شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۶، شماره ۱، بهار ۱۴۰۲
صفحات ۸۸-۷۱

تأثیر سطوح مختلف ویتامین E بر برخی شاخص‌های رشد و فراسنجه‌های خونی بچه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*)

مرتضی ساحلی[۱]، هومن رجبی اسلامی[۲*]، محمود محسنی[۳]، مهدی سلطانی[۴]

۱. فارغ التحصیل دکتری، گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. دانشیار گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳. دانشیار انستیتو تحقیقات ماهیان خاویاری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران
۴. استاد گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ ارسال: ۱۴۰۱/۰۷/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۰۲

چکیده

این مطالعه به‌بررسی اثرات سطوح مختلف ویتامین E بر عملکرد رشد و شاخص‌های خونی بچه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*) پرداخت. شش جیرهٔ غذایی با سطوح مختلف ویتامین E شامل صفر، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم آماده شد که مقدار واقعی ویتامین E آن‌ها با استفاده از دستگاه کرماتوگرافی مایع با کارآیی بالا به‌ترتیب برابر ۴/۹، ۸/۶، ۱۷/۴، ۳۵/۴، ۷۸/۸ و ۱۳۷/۰ میلی‌گرم در کیلوگرم تعیین شد. تعداد ۳۶۰ عدد بچه ماهی (میانگین وزن اولیه ۰/۳۴±۹/۳۲ گرم) به‌صورت تصادفی در ۱۸ مخزن استوانه‌ای (۲۰ عدد ماهی در هر مخزن) با حجم آب‌گیری ۹۰۰ لیتر توزیع گردید. ماهیان در هر مخزن ۳ بار در روز (۸:۳۰، ۱۲:۳۰ و ۱۸:۳۰) و به مدت ۸ هفته با جیرهٔ غذایی مربوطه تغذیه و در انتها شاخص‌های رشد و فراسنجه‌های خونی آن‌ها بررسی شدند. یافته‌ها نشان داد وزن نهایی، نرخ رشد روزانه و کارایی غذایی ماهیان با افزایش سطح ویتامین E در جیرهٔ غذایی به صورت خطی ($P<۰/۰۵$) و تربیعی ($P<۰/۰۵$) افزایش یافت و به بالاترین مقدار در ماهیان تغذیه شده با ۷۸/۸ میلی‌گرم ویتامین E در کیلوگرم جیرهٔ غذایی رسید. تغییرات فراسنجه‌های خونی نیز بیانگر افزایش معنی‌دار خطی ($P<۰/۰۵$) و تربیعی ($P<۰/۰۵$) گلبول‌های قرمز و سفید، میزان هموگلوبین و درصد میزان هماتوکریت همراه با افزایش میزان ویتامین E در جیره بود. درصد نوتروفیل ماهیان به پایین‌ترین مقدار پس از تغذیه با بالاترین میزان ویتامین E (۱۳۷/۰ میلی‌گرم ویتامین E در هر کیلوگرم جیره) رسید در حالی که بالاترین درصد لنفوسیت در ماهیانی ثبت شد که با ۷۸/۸ میلی‌گرم ویتامین E در هر کیلوگرم از جیرهٔ غذایی تغذیه شده بودند. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد ویتامین E قادر است رشد و فراسنجه‌های خونی ماهی آزاد دریای خزر را بهبود بخشد. بهترین سطح ویتامین E بر این اساس برابر ۸۲/۱۶ میلی‌گرم در کیلوگرم بر اساس نرخ رشد روزانه و ۱۰۲/۹۸ میلی‌گرم در کیلوگرم بر اساس سنتز گلبول‌های سفید خونی تعیین گردید.

واژگان کلیدی: آلفاتوکوفرول، ماهی آزاد دریای خزر، نرخ رشد روزانه، فراسنجه‌های خونی، سطح بهینه

* نویسنده مسئول: هومن رجبی اسلامی
Email: rajabi.h@srbiau.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 76, No. 1, Spring 2023
pp. 71-88

Effect of different levels of vitamin E on performance and some blood parameters of Caspian trout (*Salmo caspius*)

Morteza Saheli[1], Houman Rajabi Islami[2*], Mahmoud Mohseni[3], Mehdi Soltani[4]

1. Ph.D Graduate, Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Associate Professor, International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran
4. Professor, Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 2-Oct-2022 **Accepted: 21-Feb-2023**

Abstract

This study investigated the effects of different levels of vitamin E on growth performance and blood indices of Caspian trout (*Salmo caspius*) juveniles. Six diets with different levels of vitamin E including 0, 10, 20, 40, 80 and 160 mg kg^{-1} were prepared. The actual amounts of vitamin E in diets were determined using high performance liquid chromatography and were as follow: 4.9, 8.6, 17.4, 35.4, 78.8 and 137.0 mg kg^{-1}. In total, 360 fish (initial mean weight of 9.32±0.34 g) were randomly distributed in 18 cylindrical tanks (20 fish per tank) with the working volume of 900 L. Each tank was randomly assigned to each of the experimental diets with 3 replications. The fish in each tank were fed with the respective diets for eight weeks and finally their growth indices and blood parameters were evaluated. The results showed that the final weight, daily growth coefficient and feed efficiency ratio of fish increased linearly ($p<0.05$) and quadratic ($p<0.05$) with increasing the vitamin E levels and reached the highest value in fish fed with 78.8 mg kg^{-1} vitamin E. Significant linear ($p<0.05$) and quadratic ($p<0.05$) increases in red blood cells (RBCs) and white blood cells (WBCs), hemoglobin content and hematocrit percentage were also determined by increasing in dietary vitamin E concentration. The percentage of neutrophils in fish blood reached the lowest level after feeding with the highest amount of vitamin E (137.0 mg kg^{-1} vitamin E) while the highest percentage of lymphocytes was recorded in fish fed with 78.8 mg kg^{-1} vitamin E. The findings of the present study showed that vitamin E could improve the performance and blood parameters of Caspian trout. The best level of vitamin E was estimated to be 82.16 mg kg^{-1} based on the daily growth coefficient and 102.98 mg kg^{-1} according to WBC number.

Keywords: α-tocopherol, Blood indices, Caspian trout, Daily growth coefficient, Optimum level

∗ Corresponding author: Houman Rajabi Islami Email: rajabi.h@srbiau.ac.ir

۱. مقدمه

ویتامین E اصطلاحی کلی برای گروهی از مولکول‌های محلول در چربی است که آلفا توکوفرول فعال‌ترین شکل آن می باشد (NRC, 1993). این ویتامین به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی فعالیت داشته و درشت‌مولکول‌هایی از قبیل اسید دئوکسی ریبونوکلئیک[1]، چربی، پروتئین و دیگر مولکول‌ها را از اکسیداسیون توسط رادیکال‌های آزاد تولید شده طی سوخت و ساز عادی یا تحت شرایط آلودگی، عفونت و استرس محافظت می کند (Chen *et al*., 2004). استفاده از ویتامین E در جیرهٔ غذایی ماهیان می تواند سبب بهبود عملکرد رشد (Amlashi *et al*., 2011; Bae *et al*., 2013; Lu *et al*., 2016)، افزایش بازماندگی (Shahkar *et al*., 2018)، تقویت سیستم ایمنی (Kiron *et al*., 2004; Pan *et al*., 2017)، حفظ کیفیت گوشت (Ruff *et al*., 2003)، بهبود تولید مثل (Watanabe *et al*., 1977) و کاهش تولید ترکیبات ناخواسته‌ای نظیر مالوندی‌آلدئید[2] به‌عنوان فرآوردهٔ ثانویه اکسیداسیون چربی (Peng and Gatlin Iii, 2009; Zhao *et al*., 2018) گردد.

جیره های دارای کمبود یا فقدان ویتامین E می توانند به کاهش رشد (Li *et al*., 2018)، تحلیل عضلانی، تیرگی پوست و خونریزی (Chen *et al*., 2004)، آسیب کبدی (Duan *et al*., 2018)، افزایش شکنندگی گلبول‌های قرمز (Paul *et al*., 2004)، افزایش جراحت پوستی (Pan *et al*., 2017)، کاهش بازماندگی (Lozano *et al*., 2017)، ایجاد کم‌خونی (Soldatov, 2021) و کاهش پاسخ‌های سیستم ایمنی (Lin and Shiau, 2005; Wang *et al*., 2016; Zhou *et al*., 2013) منجر شوند. بر این اساس مقدار ویتامین E مورد نیاز گونه های مختلفی از ماهیان نظیر قزل‌آلای رنگین‌کمان، *Oncorhynchus mykiss* (Pearce *et al*., 2003)، ماهی آزاد اقیانوس اطلس، *Salmo salar* (Kousoulaki *et al*., 2022)، تیلاپیای نیل، *Oreochromis niloticus* (Ahmed *et al*., 2021) و کپور معمولی، *Cyprinus carpio* (Wang *et al*., 2016) تعیین شده است.

ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*) از خانواده آزاد ماهیان و جنس *Salmo* (Kalayci *et al*., 2018) از گونه‌های با ارزش دریای خزر و بومی کشور ایران است که بقای نسل آن با توجه به آلودگی منابع آبی و از بین رفتن زیستگاه ها و مناطق تخم‌ریزی به خطر افتاده است (Sajedkhanian *et al*., 2021). ارزش بالای اقتصادی، رشد نسبتاً مناسب و قابلیت تکثیر مصنوعی موجب شده که این ماهی به‌عنوان یکی از گونه های مناسب برای آبزی‌پروری در ایران مورد توجه قرار گیرد. علی‌رغم اطلاعات قابل توجه در مورد تکثیر و پرورش مصنوعی این گونه، یافته‌های کمی در مورد نیازهای تغذیه‌ای ماهی آزاد دریای خزر وجود داشته که این یافته‌ها در زمینهٔ نیازهای ویتامینه صرفاً به تعیین مقدار اسید آسکوربیک این ماهی محدود شده است (Arab and Rajabi Islami, 2015). با توجه به نقش تغذیه در آبزی‌پروری و صرف قسمت عمدهٔ هزینه های پرورش آبزیان در این بخش باید بیان کرد که نگهداری موفق ماهیان نیازمند استفاده از خوراک کامل، کارآمد و با ترکیب بهینه است (Farinha *et al*., 2022) که تمام نیازهای تغذیه‌ای مانند پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی را برای ماهی فراهم کند تا اجازهٔ رشد سریع و سالم به آن‌ها داده شود (Mohseni *et al*., 2013). پژوهش حاضر به‌منظور تأثیر ویتامین E به‌عنوان یکی از افزودنی های مهم به جیرهٔ غذایی بر رشد و برخی فراسنجه‌های خونی گونه ماهی آزاد دریای خزر (*S. caspius*) به‌اجرا درآمد. همچنین میزان نیاز به ویتامین E نیز بر مبنای رشد تعیین گردید.

