تغــذیه آبزیــان
سال دوم، شماره دوم،
پاییز و زمستان ۱۳۹۵

تغییرات ایمونوگلوبولین M (IgM) پلاسما و شاخص‌های خون شناسی ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تزریق شده با DEHP

سهراب احمدی وند[1*]، سهیل ایگدری[2]، مظاهر زمانی گندمانی[1]
۱- گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
۲- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۴

چکیده
در این مطالعه اثرات پلاستی‌سایزر دی (۲-اتیل هگزیل) فتالات (DEHP) بر میزان ایمونوگلوبولین M پلاسما و پارامترهای خون شناسی ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در یک دوره آزمایش ۱۰ روزه مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور به یک گروه از ماهیان (گروه تیمار) DEHP به میزان ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن به همراه ۵۰۰ میکرولیتر روغن زیتون به عنوان حامل و گروه دیگر (کنترل) فقط ۵۰۰ میکرولیتر روغن زیتون در روزهای یک و پنج آزمایش پس از بیهوشی به صورت داخل صفاقی تزریق شدند. بر اساس نتایج، میزان IgM پلاسما تغییر معنی‌داری بین دو گروه نشان نداد. میزان گلبول‌های سفید و قرمز در گروه تزریق شده با گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان دادند. با این وجود در شمارش افتراقی گلبول‌های سفید تغییرات معنی‌داری در میزان لنفوسیت ها، نوتروفیل ها، ائوزینوفیل و مونوسیت‌ها بین دو گروه مشاهده نشد. همچنین نتایج مربوط به هموگلوبین، هماتوکریت، حجم میانگین سلولی، هموگلوبین میانگین سلولی، میانگین غلظت هموگلوبین سلول و هماتوکریت ماهیان تزریق شده با DEHP تغییر معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نشان ندادند. به طور کلی می‌توان عنوان کرد که DEHP می‌تواند با کاهش گلبول‌های سفید باعث کاهش ایمنی و متعاقباً افزایش حساسیت به بیماری‌ها گردد. همچنین مطالعه حاضر استفاده از لوکوسیت ها به عنوان بیومارکر جهت مطالعات ایمنوتوکسیکولوژی را تایید می‌نماید.

کلمات کلیدی: قزل‌آلا، DEHP، ایمونوگلوبولین M، شاخص‌های خون‌شناسی

* نویسنده مسئول: S_ahmadivand@ut.ac.ir

مقدمه

از مشخصه‌های اصلی تولیدمثل در ماهیان، تغییرات فصلی هورمون‌های استروئیدی پلاسما و پارامترهای ایمنی است که آنها را به حضور عوامل بیماری‌زا بسیار حساس می‌کند و این همبستگی تا حدی مربوط به نقش تنظیم کنندگی ایمنی توسط استروئیدهای جنسی است (Milla et al. 2011). بر اساس مطالعات انجام شده، مختل کننده های آندوکرینی با اختلال در فعالیت استروئیدهای جنسی و هموستازی ایمنی باعث افزایش قابلیت آسیب‌پذیری ماهیان به بیماری‌ها می‌شوند (Milla et al. 2011). اعتقاد بر این است که استروژن‌ها و آندروژن‌ها با میانجی‌گری در تکثیر لنفوسیت‌ها (اثر بر تعادل بین تکثیر/ آپوپتوزیس لنفوسیت ها) نقش مهمی در هموستازی خون ایفا می‌کنند. اگرچه مباحث متناقضی درباره آن گزارش شده است، اما به طور کلی تصور بر این است که آندروژن‌ها برخلاف استروژن‌ها که باعث برانگیختن تکثیر لنفوسیت‌ها و ترشح IgM می‌شوند، اثر منفی بر تکثیر لنفوسیت‌ها (Cook, 1994; Slater and Schreck, 1997; Saha et al. 2004; Ros et al. 2006) و ترشح IgM می‌گذارند (Hou et al. 1999; Saha et al. 2004). به علاوه تعداد گلبول‌های سفید با توجه به رابطه‌ای که با میزان استروئیدها دارد، به عنوان یک شاخص برای بررسی مطالعات ایمونوتوکسیکولوژی عنوان شده‌اند (Milla et al. 2011).

