تیمار T_{10} به طور معنی داری بالاتر از گروه آزمایشی T_1بود (شکل ۳ه، ۰/۰۰۷ =P) اما در سایر مراحل نمونه گیری اختلاف معنی داری در بین گروه های آزمایشی مشاهده نشد ($P>0/05$). اختلاف معنی داری در غلظت کلسترول سرم در طول دوره آزمایش در ماهیان تیمار شاهد و T_1 مشاهده نشد (شکل ۳ه، $P>0/05$) در حالیکه این تغییرات در ماهیان تیمار T_{10} معنی داری بود و بالاترین غلظت آن در دومین مرحله نمونه گیری (۲۲- بهمن) اندازه گیری شد (شکل ۳ه، ۰/۰۲۶ =P).

در تمام مراحل نمونه گیری به جز شروع آزمایش (۱- بهمن) و دومین مرحله خونگیری (۲۲- بهمن) غلظت کلسیم در ماهیان تیمار T_{10} به

طور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود (شکل ۳و). تغییرات دوره ای کلسیم سرم در همه گروه های آزمایشی معنی دار بود بطوریکه غلظت آن در گروه شاهد در آخرین نمونه گیری (۷- مرداد) به طور معنی داری کمتر از شروع آزمایش بود (P= ۰/۰۳۳) در حالیکه در ماهیان تیمار T_1کمترین غلظت آن سه هفته پس از اولین ایمپلنت (۲۲- بهمن) مشاهده شد (شکل ۳ و، P= ۰/۰۵). کلسیم سرم در ماهیان تیمار T_{10} در پنجمین مرحله نمونه گیری (۲۷- خرداد) به طور معنی داری بالاتر از اولین، دومین و ششمین (۷- مرداد) مرحله نمونه گیری بود (شکل ۳و، P= ۰/۰۰۸).





۴. بحث و نتیجه گیری

کاشت هورمون T_3 باعث افزایش رشد در فیل ماهیان گردید بطوریکه این افزایش رشد در دوزهای پایین به مراتب بیشتر از دوز های بالاتر بود. مطالعاتی در ارتباط با اثر هورمون T_3 بر عملکرد رشد گونه های مختلف ماهی صورت گرفته است که با نتایج بدست آمده در این بررسی مطابقت دارد. مطالعه Fagerlud و همکاران (۱۹۸۰) روی ماهی آزاد کوهو (*Oncorhynchus kisutch*) نشان داد که T_3 از طریق بهبود ضریب تبدیل غذایی، تحریک مصرف غذا و جذب بیشتر آن در ماهیان اثرات خود را القا می نماید. Saunders و همکاران (۱۹۸۵) عملکرد رشد ماهی آزاد اطلس (*Salmo salar*) که به مدت شش ماه از جیره های حاوی هورمون T_3 با سطوح مختلف (صفر، ۱۰، ۲۰ و ۱۰۰ میلی گرمT_3به ازای هر کیلو گرم غذا) تغذیه کردند را بررسی نمودند. نتایج آن ها نشان داد که وزن و طول ماهیان بسته به دوز هورمون به کار گرفته شده در جیره غذایی افزایش یافت. با این وجود، ناهنجاری هایی در ماهیان تغذیه شده با دوز بالا مشاهده گردید. همچنین Woo و همکاران (۱۹۹۱) با مطالعه روی ماهی سیم دریایی قرمز (*Chrysophrys major*) بیان نمودند که هورمون T_3 در دوز ppm ۳، سبب افزایش نرخ رشد، اشتهای ماهی، فعالیت آنزیم های روده ای و بهبود ضریب تبدیل غذایی می شود. آنها معتقدند که رشد ماهیان در نتیجه بهبود عملکرد هضم و جذب غذا افزایش یافته است. در واقع، هورمون T_3 قادر به تحت تاثیر قرار دادن رشد به صورت مستقیم از طریق گیرنده های مربوطه و یا غیر مستقیم از طریق ارتباط متقابل و اثرات مثبت با دیگر هورمون های آنابولیک می باشد (Plisetskaya et al., 1983; Hilton et al., 1987; Farbridge and Leatherland, 1988; Luo and McKeown, 1991; Moav and McKeown, 1992; Schmid et al., 2003). در مطالعه حاضر، وزن ماهیان تیمار T_1 بیشتر از وزن ماهیان تیمار T_{10} بود. این اختلاف وزنی احتمالا به دوز هورمون به کار گرفته شده مربوط می شود و به نظر می رسد که دوز های بالاتر در افزایش وزن ماهی تاثیر چندانی نداشته باشد. با توجه به نتایج این مطالعه و سایر تحقیقات به عمل آمده روی ماهیان استخوانی به نظر می رسد که هورمون های تیروئیدی برای رشد نرمال ضروری می باشند و استفاده از دوزهای فیزیولوژیک، اثر آنابولیک از خود به نمایش می گذارند، در حالیکه دوز های بالاتر این هورمون ممکن است کارایی مصرف غذا را کاهش دهند و اثرات کاتابولیک داشته و منجر به ناهنجاری های رشد گردند (Higgs et al., 1982; Luo and McKeown, 1991; Moav and McKeown, 1992; Lee Moon et al., 1994).