[1] Deoxyribonucleic acid
[2] Malondialdehyde

۲. مواد و روش‌ها

اجزای غذایی جیرهٔ پایه مورد استفاده در این پژوهش و آنالیز تقریبی آن در جدول ۱ ارائه شده است. کازئین (Fluka, St. Louis, MO, USA.) و پودر ماهی (شرکت خزر کیلکا، انزلی، ایران) به‌عنوان منابع پروتئینی مورد استفاده قرار گرفت. روغن ماهی (شرکت خزر کیلکا، انزلی، ایران) و روغن ذرت (شرکت لادن، تهران، ایران) به عنوان منابع چربی مورد استفاده قرار گرفت. دکسترین (Sigma Chemical Co., Steinheim, Germany) و نشاستهٔ ذرت (شرکت اطمینان هدف توس، مشهد، ایران) نیز به‌عنوان منابع کربوهیدرات تهیه شد. پودر ماهی در ابتدا دو مرتبه با اتانول با دمای ۷۰ درجهٔ سانتی گراد (اتانول/پودر ماهی=۱:۲، w/v) جهت حذف ویتامین E شستشو شده و سپس با سایر اجزای جیره ترکیب گردید (Galaz *et al*., 2010). جیرهٔ پایه بدون افزودن آلفاتوکوفرول تهیه گردید و به‌عنوان جیره شاهد در نظر گرفته شد (Kiron *et al*., 2004). سایر جیره‌ها با افزودن ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی گرم ویتامین E در شکل دی ال-آلفاتوکوفرول استات[1] (Sigma Chemical Co., Steinheim, Germany) به‌جای سلولز در جیرهٔ غذایی پایه تهیه گردیدند (J. Li *et al*., 2014). مقدار واقعی ویتامین E در هر یک از جیره‌ها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC; -1100 Series, Cecil Instruments, Cambridge, UK) به‌ترتیب برابر ۴/۹، ۸/۶، ۱۷/۴، ۳۵/۴، ۷۸/۸ و ۱۳۷/۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره اندازه‌گیری گردید.

جدول ۱- اجزا و ترکیبات شیمیایی تقریبی جیرهٔ غذایی پایه مورد استفاده برای تغذیهٔ بچه ماهی‌های آزاد دریای خزر (*S. caspius*)

مادهٔ غذایی	مقدار (گرم در کیلوگرم)
کازئین	۳۰۰/۰۰
پودر ماهی	۲۰۰/۰۰
دکسترین	۱۵۰/۰۰
نشاسته	۱۰۰/۰۰
روغن ماهی	۵۰/۰۰
روغن ذرت	۵۰/۰۰
مکمل معدنی[1]	۵۰/۰۰
مکمل ویتامینی (فاقد ویتامین E)[2]	۲۰/۰۰
آلفاسلولز	۸۰/۰۰
پروتئین خام	۴۶۲/۰۳
چربی خام	۱۱۴/۲۱
رطوبت	۱۰۹/۴۸
خاکستر	۹۵/۰۵

[1] مکمل معدنی (میلی گرم در کیلوگرم مخلوط): NaF، ۲ میلی گرم؛ KI، ۰/۸ میلی گرم؛ $CoCl2{\cdot}6H2O$ (1%)، ۵۰ میلی گرم؛ $CuSO_4{\cdot}5H_2O$، ۱۰ میلی گرم؛ $FeSO_4{\cdot}H_2O$، ۸۰ میلی گرم؛ $ZnSO_4{\cdot}H_2O$، ۵۰ میلی گرم؛ $MnSO_4{\cdot}H_2O$، ۶۰ میلی گرم؛ $MgSO_4{\cdot}7H_2O$، ۱۲۰۰ میلی گرم؛ $Ca(H_2PO_3)_2{\cdot}H_2O$، ۳۰۰۰ میلی‌گرم؛ NaCl، ۱۰۰ میلی‌گرم. تمام ترکیبات با آلفاسلولز به اندازه‌ای مخلوط شدند که حجم آن‌ها به یک کیلوگرم برسد.

[2] مکمل ویتامینی (میلی گرم با گرم در کیلوگرم مخلوط): تیامین، ۲۵ میلی گرم؛ ریبوفلاوین، ۴۵ میلی گرم؛ پیریدوکسین اسید کلریدریک، ۲۰ میلی‌گرم؛ ویتامین B12، ۰/۱ میلی‌گرم، ویتامین K3، ۱۰ میلی‌گرم؛ اینو سیتول، ۸۰۰ میلی‌گرم، اسید پنتوتئیک، ۶۰ میلی‌گرم؛ اسید نیاسین، ۲۰۰ میلی گرم، اسیدفولیک، ۲۰۰ میلی گرم؛ بیوتین، ۱/۲۰ میلی گرم، استات رتینول، ۳۲ میلی گرم؛کله کلسیفرول، ۵ میلی گرم؛ کولین کلراید، ۲۵۰۰ میلی‌گرم؛ اتوکسی‌کوین، ۱۵۰ میلی‌گرم؛ ویتامین C در مقدار ۱۷۷/۲۴؛ زیره گندم، ۱۴/۰۱۲ گرم. تمام ترکیبات با آلفاسلولز به اندازه‌ای مخلوط شدند که حجم آن‌ها به یک کیلوگرم برسد.

[1] DL-α-Tocopherol acetate

جداسازی DL-آلفاتوکوفرول از نمونه های غذا با استفاده از روش Buttriss و Diplock (۱۹۸۴) با اندکی اصلاحات انجام گرفت. نمونه‌ها به‌طور خلاصه با آب مقطر تو سط یک هموژنایزر تفلون برای ر سیدن به یک مخلوط همگن ۲۵ در صد هموژنیزه شدند. یک میلی‌لیتر از نمونهٔ همگن و ۲ میلی‌لیتر اتانول پیروگالول به یک لوله آزمایش سربسته اضافه گردید. نمونه ها با ۰/۳ میلی لیتر هیدروک سید پتا سیم ۵۰ در صد ترکیب و در حمام آب با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت نیم ساعت صابونی شدند. میزان ۴ میلی‌لیتر هگزان حاوی ۰/۰۰۵ درصد وزنی به حجمی بوتیل هیدروکسی تولوئن هم‌زمان با خنک شدن به نمونه‌ها اضافه و محتویات لوله آزمایش برای ۱ دقیقه تکان داده شد. لا یه هگزان در ادا مه جمع‌آوری و روند استخراج دو بار به کمک ۲ میلی لیتر هگزان تکرار شد. ع صاره‌ها در ادامه با هم مخلوط شده و سپس میزان ویتامین E (آلفا-توکوفرول) با استفاده از د ستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) مجهز به ستون Zorbax Sil و یک آ شکارساز اسپکتروفتلورومتر مورد سنجش قرار گرفت. فاز متحرک شامل پروپانول ۰/۴ درصد در ان-هگزان با سرعت جریان ۲/۵ میلی‌لیتر در دقیقه بود. سیال خروجی از داخل دستگاه فلوریمتر در طول موج تحریک ۲۹۸ نانومتر و انتشار ۳۲۵ نانومتر عبور داده شد. دمای ستون ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. در نتیجه مناطق اوج نمونه ها بر اساس اوج استاندارد خروجی DL-آلفاتوکوفرول محاسبه شد.

ترکیبات غذایی خشک ابتدا از الک درشت و سپس از الک ریزچشمه با اندازهٔ چشمه کمتر از ۵۰۰ میکرومتر گذرانده شد تا مواد همگنی جهت تهیهٔ جیره وجود داشته با شد (Kakavand *et al*., 2021). اجزای خشک جیره در ادامه به‌خوبی با یکدیگر مخلوط شدند تا ترکیب یکنواختی فراهم آید. سپس روغن ماهی و ذرت به مخلوط اضافه و جیرهٔ غذایی با افزودن اندکی آب به‌شکل یک خمیر یکنواخت در آمد. در مرحلهٔ بعد غذای خمیری شکل از یک چرخ گوشت عبور داده شده و یک غذای رشته‌ای[1] تهیه گردید. این رشته‌ها در دمای اتاق به‌مدت ۲۴ ساعت خشک و در پلاستیک‌های پلی‌اتیلنی مشکی بسته‌بندی شدند. تمام جیره‌های غذایی تا زمان مصرف در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بچه ماهی آزاد دریای خزر در اندازهٔ انگشت قد (n=۳۶۰) از مرکز تحقیقات ماهیان سردابی، تنکابن تهیه شدند. ماهیان مورد آزمایش هیچ گونه علائم ظاهری از نظر بیماری در زمان انتقال به محیط آزمایشی نداشتند. تمام ماهیان قبل از شروع آزمایش به‌مدت ۳ هفته با شرایط آزمایشی سازگار شدند و با جیرهٔ پایه جهت تخلیهٔ ذ خایر احتمالی ویتامین E در بدن مورد تغذیه قرار گرفتند (Zhou *et al*., 2013). در مجموع، ۳۶۰ عدد ماهی با اندازهٔ یکسان (میانگین وزن اولیه ۰/۳۴±۹/۳۲ گرم) به صورت تصادفی در ۱۸ مخزن فایبرگلاسی استوانه‌ای (تعداد ۲۰ عدد ماهی در هر مخزن) با حجم آب‌گیری حدود ۹۰۰ لیتر توزیع گردید. هر مخزن به‌طور تصادفی با ۳ تکرار به هر یک از شش جیرهٔ آزمایشی اختصاص داده شد. دمای آب در مدت آزمایش غذادهی و دورهٔ سازگاری برابر ۰/۹±۱۳/۹ درجهٔ سانتی‌گراد و دورهٔ نوری مصنوعی مطابق با ۱۴ ساعت روشنایی/۱۰ ساعت تاریکی در مدت آزمایش غذادهی و دورهٔ سازگاری بودند. میزان pH آب (۰/۲۸±۷/۲۰)، قلیائیت (۶/۷±۲۴۱/۵ میلی گرم در لیتر) و نیتروژن آمونیاکی کل (کمتر از ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر) دو بار در هفته با استفاده از مولتی‌متر قابل حمل (TPS 90Fl-T, TPS, Brisbane, Australia) اندازه‌گیری شدند. غذادهی ماهیان به‌صورت دستی تا سیر شدن ظاهری، ۳ بار در روز (۸:۳۰، ۱۲:۳۰ و ۱۸:۳۰) به‌مدت ۸ هفته انجام شد. مقدار غذای مصرف شده برای هر مخزن ثبت گردید و اطمینان حاصل شد که هیچ پلت غذایی خورده نشده‌ای در مخازن پس از غذادهی باقی نماند.