به‌طورکلی شاخص‌های خونی به‌عنوان یک شاخص مهم وضعیت فیزیولوژیک اندام‌های داخلی مطرح است و به عبارت دیگر، آنالیز خون از نظر پارامترهای خون‌شناسی و بیوشیمیایی در تشخیص بسیاری از بیماری‌ها، مطالعات سم‌شناسی و متابولیک و همچنین، کنترل روند زیستی موجودات زنده از جمله آبزیان از اهمیت به سزایی برخوردار است، به طوری‌که واکنش و تغییر شاخص‌های خونی در استرس‌های محیطی مختلف به عنوان شاخص زیستی مناسب برای ارزیابی وضعیت سلامت ماهی در پاسخ به آلودگی‌های مختلف شناخته شده‌اند (Docan et al. 2010).

از جمله مهم‌ترین مختل کننده‌های آندوکرینی، فتالات‌ها هستند که به‌رغم اثرات ضد آندروژنی آنها به‌عنوان انعطاف‌دهنده و نرم کننده‌های مواد پلاستیکی در بسیاری از تولیدات از جمله بسته‌بندی‌های مواد غذایی، تجهیزات پزشکی از جمله کیسه‌های خون و پلاسما، تجهیزات الکتریکی، وسایل آرایشی و رنگ‌ها به کار برده می‌شوند (Jobling et al. 1995; Bauer and Herrmann, 1997). میزان تولیدات جهانی که هم اکنون به طور وسیعی از فتالات‌ها استفاده می‌کنند، بیش از ۴ میلیون تن در سال است که حداقل ۲۵٪ آنها را DEHP (di(2-ethylhexyl) phthalate) به خود اختصاص داده است (Petrovic et al. 2001). دی (۲- اتیل هگزیل) فتالات (DEHP) به خاطر تولیدات بالای آن، از جمله فتالات‌های رایج در محیط‌های آبی است که در سال ۲۰۰۰ در فهرست ۳۳ ماده خطرناک آب‌های سطحی که باید کنترل شود قرار گرفت، به‌طوری‌که بیش از ۱۰۰ µg/L در آبهای سطحی و ۲۰۰ mg/kg در رسوبات گزارش شده است (Petrovic et al. 2001; Fromme et al. 2002). همچنین غلظت های متفاوتی از آن در بافت ماهیان وحشی آب شیرین اندازه‌گیری شده که بالاترین میزان گزارش شده ۲/۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بوده است (European Commission, 2003).

اگرچه بیشتر گونه های جانداران سریعاً از طریق شکافت آبکافتی DEHP را به MEHP[1] و 2-EH[2] تبدیل می‌کنند که با برهمکنش ۱۸۳ ژن/ پروتئین بین DEHP/MEHP در انسان و حیوانات همراه است (Singh and Li, 2011)، با وجود این، در غلظت‌های بالا مقداری از آن می‌تواند به صورت غیرمتابولیزه بازجذب شود (Wittassek and Angerer, 2008).

بنابراین، با توجه به اهمیت این ماده آلوده کننده بر روی ماهیان پرورشی به ویژه قزل‌آلای رنگین کمان که از جمله ماهیان عمده پرورشی در کشور ما است، مطالعه اثرات پلاستی‌سایزر DEHP بر میزان ایمونوگلوبولین M پلاسما و شاخص‌های خون‌شناسی ماهی قزل آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) اجرا شد.

[1] Monoethylhexyl phthalate
[2] 2-ethylhexanol

مواد و روش‌ها

این آزمایش در فصل تولیدمثل ماهی قزل آلای رنگین کمان (در اوایل آبان) انجام شد. برای انجام آن ماهیان نر قزل آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۶/۵ ± ۴۱۰ گرم از کارگاهی واقع در شمال ایران تهیه و به آزمایشگاه آبزیان دانشگاه تهران انتقال یافتند. ماهی‌ها برای سازگاری با شرایط آزمایشگاه، در مخزنی با حجم ۱۰۰۰ لیتر به مدت ۱۰ روز در شرایطی با ۰/۱ ± pH=۷/۹، دمای آب ۰/۹ ± ۱۶/۳ درجه سانتی‌گراد و اکسیژن محلول ۹-۷/۵ میلی گرم در لیتر نگهداری شدند. ماهی‌ها پس از سازگاری به ۲ مخزن هزار لیتری (هر مخزن ۲۰ عدد ماهی) برای انجام آزمایش‌ها انتقال یافتند. از ماهیان داخل مخزن به عنوان تکرار استفاده شد.