بررسی های صورت گرفته روی ماهیان استخوانی نشان داده است که دوزهای فیزیولوژیک این هورمون از طریق افزایش سنتز پروتئین، گلیکوژنز و ارتباط سینرژیست با سایر هورمون ها نظیر هورمون رشد، اثرات خود را القا می کند در حالی که دوزهای فارماکولوژیک باعث کاهش رشد، کاهش مصرف غذا، افزایش گلیکوژنولیز، کاتابولیسم پروتئین ها و چربی ها و کاهش ترشح هورمون رشد می گردد (Higgs et al., 1982; Plisetskaya et al., 1983; Luo and McKeown, 1991; Eales and Brown, 1993).

مطالعاتی در ارتباط با اثرات تجویز T_3 که به صورت کاشت هورمون، تزریق و یا افزودن به جیره غذایی روی ماهیان استخوانی انجام پذیرفته نشان داده است که با بکارگیری این هورمون، غلظت آن در خون افزایش می باشد (Fines et al., 1999; Morgado et al., 2007; Arjona et al., 2011). همچنین نتایج مطالعه Plohman و همکاران در سال ۲۰۰۲ روی تاس ماهی دریاچه ای نشان داد که تغذیه ماهیان در طول دو هفته از جیره ای حاوی ppm ۱۲ هورمون T_3، غلظت این هورمون را در پلاسما خون دو برابر افزایش و فعالیت آنزیم کبدی T_4-ORD (که مسئول تبدیل T_4به T_3است) را به طور معنی داری کاهش می دهد. Plohman و همکاران (۲۰۰۱ و ۲۰۰۲) نشان دادند که فعالیت T_4-ORD در غده تیروئید نیز رخ می دهد که منجر به تولید بیشتر T_3می گردد. آنها

معتقدند برخلاف ماهیان استخوانی و سایر موجودات رده بالاتر که هورمون اصلی مترشحه از غده تیروئید T_4 می باشد، در ماهیان خاویاری بیشترین هورمونی که از این غده ترشح می شود T_3 است.