غذادهی ماهیان در پایان آزمایش به‌مدت ۲۴ ساعت جهت کاهش استرس ناشی از زیست‌سنجی قطع و ماهیان با استفاده از محلول پودر گل میخک (*Syzygium aromaticum*) به‌مقدار ۲۰۰ قسمت در

[1] Strand

میلیون بی‌هوش شدند. وزن کل تمام ماهیان در هر مخزن به‌صورت انفرادی توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم اندازه‌گیری شد تا شاخص‌های رشد و عملکرد تغذیه‌ای شامل میزان بازماندگی (SR)، وزن نهایی(FW)، نرخ رشد روزانه (DGC) و کارایی تغذیه‌ای (FER) با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه شوند (Besharat *et al*., 2021).

$$DGC=100\times\left(\sqrt[3]{BW_f}-\sqrt[3]{BW_i}\right)/T \quad \text{رابطهٔ (۱)}$$

$$FER=WG/FI0 \quad \text{رابطهٔ (۲)}$$

$$SR=100\times No._f/No._i \quad \text{رابطهٔ (۳)}$$

که BW_f: وزن نهایی (گرم)، BW_i: وزن اولیه (گرم)، T: زمان (روز)، WG: وزن کسب شده (گرم)، FI: غذای مصرفی (گرم)، $No._f$: تعداد نهایی ماهیان، $No._i$: تعداد اولیه ماهیان بودند.

پنج عدد ماهی پس از زیست‌سنجی به‌صورت تصادفی از هر مخزن جهت نمونه‌برداری خونی خارج شد. خون‌گیری از طریق ساقه دمی و با استفاده از یک سرنگ پلاستیکی ۵ میلی‌لیتری پس از خشک کردن بدن ماهی با یک حولهٔ تمیز انجام شد. نمونه‌های خون به‌دست آمده از ماهیان هر مخزن به‌خوبی با یکدیگر مخلوط و به‌طور مستقیم (۱ میلی‌لیتر) به لوله‌های اپندرف حاوی هپارین جهت آزمایشات خون‌شناسی شامل اندازه‌گیری تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، تعداد گلبول‌های سفید (WBC)، درصد هماتوکریت و میزان هموگلوبین منتقل شد (Farahnak Roudsari *et al*., 2021).

نمونهٔ خون جهت شمارش گلبول‌های قرمز با استفاده از محلول ریس درون پیپت ملانژور قرمز رقیق‌شده و گلبول‌های قرمز با لام هموسیتومتر شمارش گردید. در ابتدا لولهٔ حاوی خون را جهت شمارش کاملاً تکان داده تا خون یکنواخت شود و سپس با استفاده از پیپت ملانژور مخصوص شمارش گلبول‌های قرمز تا درجهٔ ۰/۵ از خون پر شد. خون اطراف پیپت به‌وسیلهٔ پارچهٔ تمیز کاملاً پاک شده و لوله به‌کمک محلول رقیق‌کننده ریس تا درجهٔ ۱۰۱ پر شد تا رقت مورد نظر به‌دست آید. پیپت در ادامه بین انگشت نشانه از یک طرف و انگشت شست از طرف دیگر قرار گرفته و در حدود ۳۰ ثانیه به آرامی در جهات مختلف حرکت داده شد تا محلول رقیق‌کننده با خون کاملاً مخلوط گردد. چند قطرهٔ اول محلول دور ریخته شد و سپس یک قطره خون روی لام نئوبار در حالی قرار گرفت که لامل مخصوص روی آن بود. گلبول‌های قرمز پس از ثابت شدن سلول‌ها با بزرگنمایی ۴۰ در پنج خانهٔ ۱۶ تایی لام نئوبار شمارش و در عدد ۱۰۰۰۰ ضرب شد تا تعداد گلبول‌های قرمز در یک میلی‌متر مکعب خون به‌دست آید (Simmons, 1997).

شمارش گلبول‌های سفید خونی نیز با کمک نمونهٔ خونی و توصیف صورت گرفته برای شمارش گلبول‌های قرمز خونی انجام پذیرفت با این تفاوت که از محلول ریس برای رقیق سازی خون استفاده شد. خون برای این کار تا درجهٔ ۰/۵ در پیپت ملانژور مخصوص شمارش گلبول‌های سفید پر شد سپس محلول رقیق‌کنندهٔ ریس تا درجهٔ ۱۱ به پیپت اضافه گردید تا رقت مورد نیاز به‌دست آید. پیپت در ادامه بین انگشت نشانه از یک طرف و انگشت شست از طرف دیگر قرار گرفت و در حدود ۳۰ ثانیه به آرامی در جهات مختلف حرکت داده شد تا محلول رقیق‌کننده با خون کاملاً مخلوط گردد. چند قطرهٔ اول محلول دور ریخته شد و سپس یک قطرهٔ خون روی لام نئوبار در حالی قرار گرفت که لامل مخصوص روی آن بود. گلبول‌های سفید پس از ثابت شدن سلول‌ها با بزرگنمایی ۱۰ در چهار خانهٔ بزرگ ۱۶ تایی لام نئوبار شمارش و در عدد ۵۰ ضرب شد تا تعداد گلبول‌های قرمز در یک میلی‌متر مکعب خون به‌دست آید (Simmons, 1997).

میزان هموگلوبین طبق روش سیان مت‌هموگلوبین اندازه‌گیری شد. برای انجام آزمایش از کیت اندازه‌گیری هموگلوبین ساخت کارخانه زیست‌شیمی استفاده گردید. غلظت‌های مختلف (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی گرم) هموگلوبین با استفاده از محلول استاندارد تهیه و منحنی استاندارد با استفاده از کیت مذکور و دستگاه اسپکتروفتومتر رسم گردید. غلظت هموگلوبین نمونه‌های

آزمایشی در ادامه با کمک کیت فوق سنجیده و نتایج حاصل با استفاده از منحنی استاندارد موارد ارزیابی قرار گرفت. میزان ۰/۲ میلی‌لیتر از نمونهٔ خون ماهیان برای این منظور توسط پیپت مخصوص هموگلوبین با ۵ میلی‌لیتر محلول درابکین مخلوط گردید. مخلوط سپس به‌خوبی تکان داده شد و در ادامه برای ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. میزان جذب نوری سپس توسط اسپکتروفتومتر (DR 2800, Hach Chemical Co., Loveland, USA) در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانش و مقدار هموگلوبین با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد (Thrall *et al.*, 2012).

درصد هماتوکریت به کمک لوله میکروهماتوکریت تعیین گردید. لوله ها برای این منظور تا حدود دو سوم از نمونهٔ خون پر شده و پس از مسدود شدن سر آن‌ها با خمیر هماتوکریت در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۳۵۰۰ در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. میزان هماتوکریت سپس با خط‌کش مخصوص بر حسب درصد قرائت شد. لولهٔ هماتوکریت برای این منظور در شیار خط‌کش هماتوکریت قرار گرفت، انتهای پایینی ستون گلبول‌های قرمز درست از بالای خمیر هماتوکریت با خط صفر تنظیم شد و قسمت بالای لوله (پلاسمای خون) با خط مشکی مورب عدد ۱۰۰ میزان گردید. سپس خط سفید متحرک میانی با سطح بالای گلبول‌های قرمز تنظیم و درصد حجم گلبول‌های قرمز از روی ستون مدرج خوانده شد.

شاخص‌های گلبول قرمز برای توصیف اندازهٔ گلبول‌ها و میزان هموگلوبین شامل حجم متوسط گلبولی (MCV) برحسب فمتولیتر (fl)، غلظت متوسط هموگلوبین (MCH) که برحسب پیکوگرم (pg) بیان شده و غلظت متوسط هموگلوبین گلبولی (MCHC) بر حسب گرم در دسی‌لیتر با استفاده از رابطه‌های زیر به‌دست آمدند (Thrall *et al.*, 2012).

$$MCV = \frac{HCT(\%) \times 10}{RBC/million}$$ رابطهٔ (۴)

$$MCH = \frac{Hb(gr\%) \times 10}{RBC/million}$$ رابطهٔ (۵)

$$MCHC = \frac{Hb \times 100}{HCT}$$ رابطهٔ (۶)

که HCT: میزان هماتوکریت، RBC: تعداد گلبول‌های قرمز و Hb: غلظت هموگلوبین بود. قطرهٔ کوچکی از خون نیز جهت شمارش افتراقی گلبول‌های سفید بلافاصله پس از خون‌گیری روی لام آزمایشگاهی قرار داده شد و به روش دو لامی با زاویهٔ ۴۵ درجه، گسترش خونی تهیه گردید. گسترش‌های خونی پس از خشک شدن و تثبیت با الکل متانول در هوای آزاد به کمک محلول رقیق شده گیمسا با غلظت ۱۰ درصد رنگ‌آمیزی شد. سه گسترش خونی برای هر نمونه پس از رنگ‌آمیزی برای شمارش افتراقی گلبول‌های سفید و محاسبهٔ درصد فراوانی هر گروه از آن‌ها (یاخته‌های نوتروفیل، ائوزینوفیل، لنفوسیت و مونوسیت) استفاده گردید. از روش زیگزاگ جهت شمارش اسلایدها استفاده شد و برای دقت بیشتر در محاسبات از خون هر ماهی دو اسلاید تهیه شد (Gao *et al.*, 2014).