دوز استفاده شده DEHP بر اساس نتایج آزمایش‌های Cravedi و Perdu-Durand (۲۰۰۲) و Uren-Webster و همکاران (۲۰۱۰) تعیین شد. همچنین با توجه به همبستگی منفی میان IgM و استروئید اصلی جنس نر (تستوسترون) و اهمیت استفاده از گلبول‌های سفید به عنوان شاخص ارزیابی ترکیبات ضد آندروژنی مانند DEHP، این آزمایش به صورت زیر طراحی شد. به ماهیان یکی از مخازن (گروه تیمار)، دی (۲-اتیل هگزیل) فتالات (DEHP)، (Merck، آلمان) با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به همراه ۵۰۰ میکرولیتر روغن زیتون به عنوان حامل و گروه دوم (شاهد) فقط ۵۰۰ میکرولیتر روغن زیتون در روزهای یک و پنج آزمایش، پس از بیهوشی با عصاره پودر میخک، به‌صورت داخل صفاقی با استفاده از سرنگ ۲ میلی‌لیتر تزریق شد. این آزمایش به مدت ۱۰ روز اجرا شد و در ۳ نوبت (روزهای ۱، ۵ و ۱۰) از هر مخزن ۸-۶ ماهی به طور تصادفی نمونه‌برداری و برای سنجش ایمونوگلوبولین M و پارامترهای خون‌شناسی خون گیری از ساقه دمی آنها انجام شد.

میزان ایمونوگلوبولین M پلاسما با استفاده از کیت Biosystems S.A. (Barcelona, Spain) و روش توربیدی‌متریک اندازه‌گیری شد. شاخص‌های خونی شامل تعداد کل گلبول‌های سفید و شمارش افتراقی آنها، تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت و حجم میانگین سلولی (MCV)، میانگین غلظت هموگلوبین سلول (MCHC) و هموگلوبین میانگین سلولی (MCH) بر اساس روش‌های رایج خون‌شناسی ماهیان اندازه‌گیری شدند (Svobodova et al. 1991).

با توجه به اینکه آزمایش در فصل تولیدمثل انجام شد و میزان هورمون‌ها متعاقب سطح ایمنی ماهی به طور طبیعی در حال تغییر بود، نتایج آزمایش‌ها در هر زمان با شاهد مربوطه با استفاده از آزمون t-test مقایسه و سطح معنی‌داری ۵٪ در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ انجام شد.

نتایج

ایمونوگلوبولین M پلاسما (IgM)

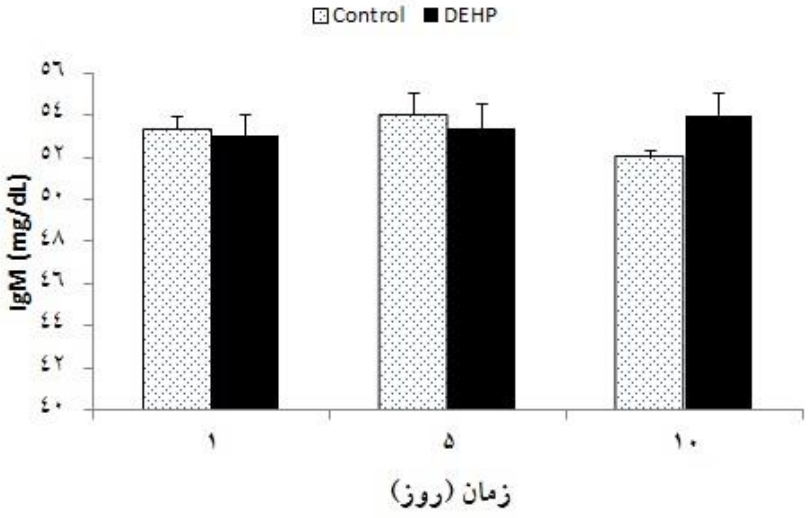
نتایج مربوط به تغییرات میزان ایمنوگلوبولین M پلاسما در شکل ۱ ارائه شده است. بر اساس نتایج، میزان ایمونوگلوبولین M پلاسما در ماهیان تزریق شده با ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم DEHP در مقایسه با شاهد تغییرات معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵).