با توجه به مطالعاتی که روی تاس ماهی دریاچه ای انجام گرفت به نظر می رسد که کمتر بودن غلظتT_3 در ماهیان تیمار T_{10}در تحقیق حاضر نسبت به گروه آزمایشی T_1 در چهار نمونه برداری اولیه می تواند به دلیل اثر فیدبک منفی هورمون T_3در سطح محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- غده تیروئید باشد که از ترشح بیشتر این هورمون از غده تیروئید جلوگیری کرده است (Eales and Brown, 1993; Plohman et al., 2001, 2002). یکی دیگر از دلایل پایین تر بودن غلظت T_3 سرم خون در ماهیان تیمار T_{10} در مراحل ذکر شده می تواند به دلیل اثر خود تنظیمی دوز بالای ناشی از کاشت این هورمون روی کاهش فعالیت آنزیم دیدیناز باشد که از تبدیل بیشتر هورمون T_4 به T_3 جلوگیری کرده است (Eales and Brown, 1993; Cyr et al., 1998; Fines et al., 1999; Finnson and Eales, 1999; Plohman et al., 2002). علاوه بر موارد ذکر شده، افزایش متابولیسم هورمون T_3یکی دیگر از دلایل کاهش این هورمون می تواند باشد که معمولاز طریق افزایش فعالیت آنزیم های دیدیناز در بافت هایی نظیر کبد، کلیه، مغز، آبشش صورت می گیرد (Eales and Brown, 1993; Cyr et al., 1998; Fines et al., 1999; Finnson and Eales, 1999). از سوی دیگر، ظرفیت یا تمایل کمتر پروتئین های متصل شونده به هورمون های تیروئیدی در ماهیان خاویاری نسبت به قزل آلا و در نتیجه سرعت بیشتر کلیرانس (پاک شدگی) متابولیک آن از خون، ممکن است یکی دیگر از دلایل کمتر بودن غلظت این هورمون در ماهیان تیمار شده با دوز بالای T_3 باشد (Plohman et al., 2001).

در این مطالعه، غلظت هورمون T_3 در ماهیان تیمار T_{10}در دو نمونه گیری انتهایی (۲۷- خرداد و ۷- مرداد) به طور معنی داری بالاتر از تیمار T_1 اندازه گیری شد. دلیل قطعی افزایش معنی دار این هورمون در ماهیان تیمار T_{10} به طور دقیق مشخص نیست. اما ممکن است افزایش ترشحات داخلی این هورمون از غده تیروئید به دلیل افزایش فعالیت های متابولیک بدن، تبدیل بیشتر T_4 به T_3 در بافت های محیطی نظیر غده تیروئید، کبد، روده، مغز، کلیه و گناد به دلیل افزایش فعالیت آنزیم T_4-ORD در نتیجه افزایش درجه حرارت و حتی رهش بیشتر هورمون از داخل کپسول در درجه حرارت های بالاتر باشد. دلیل تغییر هورمون T_3در اثر ایمپلنت این هورمون در فیل ماهی خیلی واضح نیست و بایستی مطالعات تکمیلی در این خصوص در سطح اندازه گیری آنزیم های مرتبط صورت گیرد.

با توجه به نتایج این مطالعه به نظر می رسد که نوسانات هورمون T_3 در طول دوره آزمایش تابع تغییرات فصلی و شدت تغذیه ماهی بوده بطوریکه با افزایش درجه حرارت، افزایش شدت تغذیه و رشد ماهی، غلظت این هورمون نیز افزایش یافت. نتایج بررسی Loter و همکاران (۲۰۰۷) در خصوص تغییرات فصلی هورمون های تیروئیدی در گربه ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*) تاییدی بر نتایج بدست آمده در این مطالعه می باشد. نتایج آن ها نشان داد که غلظت هورمون T_3 از ماه ژانویه (که درجه حرارت، مصرف غذا و رشد ماهی پایین بود) تا آوریل (که درجه حرارت، مصرف غذا و رشد ماهی متوسط بود) کاهش و از آوریل تا جولای (که درجه حرارت، مصرف غذا و رشد ماهی بالا بود) افزایش یافت. مطابق با نتایج آنها، بالا رفتن غلظت این هورمون از زمستان تا تابستان به دلیل افزایش فعالیت آنزیم T_4-ORD و کاهش فعالیت آنزیم های T_3-IRD وT_4-IRD می باشد.