تجزیه و تحلیل داده‌ها در نرم‌افزار SPSS-19 صورت گرفت. آزمایش در سه تکرار انجام شد و نتایج به صورت میانگین±خطای استاندارد بیان شدند. ابتدا توزیع نرمال داده ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف ارزیابی شد. آزمون مقایسه چند جمله‌ای متعامد (Orthogonal Polynomial Contrast) برای تعیین تأثیر خطی (Linear) و یا تربیعی (Quadratic) ویتامین E بر ماهی آزاد دریای خزر در سطح $P<۰/۰۵$ مورد استفاده قرار گرفت. مدل رگرسیون درجهٔ دوم برای تعیین میزان بهینهٔ ویتامین E طبق روش Zeitoun و همکاران (۱۹۷۶) بکار برده شد.

۳. نتایج

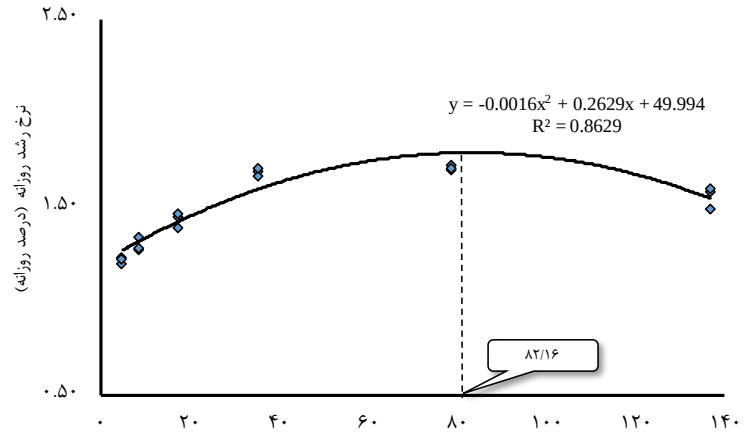
عملکرد رشد و کارایی غذایی در ماهی آزاد دریای خزر تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح افزایشی ویتامین E در جدول ۲ نشان داده شده است. یافته‌ها نشان داد وزن نهایی ماهیان بعد از ۸ هفته غذادهی با افزایش سطح ویتامین E به صورت خطی ($P<۰/۰۵$) و تربیعی

($P<۰/۰۵$) افزایش یافته و به بالاترین مقدار در ماهیان تغذیه شـــده با ۷۸/۸ میلی‌گرم ویتامین E در کیلوگرم جیره رسید. نرخ رشد روزانه به‌صورت خطی ($P<۰/۰۵$) و تربیعی ($P<۰/۰۵$) با افزایش ســـطح ویتامین E جیره افزایش یافت به‌طوری که بالاترین مقدار این متغیر در ماهیان تغذیه شـــده با ۷۸/۸ میلی‌گرم ویتامین E در کیلوگرم جیره به‌دســـت آمد. ماهیان تغذیه شـــده با جیره های حاوی ویتامین E یک روند خطی و تربیعی معنی‌دار را در مقادیر کارایی غذایی و نرخ بازماندگی با افزایش مقدار ویتامین E جیره نشـــان دادند که بالاترین مقدار آن‌ها در ماهیان تغذیه شـــده با ۷۸/۸ میلی‌گرم ویتامین E در کیلوگرم جیره حاصـــل شـــد. ســـطح بهینهٔ ویتامین E جیره نیز بر اساس نرخ رشد روزانه برابر ۸۲/۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم محاسبه شد (شکل ۱).

جدول ۲- عملکرد رشد و کارایی غذایی ماهی آزاد دریای خزر (*S. caspius*)
پس از تغذیه با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر مختلف ویتامین E برای هشت هفته*

جیرهٔ حاوی مقادیر مختلف ویتامین E		وزن نهایی (گرم)	نرخ رشد روزانه (درصد روزانه)	کارایی تغذیه‌ای	بقا (درصد)
۴/۹		۲۲/۴۶±۰/۰۷	۱/۲۲±۰/۰۲	۰/۵۵±۰/۰۴	۷۳/۳۳±۱/۶۷
۸/۶		۲۳/۵۶±۰/۲۵	۱/۳۱±۰/۰۲	۰/۶۵±۰/۰۳	۷۶/۶۷±۱/۶۷
۱۷/۴		۲۵/۴۳±۰/۳۷	۱/۴۴±۰/۰۲	۰/۷۶±۰/۰۶	۷۸/۳۳±۰/۳۳
۳۵/۴		۲۹/۳۱±۰/۱۹	۱/۶۹±۰/۰۱	۰/۸۸±۰/۰۷	۸۰/۰۰±۱/۶۷
۷۸/۸		۲۹/۶۷±۰/۸۷	۱/۷۲±۰/۰۱	۰/۹۵±۰/۱۰	۸۳/۳۳±۱/۶۷
۱۳۷/۰		۲۷/۲۹±۰/۵۱	۱/۵۶±۰/۰۳	۰/۷۸±۰/۰۵	۷۸/۳۳±۱/۶۷
P-values	Linear	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۳
	Quadratic	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۲۷

* مقادیر به‌صورت میانگین±خطای استاندارد ارائه شده‌اند (n=۹).



شکل ۱- سطح بهینهٔ ویتامین E مورد نیاز ماهی آزاد دریای خزر (*S. caspius*)
بر اساس رگرسیون چند جمله‌ای درجهٔ دوم رابطه بین نرخ رشد روزانه و غلظت ویتامین E در جیرهٔ غذایی.

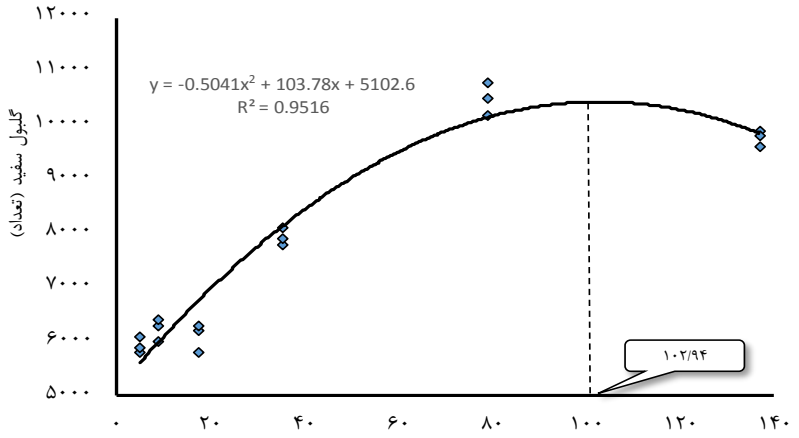
تغییرات فراســـنجه های خونی ماهی آزاد دریای خزر پس از هشت هفته تغذیه با سطوح مختلف ویتامین E در جدول ۴ ارائه شـــده اســـت. یافته‌ها نشـــان داد که تعداد گلبول‌های سفید خون به‌شکل خطی ($P<۰/۰۵$) و تربیعی

($P<۰/۰۵$) افزایش معنی‌داری یافته و به بالاترین میزان خود در ماهیان تغذیه شده با ۷۸/۸ میلی‌گرم ویتامین E در کیلوگرم جیره رسید. بهترین سطح ویتامین E جیرهٔ غذایی بر اساس ارتباط رگرسیونی بین تعداد گلبول‌های سفید و سطح ویتامین E جیره برابر با ۱۰۲/۹۴ میلی‌گرم در کیلوگرم به‌دست آمد (شکل ۲). تعداد گلبول‌های قرمز خونی نیز با الگویی مشابه به‌صورت خطی ($P<۰/۰۵$) و تربیعی ($P<۰/۰۵$) افزایش معنی‌داری داشته و به بالاترین تعداد در ماهیانی رسید که با ۱۳۷/۰ میلی‌گرم ویتامین E در هر کیلوگرم از جیرهٔ غذایی تغذیه شده بودند. بالاترین غلظت هموگلوبین (۱۰/۲۳±۰/۴۵ گرم در دسی‌لیتر) و میزان هماتوکریت (۴۲/۶۷±۲/۰۸ درصد) نیز در ماهیان تغذیه شده با ۱۳۷/۰ میلی‌گرم ویتامین E در هر کیلوگرم جیره غذایی به ثبت رسید، در حالی که ماهیان تغذیه شده با تیمار پایه دارای کمترین مقدار هموگلوبین (۶/۴۰±۰/۱۰ گرم در دسی‌لیتر) و هماتوکریت (۲۸/۰۰±۱/۰۰ درصد) بودند.

جدول ۳- میانگین تغییرات فراسنجه‌های خونی ماهی آزاد دریای خزر (*S. caspius*) پس از تغذیه با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر مختلف ویتامین E برای هشت هفته*