شاخص‌های خونی

نتایج تعداد و شمارش افتراقی گلبول‌های سفید در شکل ۲ ارائه شده است. بر اساس نتایج، کاهش معنی‌داری در تعداد گلبول‌های سفید ماهیان تزریق شده با DEHP در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵). شمارش افتراقی گلبول-های سفید تغییرات معنـی‌داری را در میزان لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها و مونوسیت‌ها در ماهیان تزریق شده با DEHP در مقایسه با گروه شاهد نشان نداد (P>۰/۰۵).

داده‌های مربوط به تعداد گلبول‌های قرمز، MCV، MCH، MCHC، هموگلوبین و هماتوکریت در شکل ۳ ارائه شده است. بر اساس نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها، تعداد گلبول‌های قرمز ماهیان تزریق شده با DEHP کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند (P<۰/۰۵). با وجود این، مقایسه میانگین درصد هماتوکریت خون و هموگلوبین ماهیان تزریق شده با DEHP، در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵).

همچنین اختلاف معنی‌داری در میزان MCV، MCH و MCHC بین ماهیان تزریق شده با DEHP و نمونه‌های شاهد مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



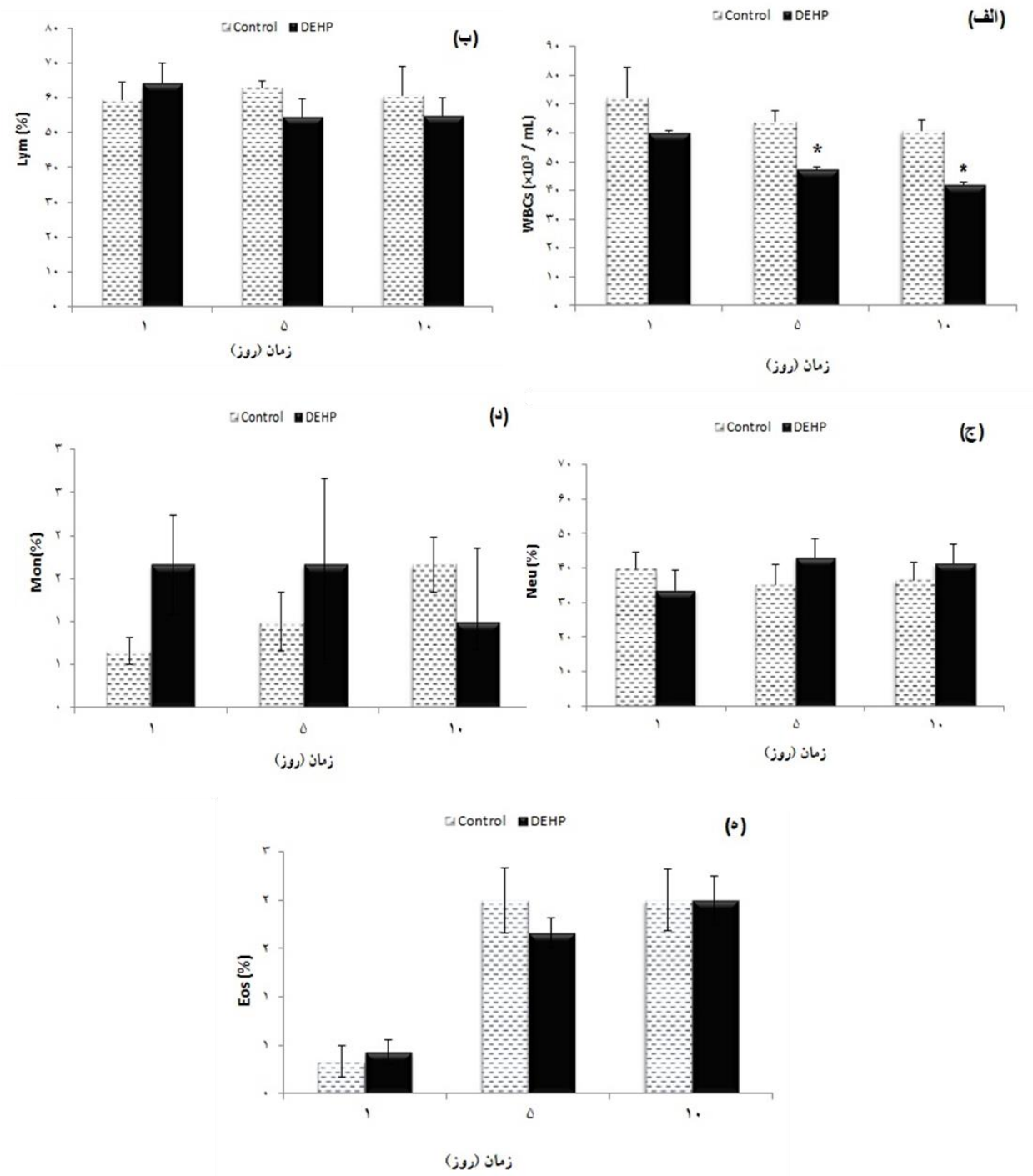
شکل ۱ - میزان ایمونوگلوبولین M پلاسمای ماهیان قزل آلای رنگین کمان تزریق شده با DEHP و گروه شاهد در دوره آزمایش.