در مطالعه حاضر، غلظت هورمون ACTH در آخرین مرحله نمونه گیری (۷- مرداد) در دو گروه آزمایشی T_1 و T_{10} به طور معنی داری افزایش یافت. در این زمان، غلظت هورمون T_3خون نیز به طور معنی داری نسبت به شاهد بیشتر بود. همچنین مطالعه حاضر نشان داد که ارتباط متقابلی بین هورمون T_3 با

کورتیزول وجود دارد بطوریکه که ایمپلنت هورمون T_3 باعث افزایش غلظت کورتیزول سرم خون گردید. ارتباط متقابل بین دو محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- تیروئید و هیپوتالاموس- هیپوفیز- اینتررنال در برخی از ماهیان استخوانی نیز گزارش شده است (Larsen *et al*., 1998; De Groef et al., 2006; Bernier et al., 2009; Peter and Peter, 2011). مطالعه بر روی تیلاپیلای آب شیرین (*Oreochromis mossambicus*) نشان داد که هایپرتیروئیدی یا سطح بالای T_3 باعث تحریک بافت اینتررنال و تولید بیشتر کورتیزول می شود (Peter, 2011). مطالعات صورت گرفته روی پستانداران نشان داده است که هورمون های تیروئیدی سرعت غیر فعال شدن گلوکوکورتیکوئیدهای فوق کلیوی به وسیله کبد را افزایش می دهند. این امر منجر به افزایش فیدبکی تولید هورمون ACTH در هیپوفیز قدامی می شود و در نتیجه میزان ترشح گلوکوکورتیکوئیدها از غده فوق کلیوی پستانداران زیاد می شود (Guyton and Hall, 2006). بنابراین با توجه به بررسی های صورت گرفته، یکی از دلایل افزایش کورتیزول در مطالعه حاضر می تواند به دلیل ترکیب شدن این هورمون با اسید گلوکورونیک در کبد باشد که به غیر فعال شدن این هورمون و دفع آن منتهی می گردد. در نتیجه در اثر فیدبک منفی کورتیزول بیشتری از بافت اینتررنال به داخل خون ترشح می شود.

کاشت ۱۰ میلی گرم هورمون T_3 به ازای هر کیلوگرم وزن بدن باعث بالا رفتن سطوح گلوکز سرم خون (هایپرگلیسمیا) شد بطوریکه افزایش معنی داری در مقادیر گلوکز سرم در اکثر موارد با گروه های آزمایشی شاهد و T_1 ملاحظه گردید. در واقع هورمون های تیروئیدی به عنوان هورمون های متابولیک تمام جنبه های متابولیسم کربوهیدرات را از جمله تقویت گلیکولیز و گلوکونئوژنز، تحریک می کنند (Luo and Mckeown, 1991; Soengas et al., 1992). این اثرات احتمالا ناشی از افزایش کلی آنزیم های متابولیک سلولی بر اثر هورمون های تیروئید است.

بروز پدیده هایپرگلیسمیا در گروه آزمایشی T_{10} نشان دهنده فعالیت های کاتابولیک این دوز از هورمون است.

در مطالعه حاضر تنها سه هفته پس از اولین ایمپلنت اختلاف معنی داری در غلظت کلسترول سرم خون بین گروه های آزمایشی مشاهده شد بطوریکه در ماهیان تیمار T_{10}به طور معنی داری بالاتر از T_1بود. با توجه به اینکه در سایر زمان های نمونه گیری اختلاف معنی داری در غلظت کلسترول بین تیمار ها مشاهده نشد بنابراین به نظر می رسد که افزایش معنی دار کلسترول در تیمار T_{10} به دلیل استرس ناشی از اولین کاشت هورمون و خونگیری های مکرر برای تعیین بهترین زمان نمونه گیری بوده باشد این نتایج با مطالعه Montero و همکاران بر روی سیم دریایی (*Sparus aurata*) مطابقت دارد.