جیرهٔ حاوی مقادیر مختلف ویتامین E		گلبول سفید (میلیون در میلی‌مترمکعب)	گلبول قرمز (میلیون در میلی‌مترمکعب)	هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر)	هماتوکریت (درصد)	حجم متوسط گلبولی (فمتولیتر)	غلظت متوسط هموگلوبین (پیکوگرم)	غلظت متوسط هموگلوبین گلبولی (گرم در دسی‌لیتر)
۴/۹		۵۹۳۳±۱۵۲/۷۵	۵۶۱۶۶۶/۶۷±۱۰۴۰۸/۳۲	۶/۴۰±۰/۱۰	۲۸/۰۰±۱/۰۰	۴۷۶/۶۷±۱۲/۵۰	۱۱۴/۰۰±۱/۰۰	۲۲/۸۷±۰/۴۶
۸/۶		۶۲۳۳/۳۳±۲۰۸/۱۷	۵۶۳۳۳۳/۳۳±۱۶۰۷۲/۷۵	۶/۵۳±۰/۲۱	۲۸/۶۷±۱/۵۳	۴۷۰/۳۳±۱۲/۰۶	۱۱۵/۳۳±۰/۵۸	۲۲/۸۱±۰/۵۰
۱۷/۴		۶۱۰۰/۰۰±۲۶۴/۵۸	۷۷۵۰۰۰/۰۰±۱۸۰۲۷/۷۶	۹/۰۷±۰/۲۳	۳۹/۳۳±۰/۵۸	۴۷۵/۶۷±۶/۴۳	۱۱۶/۳۳±۰/۵۸	۲۳/۰۵±۰/۵۲
۳۵/۴		۷۹۳۳/۳۳±۱۵۲/۷۵	۸۸۸۳۳۳/۳۳±۲۲۵۴۶/۲۵	۱۰/۲۰±۰/۴۰	۴۲/۳۳±۱/۵۳	۵۰۷/۳۳±۸/۰۸	۱۱۴/۳۳±۱/۵۳	۲۴/۰۹±۰/۱۹
۷۸/۸		۱۰۵۰۰/۰۰±۳۰۰/۰۰	۸۸۵۰۰۰/۰۰±۱۳۲۲۸/۷۶	۱۰/۲۰±۰/۲۰	۴۱/۶۷±۱/۵۳	۵۰۸/۰۰±۱۳/۰۰	۱۱۴/۶۷±۱/۱۵	۲۴/۴۹±۰/۶۸
۱۳۷/۰		۹۷۶۶/۶۷±۱۵۲/۷۵	۸۹۳۳۳۳/۳۳±۲۰۲۰۷/۲۶	۱۰/۲۳±۰/۴۵	۴۲/۶۷±۲/۰۸	۴۹۸/۰۰±۸/۸۹	۱۱۴/۰۰±۲/۰۰	۲۳/۹۹±۰/۲۷
P-values	Linear	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۵۱۹	۰/۰۰۰
	Quadratic	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۵۱۶	۰/۰۷۹	۰/۵۳۴

* مقادیر به‌صورت میانگین±خطای استاندارد ارائه شده‌اند (n=۹).



شکل ۲- نمودارسطح بهینهٔ ویتامین E مورد نیاز ماهی آزاد دریای خزر (*S. caspius*) براساس رگرسیون چند جمله‌ای درجهٔ دوم رابطه بین تعداد گلبول‌های سفید و غلظت ویتامین E در جیرهٔ غذایی.

یافته های مربوط به فراسنجه های گلبول های خونی نشان داد که متوسط حجم گلبولی ماهیان و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز با افزایش میزان ویتامین E در جیرهٔ غذایی به‌صورت خطی افزایش معنی داری داشته است ($P<۰/۰۵$) و به بیشترین مقدار خود در ماهیانی رسید که با ۷۸/۸ میلی گرم ویتامین E در کیلوگرم جیره تغذیه گردیده بودند (جدول ۴). با این وجود اختلاف معنی داری در میزان غلظت متوسط هموگلوبین سرم خون ماهیان تغذیه شده با مقادیر مختلف ویتامین E مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$).

شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون ماهیان نشان داد که درصد نوتروفیل ماهیان به‌طور خطی معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) با افزایش میزان ویتامین E موجود در جیرهٔ غذایی کاهش یافته و به پایین‌ترین سطح در ماهیانی رسید که با ۷۸/۸ میلی‌گرم ویتامین E در هر کیلوگرم جیره) تغذیه شده بودند (جدول ۴). درصد لنفوسیت‌ها در مقابل با افزایش میزان ویتامین E در جیرهٔ غذایی به شکل خطی معنی‌دار افزایش یافت ($P<۰/۰۵$) و پس از هشت هفته به بالاترین مقدار در ماهیانی رسید که با ۷۸/۸ میلی گرم ویتامین E در هر کیلوگرم از جیرهٔ غذایی تغذیه کرده بودند. با این وجود اختلاف معنی‌داری در تعداد مونوسیت‌ها و ائوزینوفیل‌های سرم ماهی آزاد دریای خزر پس از هشت هفته تغذیه با مقادیر مختلف ویتامین E مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$).

جدول ۴- میانگین شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون ماهی آزاد دریای خزر، (*S. caspius*) پس از تغذیه با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر مختلف ویتامین E برای هشت هفته*

جیرهٔ حاوی مقادیر مختلف ویتامین E		نوتروفیل	لنفوسیت	مونوسیت	ائوزینوفیل
۴/۹		۱۹/۶۶±۰/۵۸	۷۴/۶۷±۱/۱۵	۵/۰۰±۱/۰۰	۰/۶۷±۰/۱۷
۸/۶		۲۲/۳۳±۱/۵۳	۷۲/۰۰±۲/۶۵	۵/۰۰±۱/۰۰	۰/۶۷±۰/۰۶
۱۷/۴		۱۸/۶۷±۰/۵۸	۷۵/۶۶±۱/۵۳	۴/۶۷±۰/۵۸	۱/۰۰±۰/۰۷
۳۵/۴		۱۸/۳۳±۲/۳۱	۷۶/۰۰±۱/۰۰	۵/۰۰±۱/۰۰	۰/۶۷±۰/۰۳
۷۸/۸		۱۳/۳۳±۲/۰۸	۸۲/۰۰±۲/۰۰	۴/۶۷±۰/۵۸	۰
۱۳۷/۰		۱۵/۰۰±۱/۷۳	۸۱/۳۳±۱/۵۳	۳/۶۷±۰/۵۸	۰
P-values	Linear	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۸۸	۰/۰۶۵
	Quadratic	۰/۲۵۰	۰/۰۵۷	۰/۲۷۰	۰/۲۱۵

* مقادیر به‌صورت میانگین±خطای استاندارد ارائه شده‌اند (n=۹).

۴. بحث و نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از ویتامین E در جیرهٔ غذایی ماهی آزاد دریای خزر جهت رشد و بازماندگی ضروری بوده و تأثیر معنی‌داری بر بازماندگی و عملکرد رشد آن‌ها دارد. در صد بقا، میانگین وزن نهایی و نرخ رشد روزانه ماهیان پس از هشت هفته تغذیه با ویتامین E به شکل معنی‌داری نسبت به میانگین آن‌ها در ماهیان تیمار شاهد افزایش یافت. نتایج مشابهی نیز در مورد استفاده از ویتامین E در ماهی سوکلا، *Rachycentron canadum* (Zhou *et al.*, 2013)، سیم دریایی جوان، *Scophthalmus maximus* (Tocher *et al.*, 2002)، کپور علفخوار، *Ctenopharyngodon idella* (*Pan et al.*, 2017)، تیلاپیای نیل (Ahmed *et al.*, 2021)، گربه ماهی زرد، *Pelteobagrus fulvidraco* (Lu *et al.*, 2016) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (Pearce *et al.*, 2003) مشاهده شده است. این افزایش بقا و رشد ماهیان تحت تأثیر ویتامین E

می‌تواند به‌دلیل اثر محافظتی آلفاتوکوفرول به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی در مقابل تأثیرات مخرب متنوع اکسیژن واکنشی و سایر رادیکال‌های آزاد باشد که اکسیداسیون فسفولیپیدهای چند غیراشباع غشایی، پروتئین‌ها و یا هر دوی این مواد را کاهش می‌دهد (NRC, 1993). با این حال، در بعضی از مطالعات استفاده از ویتامین E تأثیری در میزان رشد ماهیانی نظیر ماهی آزاد کوهو اصلاح نژاد شده، *Oncorhynchus kisutch* (Huang *t al*., 2004) یا سیم دریایی قرمز، *Pagrus major* (Linn *t al*., 2014) نداشته است که می‌تواند به‌دلایل مختلفی از جمله سن ماهیان، شرایط پرورشی، سطح غیر مؤثر ویتامین استفاده شده، مدت زمان سازگاری به محیط پرورشی و حتی وجود سایر آنتی‌اکسیدان‌ها در جیرهٔ غذایی ارتباط داشته باشد (Zhou *et al*., 2013).

مقدار ویتامین E مورد نیاز ماهی آزاد دریای خزر در این پژوهش براساس نرخ رشد روزانه برابر با ۸۲/۱۶ میلی‌گرم ویتامین E به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن تعیین گردید. این مقدار در برخی گونه‌های دیگر نیز تعیین شده که از آن جمله می‌توان به ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم برای ماهی آزاد اقیانوس اطلس (Hamre and Lie, 1995)، ۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم برای طوطی ماهی، *Oplegnathus fasciatus* (Galaz *et al*., 2010)، ۳۱ میلی‌گرم در کیلوگرم برای شانک قرمز، *Sciaenops ocellatus* (Peng and Gatlin Iii, 2009)، ۷۸-۱۱ میلی‌گرم در کیلوگرم برای ماهی سوکلا (Zhou *et al*., 2013) و ۲۵ تا ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم برای قزل‌آلای رنگین‌کمان (Cowey *et al*., 2011) اشاره نمود که همگی پایین‌تر از میزان بهینهٔ ویتامین E مورد نیاز بچه ماهی آزاد دریای خزر می‌باشند. این در حالی است که میزان ویتامین E مورد نیاز ماهی مریگال، *Cirrhinus mrigala*، برابر ۹۹ میلی‌گرم در کیلوگرم و در محدوده‌ای نزدیک به مقدار تعیین شده برای بچه ماهی آزاد دریای خزر بود (Paul *et al*., 2004). این اختلافات می‌تواند ریشه در عواملی از جمله اندازهٔ ماهی، مرحلهٔ زندگی، محیط زیست پرورش و اختلاف در شرایط آزمایش شامل سطوح اثرات متقابل در جیره‌های آزمایشی داشته باشد. همچنین سایر ترکیبات جیره مانند آستازانتین، سلنیوم و دیگر ویتامین‌ها نظیر ویتامین C و حتی خود متغیر مطالعاتی در تعیین نیاز به این ویتامین تأثیرگذار هستند (Hamre, 2011).