بحث

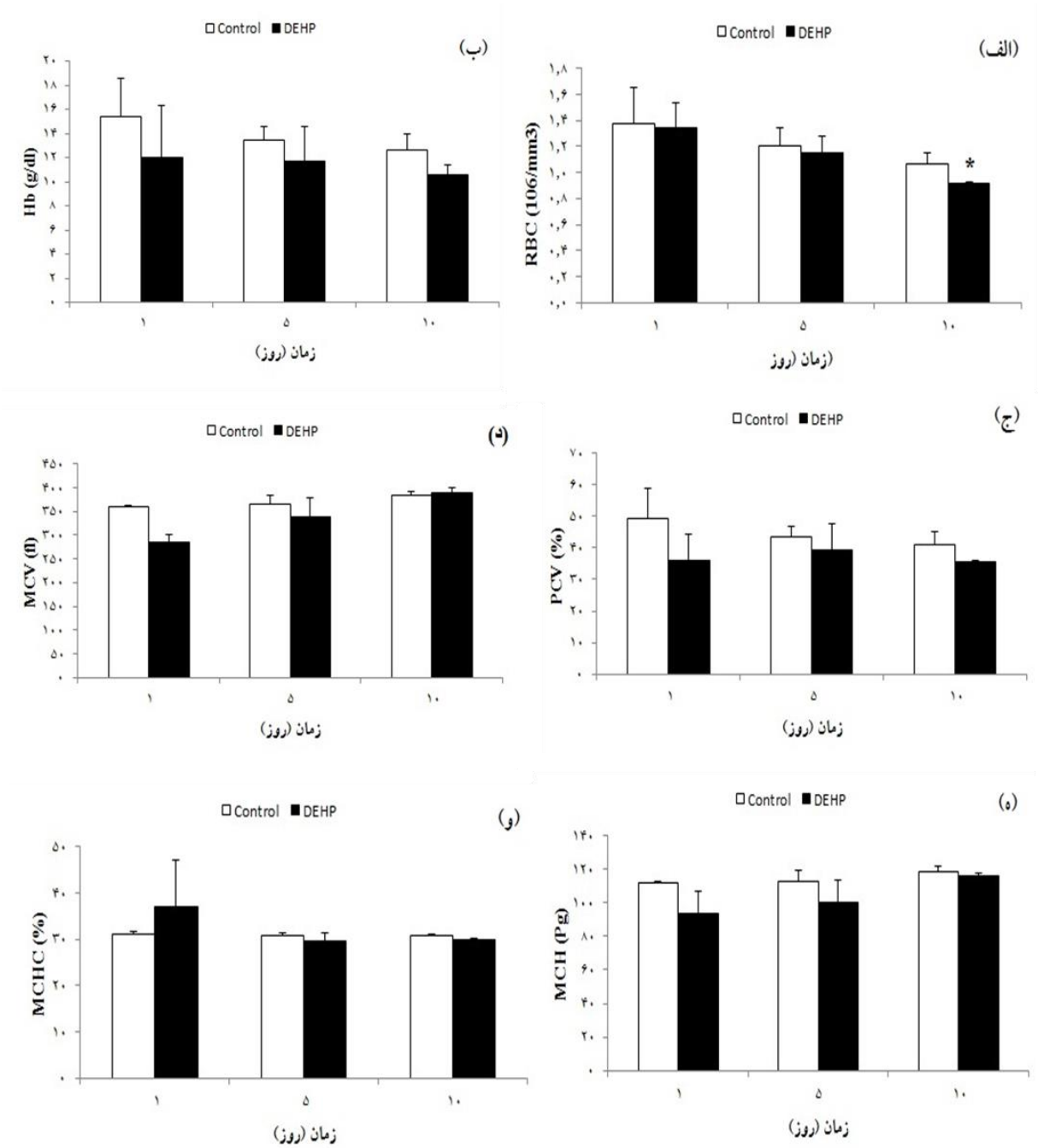
نتایج به دست آمده از این بررسی به تأثیر معنی‌دار DEHP بر میزان گلبول‌های سفید و قرمز در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان اشاره دارد. اگرچه، این ترکیب باعث تغییر معنی‌داری در دیگر شاخص‌های اندازه گیری شده از جمله IgM پلاسما و پارامترهای خونی دیگر نشد. عملکرد زیست‌شناختی DEHP بسیار شبیه به ترکیبات PPs (Peroxisome Proliferators) است که با افزایش تکثیر سلولی و سرکوب آپوپتوزیس مرتبط هستند (Rusyn et al. 2006). به علاوه، عملکرد ضد آندروژنی DEHP در بسیاری از مطالعات اثبات شده است (Jobling et al. 1995; Crago and Klaper, 2012; Ahmadivand et al. 2015). بر اساس مطالعات Ahmadivand و همکاران (۲۰۱۵)، DEHP از طریق توقف میوز با کاهش بیان ژن *boule* از طریق مسیر وابسته به تستوسترون و یا به وسیله IGF-1 به واسطه سیگنال دهی ERK1/2 در مسیر مستقل از تستوسترون باعث اختلال در اسپرماتوژنز می‌گردد. بعلاوه یک نوع تعادل و ارتباط خاص بین تعداد گلبول‌های سفید و استروئیدهای جنسی برای هموستاز ایمنی در ماهیان بالغ وجود دارد که با درنظرگیری اینکه ترکیبات ضد آندروژنی گلبول‌های سفید را هدف قرار می‌دهند (Milla et al. 2011)، کاهش تعداد گلبول‌های سفید مشاهده شده در این تحقیق را می‌توان به دلیل عملکرد ضد آندروژنیDEHP عنوان کرد. اگرچه تغییر معنی‌داری در میزان دیگر پارامترهای ایمنی ازجمله IgM و گلبول‌های سفید مختلف شامل لنفوسیت، نوتروفیل، ائوزینوفیل و مونوسیت مشاهده نشد.