در این مطالعه، غلظت کلسیم خون در گروه آزمایشی T_{10} در اکثر زمان های نمونه گیری بهطور معنی داری بالاتر از دو تیمار دیگر بود. افزایش معنی دار غلظت کلسیم در تیمار T_1 نشان می دهد که دوز بالای هورمون T_3متابولیسم کلسیم را در فیل ماهی تغییر می دهد. Lee Moon و همکاران (۱۹۹۴) با مطالعه بر روی ماهی کروکر قرمز (*Sciaenops ocellatus*) بیان نمودند که دوز های بالای هورمون T_3 (۱۰ و ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) باعث افزایش خاکستر بدن می شود. با توجه به اینکه کلسیم یکی از مهم ترین عناصر معدنی بدن می باشد این محققین معتقدند غلظت غیر طبیعی هورمون های تیروئیدی در خون می تواند متابولیسم این عنصر مهم معدنی تحت تاثیر قرار دهند. همچنین مطالعات بر روی مهره داران رده بالاتر نشان داده است که هورمون های تیروئیدی با اثر بر روی ۱ و ۲۵ دی هیدروکسی کوله کلسیفرول، قادر است متابولیسم کلسیم را تنظیم کنند (Cross et al., 1986, 1990). بنابراین یکی از دلایل احتمالی افزایش کلسیم در تیمار T_{10}می تواند به دلیل اثر دوز بالای هورمون T_3 برروی ۱ و ۲۵ دی هیدروکسی کوله کلسیفرول و یا

سایر عوامل تنظیم کننده کلسیم مانند کلسی تونین باشد. این مطالعه نشان داد که ایمپلنت هورمون T_3 در دوز های استفاده شده اثرات آنابولیک داشته و باعث افزایش رشد ماهیان گردید که البته این تاثیرات در تیمار T_1 بارزتر بود. همچنین مشخص گردید که ایمپلنت این هورمون قادر است بر ترشح هورمون T_3 از غده تیروئید و کورتیزول از بافت اینترنال تاثیر بگذارد. البته مطالعات آتی در خصوص اندازه گیری سایر هورمون های مرتبط با رشد و فعالیت آنزیم های مختلف دیدیناز در بافت های مختلف میتواند مکانیزم دقیق عملکرد این هورمون مشخص کند و یافته های جدیدی را آشکار سازد.

تشکر و قدردانی

از مسئولان مزرعه پرورش ماهیان خاویاری مروارید قروق تالش و مساعدت فراوان آقای مهندس طلوعی (اداره کل شیلات گیلان) در اجرای این پروژه تشکر می گردد. همچنین از همکاری آقای مهندس رعنای اخوان در تمامی مراحل اجرایی پروژه قدردانی می-گردد. از همکاران آزمایشگاه دکتر آشتیانی و فدایی که در آنالیز نمونه های خون ما را یاری رساندند تشکر می گردد.

هزینه های مربوط به این طرح تحقیقاتی توسط صندوق پژوهشگران کشور تامین گردیده است. لذا از همکاری این سازمان نیز تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

Ansal, M. D. and Kaur, K. 1998. Relative efficacy of dietary administration of 3,5,3´-Triiodothyronine (T_3) to different stages of an Indian carp, *Cirrhina mrigala* (Hamilton): Growth and economics. Aquc. Res. 29: 835-841.

Arjona, F., Vargas-Chacoff, L., Martín del Río, M. P., Flik, G., Mancera, J. and Klaren, P. H. M. 2011. Effects of cortisol and thyroid hormone on peripheral outer ring deiodination and osmoregulatory parameters in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*). J. Endocrinol. 208: 323-330.

Bernier, N. J., Flik, G. and Klaren, P. H. M. 2009. Regulation and contribution of the corticotropic melanotrophic and thyrotrophic axes to the stress response in fishes, in: Bernier, N.J., Van der Kraak, G., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), Fish Neuroendocrinology, vol. 28, Academic Press, pp 235-311.

Blanton, M. L. and Specker, J. L. 2007. The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in fish and its role in fish development and reproduction. Crit. Rev. Toxicol. 37: 97-115.