کارایی تغذیه‌ای یکی از فراسنجه‌های مؤثر در عملکرد تولید است که مقدار آن در پژوهش حاضر با افزایش میزان ویتامین E تا مقدار ۷۸/۸ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم جیره افزایش یافت. این یافته‌ها در کنار الگوی افزایشی مشابه در نرخ رشد روزانه به معنی آن است که مصرف مقادیر کمتر غذای حاوی ویتامین E در ماهی آزاد خزر می‌تواند به رشد بالاتر این گونه منجر شود. با توجه به اینکه غذای مصرفی می‌تواند بیش از ۶۰ درصد هزینه‌های تولید را به خود اختصاص دهد (Hertrampf and Piedad-Pascual, 2000)، افزایش کارایی به معنی کاهش هزینه‌های تولید از یک سو و اثرات زیست‌محیطی پایین‌تر ناشی از ورود مواد دفعی به زیست‌بوم‌های طبیعی به‌دلیل مصرف مقادیر کمتر ترکیبات حاوی نیتروژن و فسفر خواهد بود (Wilfart *et al*., 2023). یافته‌های مشابهی نیز در رابطه با بهبود کارایی تغذیه‌ای در گونه های دیگری از ماهیان پرورشی نظیر تیلاپیای هیبرید و هامور پس از مصرف ویتامین E گزارش شده است (Lin and Shiau, 2005; Lim *et al*., 2010).

از سوی دیگر، ماهیان تغذیه شده با میزان ۱۳۷/۰ میلی‌گرم ویتامین E به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن در پژوهش حاضر دارای درصد بقای کمتر، نرخ رشد ضعیف‌تر و کارایی غذایی پایین‌تر نسبت به ماهیان بودند که با جیرهٔ غذایی حاوی ۷۸/۸ میلی‌گرم ویتامین E به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن تغذیه نموده بودند. پژوهش های انجام شده روی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Kiron *et al*., 2004)، کپور علفخوار (Li *et al*., 2014) و گربه ماهی زرد (Lu *et al*., 2016) نیز بیانگر کارایی غذایی پایین‌تر و مرگ و میر بالاتر پس از تغذیه با مقادیر بالای ویتامین E در این ماهیان است. این شرایط به احتمال فراوان می‌تواند

ناشی از عدم تعادل و تجمع رادیکال‌های ویتامین E باشد که به‌عنوان پرواکسیدان عمل نموده و منجر به کاهش رشد و حتی مرگ و میر شده‌اند، باشد (Hamre, 2011; Li *et al*., 2013).

فراسنجه‌های خون‌شناسی به‌عنوان شاخص‌هایی قابل اعتماد برای سلامتی ماهیان در نظر گرفته می‌شوند (Pelster, 2021). مطالعات نشان می‌دهد که فاکتورهای خونی و سرمی در ماهیان تحت تأثیر عواملی نظیر سن و وزن ماهی، رسیدگی جنسی، فصول مختلف، استرس‌ها و بیماری‌ها دچار تغییر می‌گردند (Hrubec *et al*., 2001). ویتامین E در این مطالعه تأثیر معنی‌داری روی فراسنجه‌های خونی شامل گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز، هموگلبین، هماتوکریت، متوسط هموگلوبین گلبولی و درصد افتراقی گلبول‌های سفید (نوتروفیل و لنفوسیت) داشت. همچنین حجم متوسط گلبولی و غلظت متوسط هموگلوبین گلبولی به‌صورت خطی با افزایش غلظت ویتامین E جیره افزایش یافتند. تعداد گلبول های قرمز ماهی آزاد در پای خزر با افزایش میزان ویتامین E در جیره افزایش نشان داد و به بالاترین مقدار در ماهیانی رسید که با بیشترین سطح ویتامین E در جیره غذایی تغذیه شده بودند. اگرچه آهن به‌عنوان مهمترین عامل کم‌خونی تغذیه‌ای شناخته شده است، کمبود مقدار ویتامین E نیز در ایجاد کم‌خونی مؤثر شناخته شده است (Jilani *et al*., 2018). تحقیقات نشان داده است که ویتامین E نقش مهمی در جلوگیری از اکسیداسیون اسیدهای چرب چندغیراشباع دیوارهٔ سلولی گلبول‌های قرمز داشته که در نتیجه یکپارچگی غشای گلبول قرمز را حفظ نموده و تجزیه زودرس گلبول‌های قرمز ناشی از استرس اکسیداتیو را مهار می‌کند (Elaroussi *et al*., 2007). تأثیرات حفاظتی ترکیبات آنالوگ ویتامین E بر گلبول‌های قرمز در مقابل استرس‌های اکسیداتیو گزارش شده است (Antosik *et al*., 2018). ایجاد شرایط مناسب‌تر برای گردش انرژی در تیمار حاوی بالاترین سطح ویتامین E نیز می‌تواند به سنتز تعداد بالاتر گلبول‌های قرمز در این تیمار ختم شود، هرچند که اظهار نظر قطعی در این زمینه نیازمند پژوهش‌های بیشتر است.

یافته‌های پژوهش حاضر تأثیر افزایشی ویتامین E موجود در جیره غذایی را بر میزان هماتوکریت خون نشان می‌دهد. مقدار هماتوکریت به شکل مشابهی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Puangkaew *et al*., 2005)، باس هیبرید (Kocabas and Gatlin, 1999)، گربه ماهی زرد (Lu *et al*., 2016)، ماهی آزاد اقیانوس اطلس (Hamre *et al*., 1994)، ماهی صخره‌ای کره‌ای، *Sebastes schlegeli* (Bai and Lee, 1998)، هامور، *Epinephelus malabaricus* (Lin and Shiau, 2005)، ماهی برقی طلایی، *Notemigonus crysoleucas* (Chen *et al*., 2004) پس از تغذیه با جیرهٔ بدون ویتامین E کمتر از ماهیانی بود که از جیره‌های غنی شده با ویتامین E تغذیه نموده بودند. نقش خون‌ساز ویتامین E در برخی گونه‌ها به اثبات رسیده است (Chen *et al*., 2004; Puangkaew *et al*., 2005). در واقع، ویتامین E تعداد واحدهای تشکیل‌دهندهٔ کلنی پیش‌سازهای اریتروئیدی (CFU-E) را افزایش داده که منجر به اریتروپوز و در نتیجه افزایش میزان هماتوکریت خواهد شد (Pathak *et al*., 2003; Rusu *et al*., 2013).

هموگلوبین که مسئول انتقال اکسیژن از آبشش به بافت‌های مختلف اغلب ماهیان است را می‌توان به‌عنوان پروتئینی در نظر گرفت که بیش از سایر پلی‌پپتیدها مورد مطالعه قرار گرفته است (Quinn *et al*., 2010). با این وجود استاندارد مشخص در مورد غلظت بهینهٔ این پروتئین خونی در ماهی آزاد دریای خزر اعلام نشده است. کمبود ویتامین E در ماهیان با افزایش ناهنجاری‌های غشایی و شکنندگی اریتروسیت‌ها موجب تسهیل در همولیز و کاهش زمان بقای گویچه‌های قرمز شده که در نتیجه منجر به اختلالات خون‌شناسی نظیر کاهش میزان هماتوکریت و غلظت هموگلوبین خواهد شد (Pearce *et al*., 2003; Sado *et al*., 2013). نتایج حاصل از پژوهش حاضر در تأیید یافته‌های Linn و همکاران (۲۰۱۴) روی سیم در یایی قرمز و Wang و همکاران (۲۰۱۶) روی کپور معمولی نشان داد که غلظت هموگلوبین

خون ماهیان با تغذیه از مقادیر مختلف ویتامین E افزایش یافته و به بیش از ۶۰ درصد مقادر آن در مقایسه با ماهیانی رسید که از جیرهٔ پایه تغذیه نموده بودند که خود بیانگر قابلیت بالاتر آن‌ها برای حفظ بقا به‌ویژه در شرایط متراکم پرورشی است (Rezakhani *et al*., 2021).

فراسنجه‌های حجم متوسط گلبولی، غلظت متوسط هموگلوبین و متوسط هموگلوبین گلبولی از جمله شاخص‌هایی هستند که معمولاً برای تشخیص کم‌خونی در مهره‌داران مورد استفاده قرار می‌گیرند (Whalan, 2015). افزایش خطی حجم متوسط گلبولی و متوسط هموگلوبین گلبولی در این پژوهش بیانگر آن است که ماهی آزاد دریای خزر در حجم مشخصی از گلبول‌های قرمز دارای غلظت بالاتری از هموگلوبین می‌باشد. به‌عبارت دیگر ماهی در حجم ثابتی از خون می‌تواند غلظت بیشتری از اکسیژن را حمل نموده و علاوه بر کمک به آن‌ها برای مقابله با شرایط کمبود اکسیژنی می‌تواند رشد بیشتر ماهی آزاد دریای خزر پس از هشت هفته تغذیه با مقادیر بالاتر ویتامین E را نیز تأیید نماید (Buentello *et al*., 2000). شایان ذکر است تفاوت معنی‌داری در میزان غلظت متوسط هموگلوبین بین تیمارهای مختلف آزمایشی مشاهده نشد. همچنین بازهٔ تغییرات حجم متوسط گلبولی و متوسط هموگلوبین گلبولی به اندازه‌ای نبود که بتوان نشانه‌ای از ناهنجاری‌های ماکروسایتیک[1] و هایپوکرومیک[2] را در ماهی آزاد دریای خزر پس از هشت هفته تغذیه با جیرهٔ فاقد ویتامین E مشاهده نمود (Clauss *et al*., 2008) هرچند که نبود مقادیر استاندارد برای فراسنجه‌های فوق در ماهی آزاد دریای خزر مانع از قضاوت دقیق در این زمینه شده است.