در ماهیان عمدتاً گلبول‌های قرمز به عنوان شاخص در معرض قرارگیری مواد سمی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Bombail et al. 1998; Mitchelmore and Chipman, 2001). این سلول‌ها با توجه به نقشی که در انتقال اکسیژن توسط هموگلوبین و همچنین مصرف اکسیژن دارند، به‌عنوان منبع اصلی تولید ROS شناخته شده‌اند. به علاوه از آنجا که مواد شیمیایی سمی جذب و سپس از طریق جریان خون منتقل می‌شوند، در تماس مستقیم با گلبول قرمز قرار می‌گیرند (Guilherme, 2010). در مطالعه حاضر، تزریق DEHP باعث کاهش معنی‌دار گلبول‌های قرمز شد که می‌تواند به دلیل پاسخ جبرانی به کاهش ظرفیت حمل اکسیژن باشد تا به پایداری انتقال گازها کمک کند و همچنین می‌تواند نشان‌دهنده تغییر در تیغه های

آبششی برای مبادله گازی بین خون و محیط آب باشد (Jee et al. 2005). البته کاهش تعداد گلبول‌های قرمز می‌تواند به دلیل کاهش سنتز و یا تخریب این سلول‌ها نیز باشد (Reddy and Bashamohideen, 1989).



شکل ۲- تعداد کل گلبول‌های سفید (الف) و درصد لنفوسیت (ب)، نوتوفیل (ج)، مونوسیت (د) و ائوزینوفیل (ه) ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان تزریق شده با DEHP و گروه شاهد. *معنی دار بودن در سطح P<۰/۰۵.