Carragher, J. F., Sumpter, J. P., Pottinger, T. G. and Pickering, A. D. 1989. The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout, *Salmo trutta* L. and *Salmo gairdneri* Richardson. Gen. Com. Endocrinol. 76: 310-321.

Cross, H. S., Poelzleitner, D. and Peterlik, M. 1986. Intestinal phosphate and calcium absorption: joint regulation by thyroid hormones and 1, 25-dihydroxyvitamin D3. Acta Endocrinol. 113: 96-103.

Cross, H. S. and Peterlik, M. 1988. Calcium and inorganic phosphate transport in embryonic chicken intestine: Triiodothyronine enhance the genomic action of 1, 25-dihydroxyvitamin D3. J. Nutr. 113: 96-103.

De Groef, B., Geyten, S. V., Darras, V. M. and Kuhn, E.R. 2006. Role of corticotropinreleasing hormone as a thyrotropin-releasing factor in non-mammalian vertebrates. Gen. Comp. Endocrinol. 146: 62-68.

De, S., Ray, A. K. and Medda, A. K. 1989. Effecs of L-thyroxine and L-triiodothyronine on protein and nucleic acid contents of liver of 6N-2-propylthiouracil treated hypothyroid Singi fish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). Horm. Metab. Res. 21: 416-420.

Detlaf, T. A. and Davydova, S. I. 1974. Effect of triiodothyronineon ripening of oocytes in stellate sturgeon after the action of lowtemperatures and reservation of females. Ontogenez 5: 454-462.

Eales, J.G. and Brown, S.B. 1993. Measurement and regulation of thyroidal status in teleost fish. Rev. Fish Biol. Fish. 3: 299-347.

Eales, J. G., Delvin, R., Higgs, D. A., Mcleese, J. M., Oakes, J. D. and Plohman, J. 2004. Thyroid function in growth hormone transgenic coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Can. J. Zool. 82: 1225-1229.

Fagerlund, U. H. M., Higgs, D. A., McBride, J. R., Plotnikoff, M. D. and Dosanjh, B. S. 1980.

Lankford, S. E., Adams, B. M., Adams, T. E. And Cech J. J. 2006. Using specific antisera to neutralize ACTH in sturgeon: A method for manipulating the interregnal response during stress. Gen. Comp. Endocrinol. 147: 384-390.

Larsen, D.A., Swanson, P., Dickey, J.T., Rivier, J., Dickhoff, W.W. 1998. In vitro thyrotropin-releasing activity of corticotrophin-releasing hormone-family peptides in Coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. Gen. Comp. Endocrinol. 109: 276-285.

Lee Moon, H. Y., MacKenzie, D. S. and Gatlin, D. M. 1994. Effects of dietary thyroid hormones on the red drum (*Sciaenops ocellatus*). Fish Physiol. Biochem. 12: 369-380.

Leiner, K. A. and MacKenzie, D. S. 2001. The effects of photoperiod on growth rate and circulating thyroid hormone levels in the red drum, *Sciaenops ocellatus*: evidence for a free-running circadian rhythm of T secretion. Comp. Biochem. Physiol. 130A: 141-149.

Loter, T.C., MacKenzie, D.S., McLeese, J., Eales, J.G. 2007. Seasonal changes in channel catfish thyroid hormones reflect increased magnitude of daily thyroid hormone cycles. Aquaculture 262: 451-460.

Luo, D. and McKeown, B. A. 1991. The Effect of Thyroid hormone and Glucocorticoids on Carp Growth Hormone-Releasing Factor (GRF)-Induced Growth Hormone (GH) Release in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp. Biochem. Physiol. 99A: 621-626.

Martinez, I., Dreyer, B., Agersborg, A., Leroux, A. and Boeuf, G. 1995. Effects of T_3 and rearing temperature on growth and skeletal myosin heavy chain isoform transition during early development in the salmonid *Salvelinus alpinus* (L.). Comp. Biochem. Physiol. 112B: 717-725.