ماهیان در سیستم‌های متراکم آبزی‌پروری در تماس دائم با بار باکتریایی بالایی قرار دارند که می‌تواند سلامت آن‌ها را به خطر بیندازد. بدن آبزیان برای مقابله با این شرایط ناخواسته مجهز به سازو کارهای مختلفی از جمله سنتز گلبول‌های سفید خونی شده که مهمترین نقش آن‌ها را می‌توان در مبارزه با عفونت، دفاع از بدن مقابل موجودات بیگانه و پاسخ‌های ایمنی خلاصه نمود (Seibel *et al*., 2021). با این وجود عوامل مختلفی همچون فصل پرورش، دما و جذب مواد غذایی بر فعالیت گلبول‌های سفید تأثیرگذار خواهند بود (Shahkar *et al*., 2018). پژوهش های کمی تا به امروز به بررسی تأثیر ویتامین E بر فعالیت گلبول های خونی پرداخته است. Ispir و همکاران (۲۰۱۱) در تأیید یافته‌های پژوهش حاضر افزایش تعداد گلبول‌های سفید را هم‌زمان با افزایش میزان ویتامین E خوراکی در تیلاپیای نیل گزارش نمودند. افزایش تعداد گلبول های سفید هم‌زمان با افزایش غلظت ویتامین E خوراکی در گونه‌هایی نظیر کپور معمولی (Wang *et al*., 2016) و مارماهی ژاپنی، *Anguilla japonica* (Shahkar *et al*., 2018) گزارش شده است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ویتامین E ممکن است قادر باشد از کارکرد دفاعی گلبول‌های سفید محافظت نماید و این کار را احتمالاً از طریق حفاظت غشای آن‌ها در مقابل رادیکال‌های آزاد انجام می‌دهد (Sahoo and Mukherjee, 2002). با این وجود اظهارنظر دقیق در این مورد نیازمند بررسی‌های بیشتر است. کاهش تعداد گلبول های سفید خونی هم‌زمان با افزایش میزان ویتامین E به ۱۳۷/۰ گرم در هر کیلوگرم جیره غذایی نیز می‌تواند ناشی از تأثیرات منفی ویتامین‌های محلول در چربی بر سلامت ماهی در مقادیر بالاتر از حد بهینهٔ آن‌ها باشد (Sayad Burani *et al*., 2015). سطح بهینهٔ ویتامین E برای افزایش سنتز گلبول‌های سفید در این پژوهش برابر با ۱۰۲/۹۴ میلی‌گرم ویتامین E در کیلوگرم غذا تعیین گردید.

بررسی تغییرات افتراقی گلبول‌های سفید ماهی آزاد دریای خزر پس از هشت هفته تغذیه با مقادیر مختلف ویتامین E نشان داد که تعداد لنفوسیت‌ها به شکل معنی‌داری افزایش و تعداد نوتروفیل‌ها کاهش یافته است. تأثیر ویتامین E بر کارکرد بهینهٔ سیستم ایمنی به‌خوبی مشخص شده است هرچند که ساز و کار ایمن فرآیند شناخته شده نیست. یافته‌ها در مورد سایر جانوران نشان

[1] Macrocytic
[2] Hypochromic

می‌دهد که ویتامین E قادر به افزایش ایمنوگلوبولین M از طریق افزایش تعداد لنفوسیت‌های B است (Dalia *et al*., 2018). ویتامین E همچنین قادر است فعالیت لنفوسیت‌های T را از طریق یکپارچگی غشای سلولی، هدایت سیگنالی و تقسیم سلولی بهبود بخشد (Lewis *et al*., 2019).

نتیجه گیری نهایی

به‌طور کلی یافته های پژوهش حاضر نشان داد که ویتامین E قادر است رشد ماهی آزاد دریای خزر را بهبود بخشیده و درصد بقای آن‌ها را افزایش دهد. همچنین فراسنجه‌های خونی شامل تعداد گلبول‌های سفید و قرمز، میزان هموگلوبین و درصد هماتوکریت و تعداد لنفوسیت‌ها نیز به شکل معنی‌داری تحت تأثیر میزان ویتامین E موجود در جیرهٔ غذایی افزایش یافتند. بهترین سطح ویتامین E بر این اساس برابر با ۸۲/۱۶ میلی‌گرم در کیلوگرم بر اساس نرخ رشد روزانه و ۱۰۲/۹۸ میلی‌گرم در کیلوگرم بر اساس سنتز گلبول‌های سفید خونی تعیین گردیدند.

۵. منابع

References

Ahmed, S.A.A., Ibrahim, R.E., Farroh, K.Y., Moustafa, A.A., Al-Gabri, N.A., Alkafafy, M., Amer, S.A., 2021. Chitosan vitamin E nanocomposite ameliorates the growth, redox, and immune status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under different stocking densities. *Aquaculture* 541, 736804.

Amlashi, A.S., Falahatkar, B., Sattari, M., Gilani, M.H., 2011. Effect of dietary vitamin E on growth, muscle composition, hematological and immunological parameters of sub-yearling beluga *Huso huso* L. *Fish & Shellfish Immunology* 30(3), 807-814.

Antosik, A., Czubak, K., Cichon, N., Nowak, P., Zbikowska, H., 2018. Vitamin E analogue protects red blood cells against storage-induced oxidative damage. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 45(5), 347-354.

Arab, N., Rajabi Islami, H., 2015. Effects of Dietary Ascorbic Acid on Growth Performance, Body Composition, and Some Immunological Parameters of Caspian Brown Trout, *Salmo trutta caspius*. *Journal of the World Aquaculture Society* 46(5), 505-518.

Bae, J.Y., Park, G.H., Yoo, K.Y., Lee, J.Y., Kim, D.J., Bai, S.C., 2013. Evaluation of optimum dietary vitamin E requirements using DL-α-tocopheryl acetate in the juvenile eel, *Anguilla japonica*. *Journal of Applied Ichthyology* 29(1), 213-217.

Bai, S.C., Lee, K.-J., 1998. Different levels of dietary dl-α-tocopheryl acetate affect the vitamin E status of juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Aquaculture* 161(1), 405-414.

Besharat, M., Rajabi Islami, H., Soltani, M., Mousavi, S.A., 2021. Effect of nanoliposomes coated with astaxanthin on growth performance indices and feed product efficiency of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Renewable Natural Resources Research* 12(1), 95-105.

Buentello, J.A., Gatlin, D.M., Neill, W.H., 2000. Effects of water temperature and dissolved oxygen on daily feed consumption, feed utilization and growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 182(3), 339-352.

Buttriss, J.L., Diplock, A.T., 1984. High-performance liquid chromatography methods for vitamin E in tissues. *Methods in Enzymology* 105, 131-138.

Chen, R., Lochmann, R., Goodwin, A., Praveen, K., Dabrowski, K., Lee, K.-J., 2004. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). *Aquaculture* 242(1), 553-569.

Clauss, T.M., Dove, A.D.M., Arnold, J.E., 2008. Hematologic disorders of fish. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 11(3), 445-462.

Cowey, C.B., Adron, J.W., Youngson, A., 1983. The vitamin E requirement of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) given diets containing polyunsaturated fatty acids derived from fish oil. *Aquaculture* 30(1), 85-93.

Dalia, A.M., Loh, T.C., Sazili, A.Q., Jahromi, M.F., Samsudin, A.A., 2018. Effects of vitamin E, inorganic selenium, bacterial organic selenium, and their combinations on immunity response in broiler chickens. *BMC Veterinary Research* 14(1), 249.

Elaroussi, M.A., Fattah, M.A., Meky, N.H., Ezzat, I.E., Wakwak, M.M., 2007. Effects of vitamin E, age and sex on performance of Japanese quail. 1. Haematological indices and liver function. *British Poultry Science 48*(6), 669-677.

Farahnak Roudsari, S., Rajabi Islami, H., Mousavi, S.A., Shamsaie Mehrgan, M., 2021. Folic acid-coated nanochitosan ameliorated the growth performance, hematological parameters, antioxidant status, and immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Frontiers in Veterinary Science* 8, 647722.

Farinha, A.P., Moreira, M., de Magalhães, C.R., Schrama, D., Cerqueira, M., Carrilho, R., Rodrigues, P.M., 2022. Chapter two - Proteomics for Quality and Safety in Fishery Products. In: Galanakis, C. M. (Ed.). *Sustainable Fish Production and Processing*. Academic Press. Massachusetts, USA. pp. 45-78.

Galaz, G.B., Kim, S., Lee, K., 2010. Effects of different dietary vitamin E levels on growth performance, non-specific immune responses, and disease resistance against *Vibrio anguillarum* in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 23(7), 916-923.

Gao, J., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Mamauag, R.E.P., 2014. Interactive effects of vitamin C and E supplementation on growth performance, fatty acid composition and reduction of oxidative stress in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed dietary oxidized fish oil. *Aquaculture* 422-423, 84-90.

Hamre, K., 2011. Metabolism, interactions, requirements and functions of vitamin E in fish. *Aquaculture Nutrition* 17(1), 98-115.

Hamre, K., Hjeltnes, B., Kryvi, H., Sandberg, S., Lorentzen, M., Lie, O., 1994. Decreased concentration of hemoglobin, accumulation of lipid oxidation products and unchanged skeletal muscle in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed low dietary vitamin E. *Fish Physiology and Biochemistry* 12(5), 421-429.

Hamre, K., Lie, Ø., 1995. Minimum requirement of vitamin E for Atlantic salmon, *Salmo salar* L., at first feeding. *Aquaculture Research* 26(3), 175-184.

Hertrampf, J.W., Piedad-Pascual, F., 2000. Nutrition of aquatic animals at a glance. In: Hertrampf, J. W., Piedad-Pascual, F., (Eds.). *Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds*. Springer. Dordrecht, Netherlands. pp. 4-42.

Hrubec, T.C., Smith, S.A., Robertson, J. L., 2001. Age-related changes in hematology and plasma chemistry values of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Veterinary Clinical Pathology* 30(1), 8-15.

Huang, C.-H., Higgs, D.A., Balfry, S.K., Devlin, R.H., 2004. Effect of dietary vitamin E level on growth, tissue lipid peroxidation, and erythrocyte fragility of transgenic coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology* 139(2), 199-204.

Hung, S., Cho, C., Slinger, S., 2011. Measurement of oxidation in fish oil and its effect on vitamin E nutrition of rain- bow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37, 1248-1253.

Ispir, U., Yonar, M., Oz, O.B., 2011. Effect of dietary vitamin e supplementation on the blood parameters of Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*). *Journal of Animal and Plant Sciences* 21, 566-569.

Jilani, T., Iqbal, M.P., 2018. Vitamin E deficiency in South Asian population and the therapeutic use of alpha-tocopherol (Vitamin E) for correction of anemia. *Pakistan Journal of Medical Sciences* 34(6), 1571-1575.

Kakavand, M., Hosseini Shekarabi, S.P., Shamsaie Mehrgan, M., Islami, H.R., 2021. Potassium diformate in the diet of sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*): Zootechnical performance, humoral and skin mucosal immune responses, growth-related gene expression and intestine morphology. *Aquaculture Nutrition* 27(6), 2392-2404.

Kalayci, G., Ozturk, R.C., Capkin, E. Altinok, I., 2018. Genetic and molecular evidence that brown trout Salmo trutta belonging to the Danubian lineage are a single biological species. J*ournal of Fish Biology* 93, 792-804.