شکل ۳- تعداد گلبول‌های قرمز (الف)، هموگلوبین (ب)، هماتوکریت (ج)، حجم میانگین سلولی (MCV) (د)، هموگلوبین میانگین سلولی (MCH) (ه) و میانگین غلظت هموگلوبین سلول (MCHC) (و) ماهیان قزل آلای رنگین کمان تزریق شده با DEHP و گروه شاهد. *معنی‌دار بودن تفاوت در سطح P<۰/۰۵.

در مطالعه حاضر، اگرچه میزان هموگلوبین کمی کاهش یافته بود، اما تغییر معنی‌داری نشان نداد. همچنین نتایج مربوط به MCV، MCH و MCHC و هماتوکریت ماهیان تزریق شده با DEHP تغییر معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد نشان ندادند. به نظر می‌رسد چون تیمار به صورت تزریق انجام شده، ممکن است بافت تنفسی کمتر آسیب دیده و میزان هموگلوبین و شاخص‌های مربوط به گلبول‌های قرمز نیز دچار تغییرات کمتر شده باشند، اگرچه کوتاه بودن زمان آزمایش و غلظت DEHP نیز می‌توانند از دیگر دلایل باشند. به‌طورکلی می‌توان عنوان کرد که DEHP می‌تواند با کاهش گلبول‌های سفید باعث کاهش ایمنی و متعاقباً افزایش حساسیت به بیماری‌ها شود. همچنین مطالعه حاضر استفاده از گلبول‌های سفید به‌عنوان شاخص زیستی ایمونوتوکسیکولوژی را تایید می‌کند.

به علاوه از آنجا که ترکیب با مواد پلاستیکی باندهای شیمیایی ایجاد نمی‌کند (Jobling et al. 1995; Bauer and Herrmann, 1997; Staples et al. 1997) می‌تواند به راحتی از آنها جدا و در محیط آزاد شود و پس از ورود به آب‌های سطحی، موجودات آبزی مختلف در ستون‌های آبی، رسوبات و هنگام تغذیه در معرض آن قرار می‌گیرند و به این ترتیب، وارد زنجیره غذایی می‌شود که نهایتاً به انسان ختم می‌شود. بنابراین، مطالعات بیشتر برای ارزیابی اثرات نامطلوب این ترکیب بر ماهی و دیگر آبزیان پیشنهاد می‌شود.

منابع

Ahmadivand, S., Farahmand, H., Teimoori-Toolabi, L., Mirvaghefi, A., Eagderi, S., Geerinckx, T., Shokrpoor, S., Rahmati-Holasoo, H. 2015. *Boule* gene expression underpins the meiotic arrest in spermatogenesis in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to DEHP and butachlor. General and Comparative Endocrinology. In press.

Bauer, M.J., Herrmann, R. 1997. Estimation of the environmental contamination by phthalic acid esters leaching from household wastes. Science of the Total Environment 208: 49-57.

Bombail, V., Aw, D., Gordon, E., Batty, J. 2001. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnelus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. Chemosphere 44: 383-392.

Crago, J., Klaper, R. 2012. A mixture of an environmentally realistic concentration of a phthalate and herbicide reduces testosterone in male fathead minnow (*Pimephales promelas*) through a novel mechanism of action. Aquatic Toxicology 110-111: 74-83.

Cravedi, J.P., Perdu-Durand, E. 2002. The phthalate diesters DEHP and DBP do not induce lauric acid hydroxylase activity in rainbow trout. Marine Environment Research 54: 787-791.

Cook J. 1994. The effects of stress, background colour and steroid hormones on the lymphocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ph.D. Thesis, University of Sheffield.

Docan A., Cristea V., Grecu I., Dediu L. 2010. Haematological response of the European catfish, *Silurus glanis* reared at different densities in “flow-through” production system. Archiva Zootechnica, 13: 63-70.

European Commission. 2003. EU Risk Assessment Report for 1, 2-Benzenedicarboxylic Acid, Di-C9-11-Branched Alkyl Esters, C10 Rich and Di-“Isodecyl” Phthalate (DIDP), vol. 36. European Chemicals Bureau.

Fromme, H., Küchler, T., Otto, T., Pilz, K., Müller, J., Wenzel, A. 2002. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. Water Research 36: 1429-1438.

Guillette, L.J., Gunderson, M.P. 2001. Alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to

endocrine-disrupting contaminants. Reproduction 122: 857-864.