McEnroe, M. and Cech, J. J. 1994. Measurements of thyroid hormones,T3 and T4, in juvenile white sturgeon over the annualcycle. In "High Performance Fish: Proceedings of an InternationalFish Physiology Symposium". D. D. Machinlay (Ed.). University of British Columbia. Vancouver.pp: 182-185.

Moav, B. and McKeown, B. A. 1992. Thyroid hormones increase transcription of growth hormone mRNA in rainbow trout pituitary. Horm. Metab. Res. 24: 10-14.

Montero, D., Izquierdo, M.S., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J.M. 1999. High The potential for using the anabolic hormones 17-α-methyltestosterone or 3,5,3′-triiodo-L-thyronine in fresh water rearing of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and the effects on subsequent seawater performance. Can. J. Zool. 58: 1424-1432.

Falahatkar, B., Soltani, M., Abtahi, B., Kalbassi, M.R. and Pourkazemi, M. 2006. Effects of dietary vitamin C supplementation on performance, tissue chemical composition and alkaline phosphatise activity in great sturgeon (*Huso huso*). J. Appl. Ichthyol. 22: 283-286.

Falahatkar, B., Tolouei Gilani, M. H., Falahatkar, S. and Abbasalizadeh, A. 2011. Laparoscopy, a minimally-invasive technique for sex identification in cultured great sturgeon *Huso huso*. Aquaculture 321: 273-279.

Farbridge, K. J. and Leatherland, J. F. 1988. Interaction between ovine growth hormone and triiodo- L-thyronine on metabolic reserves of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Fish. Physiol. Biochem. 5: 141-151.

Fines, G.A., Plohman, J. and Eales, J.G. 1999. Effect of experimental3,5,3′-triiodothyronine hyperthyroidism on thyroid hormonedeiodination in brain regions and liver of rainbow trout,*Oncorhynchus mykiss*. Can. J. Zool. 77: 1185-1191.

Finnson, K.W. and Eales, J.G. 1999. Effect of T_3 treatment and food ration on hepatic deiodination and conjugation of thyroid hormones in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Gen. Comp. Endocrinology. 115: 379-386.

Guton, C. and Hall, J. E. 2006. Text book of medical physiology. Elsevier Saunders Press, pp: 931-943.

Higgs, D. A., Fagerlund, U. H. M., Eales, J. G. and McBride, J. R. 1982. Application of thyroid and steroid hormones as anabolic agents in fish culture. Comp. Biochem. Physiol. 73B: 143-176.

Hilton, J.W., Plisetskaya, E.M. and Leatherland, J.F. 1987. Dose oral of 3,5,3′-triiodo-L-thyronine affect dietary glucose utilization and plasma insulin levels in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)? Fish Physiol. Biochem. 4: 113-120.

Hurvitz, A., Jackson, K., Degani, G. and Levavi-Sivan, B. 2007. Use of endoscopy for gender and ovarian stage determinations in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in aquaculture. Aquaculture 270: 158-166.

Sauders, R. L., McCormick, S. D., Henderson, E. B., Eales, J. G. and Johnston, C. E. 1985. The Effect of Orally Administered 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on Growth and Salinity Tolerance of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). Aquaculture 45: 143-156.

Schmid, A.C., Lutz, I., Kloas, W. and Reinecke, M. 2003. Thyroid hormone stimulates hepatic IGF-I mRNA expression in a bony fish, the tilapia *Oreochromis mossambicus*, in vitro and in vivo. Gen. Comp. Endocrinol. 130: 129-134.

Shinobu, N. and Mugiya, Y. 1994. Effects of hypophysectomy and replacement therapy with bovine growth hormone and triiodothyronine on the in vitro uptake of calcium and methionine by scales in the goldfish. Zool. Sci. 11: 555-561.

Soengas, J. L., Rey, P., Rozas, G., Andrés, M. D. and Aldegunde, M. 1992. Effect of cortisol and thyroid hormone treatment on the glycogen metabolism of selected tissues of domesticated rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 101: 317-328.