Kiron, V., Puangkaew, J., Ishizaka, K., Satoh, S., Watanabe, T., 2004. Antioxidant status and nonspecific immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two levels of vitamin E along with three lipid sources. *Aquaculture* 234(1), 361-379.

Gatlin III, D.M., 1999. Dietary vitamin E requirement of hybrid striped bass (*Morone chrysops* female×*M. saxatilis* male). *Aquaculture Nutrition* 5(1), 3-7.

Kousoulaki, K., Sveen, L., Norén, F., Espmark, Å., 2022. Atlantic salmon (*Salmo salar*) performance fed low trophic ingredients in a fish meal and fish oil free diet. *Frontiers in Physiology* 13, 884740.

Lewis, E.D., Meydani, S.N., Wu, D., 2019. Regulatory role of vitamin E in the immune system and inflammation. *IUBMB Life* 71(4), 487-494.

Li, J., Liang, X.-F., Tan, Q., Yuan, X., Liu, L., Zhou, Y., Li, B., 2014. Effects of vitamin E on growth performance and antioxidant status in juvenile grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. *Aquaculture* 430, 21-27.

Li, M., Chen, L., Qin, J.G., Li, E., Yu, N., Du, Z., 2013. Growth performance, antioxidant status and immune response in darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli* fed different PUFA/vitamin E dietary levels and exposed to high or low ammonia. *Aquaculture* 406-407, 18-27.

Li, S., Lian, X., Chen, N., Wang, M., Sang, C., 2018. Effects of dietary vitamin E level on growth performance, feed utilization, antioxidant capacity and nonspecific immunity of largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Aquaculture Nutrition* 24(6), 1679-1688.

Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., Welker, T., Klesius, P.H., Li, M.H., 2010. Growth performance, immune response, and resistance to *Streptococcus iniae* of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed diets containing various levels of vitamins C and E. *Journal of the World Aquaculture Society* 41(1), 35-48.

Lin, Y.-H., Shiau, S.-Y., 2005. Dietary vitamin E requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, at two lipid levels, and their effects on immune responses. *Aquaculture* 248(1), 235-244.

Linn, S., Ishikawa, M., Koshio, S., Yokoyama, S., 2014. Effect of dietary vitamin E supplementation on growth performance and oxidative condition of red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture Science* 62(4), 329-339.

Lozano, A.R., Borges, P., Robaina, L., Betancor, M., Hernández-Cruz, C.M., García, J.R., CaballeroIzquierdo, M. J., 2017. Effect of different dietary vitamin E levels on growth, fish composition, fillet quality and liver histology of meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture* 468, 175-183.

Lu, Y., Liang, X.-P., Jin, M., Sun, P., Ma, H.-N., Yuan, Y., Zhou, Q.-C., 2016. Effects of dietary vitamin E on the growth performance, antioxidant status and innate immune response in juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture* 464, 609-617.

Mohseni, M., Pourkazemi, M., Hosseni, M.R., Hassani, M.H.S., Bai, S.C., 2013. Effects of the dietary protein levels and the protein to energy ratio in sub-yearling Persian sturgeon, *Acipenser persicus* (Borodin). *Aquaculture Research* 44(3), 378-387.

NRC, 1993. National research council. Nutrient requirements of fish. National Academic Press. Washington, DC. 193 p.

Pan, J.H., Feng, L., Jiang, W.D., Wu, P., Kuang, S.Y., Tang, L., Zhang Y.-A., Zhou, X.-Q., Liu, Y., 2017. Vitamin E deficiency depressed fish growth, disease resistance, and the immunity and structural integrity of immune organs in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): Referring to NF-κB, TOR and Nrf2 signaling. *Fish & Shellfish Immunology* 60, 219-236.

Pathak, A., Roth, P., Piscitelli, J., Johnson, L., 2003. Effects of vitamin E supplementation during erythropoietin treatment of the anaemia of prematurity. *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition* 88(4), F324-328.

Paul, B.N., Sarkar, S., Mohanty, S.N., 2004. Dietary vitamin E requirement of mrigal, *Cirrhinus mrigala* fry. *Aquaculture* 242(1), 529-536.

Pearce, J., Harris, J.E., Davies, S.J., 2003. The effect of vitamin E on the serum complement activity of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Nutrition* 9(5), 337-340.

Pelster, B., 2021. Using the swimbladder as a respiratory organ and/or a buoyancy structure-Benefits and consequences. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology* 335(9-10), 831-842.

Peng, L.I., Gatlin Iii, D.M., 2009. Dietary vitamin E requirement of the red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture Nutrition* 15(3), 313-319.

Puangkaew, J., Kiron, V., Satoh, S., Watanabe, T., 2005. Antioxidant defense of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to dietary n-3 highly unsaturated fatty acids and vitamin E contents. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicolology and Pharmacology* 140(2), 187-196.

Quinn, N.L., Boroevich, K.A., Lubieniecki, K.P., Chow, W., Davidson, E.A., Phillips, R.B., Koop, B. F., Davidson, W.S., 2010. Genomic organization and evolution of the Atlantic salmon hemoglobin repertoire. *BMC Genomics* 11(1), 539.

Rezakhani, S., Mohammadizadeh, F., Khara, H., Hooshang Bahri, A., Ahmadnezhad, M., 2021. Evaluation of oxygen changes on survival, some stress indices and hematological and immunological factors in Caspian Sea salmon (*Salmo trutta caspius*). *Aquatics Physiology and Biotechnology* 9(1), 77-96.

Ruff, N., FitzGerald, R.D., Cross, T.F., Hamre, K., Kerry, J.P., 2003. The effect of dietary vitamin E and C level on market-size turbot (*Scophthalmus maximus*) fillet quality. *Aquaculture Nutrition* 9(2), 91-103.

Rusu, A., Rusu, F., Zalutchi, D., Muresan, A., Gherman Caprioara, M., Kacso, I., 2013. The influence of vitamin E supplementation on erythropoietin responsiveness in chronic hemodialysis patients with low levels of erythrocyte superoxide dismutase. *International Urology and Nephrology* 45(2), 495-501.

Sado, R.Y., Bicudo, A.J., Cyrino, J.E., 2013. Growth and hematology of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) fed with increasing levels of vitamin E (DL-α-tocopheryl acetate). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 85(1), 385-393.

Sahoo, P.K., Mukherjee, S.C., 2002. Influence of high dietary α-tocopherol intakes on specific immune response, nonspecific resistance factors and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquaculture Nutrition* 8(3), 159-167.

Sajedkhanian, A., Mohseni, M., Norouzi, M., 2021. Effects of dietary fish oil replacement by canola oil on some functional and growth parameters in juveniles of *Salmo caspius*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 20(4), 1219-1233.

Sayad Burani, M., Khara, H., Sayad Burani, M., Fakharzadeh, S.E., 2015. The effect of vitamin C and E supplement in diet on the growth and immunological parameters of Caspian salmon (*Salmo trutta caspius*). *Iranian Scientific Fisheries Journal* 23(4), 85-95.

Seibel, H., Baßmann, B., Rebl, A., 2021. Blood Will Tell: What Hematological Analyses Can Reveal About Fish Welfare. *Frontiers in Veterinary Science* 8.

Shahkar, E., Hamidoghli, A., Yun, H., Kim, D.-J., Bai, S.C., 2018. Effects of dietary vitamin E on hematology, tissue α-tocopherol concentration and non-specific immune responses of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 484, 51-57.

Simmons, A., 1997. *Hematology: a combined theoretical and technical approach*. Saunders LTD. Philadelphia. USA. 464 p.

Soldatov, A. A., 2021. Content of Methemoglobin in the Blood of Teleost Fish: Effect of Environmental Factors and Natural States of the Organism (Review). *Inland Water Biology* 14(6), 747-757.

Thrall, M.A., Weiser, G., Allison, R.W., Campbell, T.W., 2012. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. John Wiley Sons. New York. USA. 784 p.

Tocher, D. R., Mourente, G., Van Der Eecken, A., Evjemo, J. O., Diaz, E., Bell, J. G., I. Geurden, I., Lavens, P., Olsen, Y., 2002. Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.), halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Nutrition* 8(3), 195-207.

Wang, K., Wang, E., Qin, Z., Zhou, Z., Geng, Y., Chen, D., 2016. Effects of dietary vitamin E deficiency on systematic pathological changes and oxidative stress in fish. *Oncotarget* 7(51), 83869-83879.

Watanabe, T., Takeuchi, T., Matsui, M., Ogino, C., Kawabata, T., 1977. Effect of .ALPHA.-tocopherol deficiency on carp. VII. The relationship between dietary levels of linoleate and ALPHA.-tocopherol requirement. *Nippon Suisan Gakkaishi* 43, 935-946.

Whalan, J.E., 2015. Hematology Glossary. In: Whalan, J. E. (Ed.). *A Toxicologist's Guide to Clinical Pathology in Animals: Hematology, Clinical Chemistry, Urinalysis*. Springer International Publishing, Cham. Switzerland. pp. 109-143.

Wilfart, A., Garcia-Launay, F., Terrier, F., Soudé, E., Aguirre, P., Skiba-Cassy, S., 2023. A step towards sustainable aquaculture: Multiobjective feed formulation reduces environmental impacts at feed and farm levels for rainbow trout. *Aquaculture* 562, 738826.

Zeitoun, I.H., Ullrey, D.E., Magee, W.T., Gill, J.L., Bergen, W.G., 1976. Quantifying nutrient requirements of fish. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 33, 167-172.

Zhao, H., Ma, H.J., Gao, S.N., Chen, X.R., Chen, Y.J., Zhao, P.F., Lin, S.M., 2018. Evaluation of dietary vitamin E supplementation on growth performance and antioxidant status in hybrid snakehead (*Channa argus* × *Channa maculata*). *Aquaculture Nutrition* 24(1), 625-632.

Zhou, Q.C., Wang, L.G., Wang, H.L., Wang, T., Elmada, C.Z., Xie, F.J., 2013. Dietary vitamin E could improve growth performance, lipid peroxidation and non-specific immune responses for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture Nutrition* 19(3), 421-429.