Hou, Y., Suzuki, Y., Aida, K. 1999. Effects of steroid hormones on immunoglobulin M (IgM) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish Physiology and Biochemistry 20: 155-162.

Jee, J.H., Masroor, F., Kang, J.C. 2005. Responses of cypermethrin-induced stress in haematological parameters of Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). Aquaculture Research 36: 898-905.

Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M.G., Sumpter, J.P. 1995. A variety of environmentally persistent chemicals including some phthalate plasticizers are weakly estrogenic. Environmental Health Perspectives 103: 582-587.

Milla, S., Depiereux, S., Kestemont, P. 2011. The effects of estrogenic and androgenic endocrine disruptors on the immune system of fish: a review. Ecotoxicology 20: 305-319.

Mitchelmore, C.L., Chipman, J.K. 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. Mutation Research 399: 135-147.

Petrovic, M., Eljarrat, E., López de Alda, M.J., Barceló, D. 2001. Analysis and environmental levels of endocrine-disrupting compounds in freshwater sediments. TrAC Trends in Analytical Chemistry 20: 637-648.

Reddy, P.M., Bashamohideen, M. 1989. Fenvalerate and cypermethrin induced changes in the haematological parameters of *Cyprinus carpio*. Acta Hydrochimica et Hydrobiologica 17: 101-107.

Ros, A.F.H., Ferreira, C., Serrao, Santos, R., Oliveira, R.F. 2006. Regulation of immunocompetence by different androgen metabolites in a blenny with alternative reproductive tactics. Journal of Experimental Zoology 305: 986-994

Rusyn, I., Peters, J.M., Cunningham, M.L. 2006. Modes of action and species specific effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate in the liver. Critical Reviews in Toxicology 36: 459-479.

Saha, N.R., Usami, T., Suzuki, Y. 2004. In vitro effects of steroid hormones on IgM-secreting cells and IgM secretion in common carp (*Cyprinus carpio*). Fish and Shellfish Immunology 17: 149-158.

Singh, S., Li, S.S.L. 2011. Phthalates: toxicogenomics and inferred human diseases. Genomics 97: 148-157.

Slater, C.H., Schreck, C.B. 1997. Physiological levels of testosterone kill salmonid leukocytes in vitro. General and Comparative Endocrinology 106: 113-119.

Staples, C.A., Peterson, D.R., Parkerton, T.F., Adams, W.J. 1997. The environmental fate of phthalate esters: a literature review. Chemosphere 35: 667-749.

Svobodova, Z., Pravda, D., Palackova, J. 1991. Unified methods of haematological examination of fish. Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, Vodnany, Methods No. 20, 31 p.

Uren-Webster, T.M., Lewis, C., Filby, A.L., Paull, G.C., Santos, E.M. 2010. Mechanisms of toxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate on the reproductive health of male zebrafish. Aquatic Toxicology 99: 360-369.

Wittassek, M., Angerer, J. 2008. Phthalates: metabolism and exposure. International Journal of Andrology 31: 131-138.

Effects of injection of DEHP on immunoglobulin M (IgM) and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Sohrab Ahmadivand[1*], Soheil Eagderi[2], Mazaher Zamani Gandomani[1]
1- Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2- Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Received 10 April 2016; accepted 14 September 2016

Abstract
The effects of the plasticizer di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) were evaluated on immunoglobulin M (IgM) and hematological parameters in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) for a 10-day experimental period. For this purpose, treatment fish were intraperitoneally injected with 50 mg/kg DEHP along with 500 µL carrier, i.e. olive oil and control one only with 500 µL carrier at 1 and 5 days of experiment after anesthetizing. Based on the results, no significant difference was found between DEHP and control groups regarding IgM levels ($P>0.05$). The results showed that erythrocyte count and white blood cells were significantly lower in fish exposed to DEHP compared to those of control fish ($P<0.05$). However, no significant difference was observed in lymphocyte, neutrophils, eosinophils, monocyte, hematocrit, MCHC, MCH and MCV values between the DEHP treatment and control group ($P>0.05$). In conclusion, our findings suggest adverse effects of DEHP on the immune system which may lead to an increase in disease susceptibility also verify that leukocyte counts can be considered as a novel biomarker of immunotoxicity.

Keywords: Trout, DEHP, IgM, Hematological indices

*Corresponding author: s_ahmadivand@ut.ac.ir