Takagi, Y., Hirano, T., Tanbe, H. and Yamada, J. 1994. Stimulation of skeletal growth by thyroid hormones administrations in the raionbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J. Exp. Zool. 268: 229-238.

Trudeau, V. L., Peter, R. E. and Sloley, B. D. 1991. Testosterone and estradiol potentiate the serum gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in goldfish. Biol. Reprod. 44: 951-960.

Wangmi, K.Y., Zheng, Z., I Jinag, R., Xie, N., Feng, J. 2009. Replacing fish meal with rendered animal protein ingredients in diets for Malabar grouper, Epinephelus malabaricus, reared in net pens. J. World. Aquacult. Soc. 40: 67-75.

Woo, N. Y. S., Chung, A. S. B. and Ng, T. B. 1991. Influence of oral administration of 3,5,3′-triiodo-L-thyronine on growth, digestion, food conversion and metabolism in the under yearling red sea bream, *Chrysophrys major* (Temminck & Schlegel). J. Fish Biol. 39: 459-468.

Zar, J. H. 1999. Biostatistical Analysis, 4th edn. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice-Hall.

Zou, J. J., Trudeau, V. L., Cui, Z., Brechin, J., Mackenzie, K., Zhu, Z., Houlihan, D. F. and Peter, R. E. 1997. Estradiol Stimulates Growth Hormone Production in Female Goldfish. Gen. Comp. Endocrinol. 106: 102-112.

stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. Fish Physiol. Biochem. 20: 53-60.

Morgado, I., Santos, C. R. A., Jacintoa, R. and Power, D. M. 2007. Regulation of transthyretin by thyroid hormones in fish. Gen. Comp. Endocrinol. 152: 189-197.

Mylonas, C. C., Sullivan, C. V. and Hinshaw, J. M. 1994. Thyroid hormones in brown trout (*Salmo trutta*) reproduction and early development. Fish. Physiol. Biochem. 13: 485-493.

Peter, M. C. S. 2011. The role of thyroid hormones in stress response of fish. Gen. Comp. Endocrinol. 172: 198-210.

Peter, S. V. and Peter, M. C. S. 2011. The interruption of thyroid and interrenal and the inter-hormonal interference in fish: Does it promote physiologic adaptation or maladaptation? Gen. Comp. Endocrinol. 174: 249-258.

Pickering, A. D. and Duston, J. 1983. Administration of cortisol to brown trout, *Salmo trutta* L., and its effects on the susceptibility to Saprolegnia infection and furunculosis. J. Fish Biol. 23: 163-175.

Plisetskaya, E., Woo, N. Y. S. and Murat, J-C. 1983. Thyroid hormone in cyclostomes and fish and their role in regulation of intermediary metabolism. Comp. Biochem. Physiol. 74A: 179-187.

Plohman, J., Dick, T. A. and Eales, J. G. 2001. Thyroid of lake sturgeon, Acipenser fulvescens. I. Hormone levels in blood and tissues. Gen. Comp. Endocrinol. 125: 47-55.

Plohman, J., Dick, T. A. and Eales, J. G. 2002. Thyroid of lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*. II. Deiodination Properties, Distribution, and Effects of Diet, Growth, and a T_3 Challenge. Gen. Comp. Endocrinol. 125: 56-66.

Quinn, G., Keough, M. 2002. Experimental Design and Data Analysis for Biologists. Cambridge University Press. Cambridge. pp: 305-309.

Raine, J. C. 2011. Thyroid Hormones and Reproduction in Fishes. Horm. Reproduct. Vertebrate. 1: 83-102.

Rousseau, K., Le Belle, N., Sbaihi, M., Marchelidon, J., Schmitz, M., Dufour, S. 2002. Evidence for a negative feedback in the control of eel growth hormone by thyroid hormones. J. Endocrinol. 175: 605-613.