



Study on The Pathological Effects of Tobacco Extracts on Rainbow Trout Fry (*Oncorhynchus mykiss*)

Abdolali Movahedinia¹, Mohsen Heydari², Saba Hosseini³, Zeinab Yaqoubi⁴, Zahra Amini⁴, Elham Pourmaafi Esfahani⁵

¹Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

²Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

³Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

⁴Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran

⁵Science and Research Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran



10.22059/jvr.2019.221635.2547

J Vet Res. 74(3): 380-386

Abstract

BACKGROUND: Tobacco (*Nicotiana tabacum*) is a plant with piscicidal and fertilizing properties.

OBJECTIVES: In this study the effect of different concentrations (0.1, 1, 10 and 100mg/l) of hydro-alcoholic extracts of tobacco has been examined on different tissues of Rainbow trout.

METHODS: Samples from liver, kidney and gill of Rainbow trout were stained with hematoxylin and eosin and studied under light microscopy.

RESULTS: Various histopathological lesions were observed in the liver of Rainbow trout exposed to different concentrations of tobacco. The results showed that with increase in concentrations of tobacco up to 10 and 100mg/l, bloodshed increased and hepatocytes lost their continuity and showed discontinuity mood. Lamellar aneurysm, bleeding and leukocytes infiltration, clubbing at the end of the lamellae, hyperplasia of secondary lamellar epithelium, epithelial lifting of secondary lamellae and creating an edematous space, lamellar shortening, vacuolation and lamellar fusion were the more abundant branchial lesions after exposure to tobacco. Separating the epithelium from basement membrane, hypertrophy, glomerular capillary dilation and tubular degeneration were observed in renal tissues in all treatments. At higher concentrations of tobacco (10 and 100mg/l), renal tubular necrosis was also observed. According to the results liver of rainbow trout showed a few histopathological alteration following exposure to tobacco extracts. Unlike the liver, gills of rainbow trout due to direct contact with pollutants showed more lesions.

CONCLUSIONS: Tobacco extract has more pathological effects on gills in comparison with liver and kidney of Rainbow trout due to direct contact with the dissolved pollutant.

Keywords: Tobacco, Ecophysiology, Histopathology, Toxicology, *Oncorhynchus mykiss*

Copyright © 2019. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: heydari_mohsen84@yahoo.com Tel: 011-35305113 Fax: 011-35302921

How to cite this article:

Movahedinia, A., Heydari, M., Hosseini, S., Yaqoubi, Z., Amini, Z., & Pourmaafi Esfahani, H. (2019). Study on The Pathological Effects of Tobacco Extracts on Rainbow Trout Fry (*Oncorhynchus mykiss*). *J Vet Res*, 74(3), 380-386. doi:10.22059/jvr.2019.221635.2547

Figure Legends and Table Captions

Table 1. The values of physicochemical parameters of the water used during the experiments

Figure 1. Normal liver tissue structure of Rainbow trout in the control group. Sinusoid (red arrow), Hepatocyte (cut red arrow) (725×; H & E).

Figure 2. Photomicrographs of hepatic tissues of Rainbow trout exposed to tobacco. Degeneration of liver cells (white arrow), space expansion platter (black arrow), bleeding (cut black arrow) (725× H & E).

Figure 3. Normal branchial tissues of Rainbow trout in the control group. Gill filament (red arrow), secondary lamellae (red double arrow) (725×; H & E).

Figure 4. Photomicrographs of branchial tissues of Rainbow trout exposed to tobacco. Hemorrhage and accumulation of leukocyte (Black Star), stick form end of blades (curved black arrow), hyperplasia (cut black arrow), basement membrane detachment and created edematous (blue arrow), aneurysm (arrow water withdrawal), lamellar fusion (curved arrow ends), vacuolation (black arrow) (725 ×; H & E).

Figure 5. Normal kidney tissue of Rainbow trout in the control group. Renal corpuscle (red arrow), urinary tube (white arrow), connective tissue scaffolding (Black Star) (725×; H & E).

Figure 6. Photomicrographs of renal tissues in Rainbow trout exposed to tobacco. Epithelial lifting from basement membrane (cut black arrow), hypertrophy and dilation of glomerular capillaries (cut yellow arrow), tubules necrosis (hollow circle), degeneration of tubules (black arrow) (725 ×; H & E).



مطالعه اثرات پاتولوژیک ناشی از عصاره تنباکو بر بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

عبدالعلی موحدی‌نیا^۱، محسن حیدری^۲، صبا حسینی^۳، زینب یعقوبی^۴، زهرا امینی^۴، الهام پورمعافی اصفهانی^۵

^۱گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

^۲گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۳گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

^۴گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

^۵واحد علوم و تحقیقات یزد دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران

doi 10.22059/jvr.2019.221635.2547

تاریخ دریافت: ۲۴ دی ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: ۱۵ اردیبهشت ۱۳۹۸ تاریخ انتشار آنلاین: ۱ شهریورماه ۱۳۹۸

چکیده

زمینه مطالعه: گیاه تنباکو با نام علمی *Nicotiana tabacum* گیاهی با اثرات سمی برای ماهیان است.

هدف: در این مطالعه به بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی تنباکو (۱/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم برلیتر) بر بافت‌های مختلف ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرداخته شده است.

روش کار: نمونه‌های گرفته شده از کبد، کلیه و آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شده و مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: ضایعات هیستوپاتولوژیکی مختلفی در کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با غلظت‌های مختلف تنباکو قابل مشاهده بود. با افزایش غلظت تنباکو به ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم برلیتر، خونریزی افزایش یافته و بافت هیپاتوسیت پیوستگی خود را از دست داده و حالت گسستگی را نشان می‌دهد. اتساع عروقی، خونریزی و تجمع لوکوسیتی، چماقی شدن انتهای تیغه‌ها، هیپرپلازی، جدا شدن غشای پایه و ایجاد فضای ادمی، کوتاه شدن لاملاها، واکونولاسیون و اتصال تیغه‌های ثانویه از جمله ضایعات مشاهده شده در آبشش ماهی قزل‌آلای در مواجهه با تنباکو بود. جدا شدن اپیتلیوم از غشای پایه، هیپرتروفی، اتساع مویرگ‌های گلوبولوی و دژنره شدن لوله‌های ادراری نیز از جمله ضایعات مشاهده شده در کلیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در همه تیمارهای تنباکو است. در غلظت‌های بالاتر تنباکو یعنی ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم برلیتر، نکروز لوله‌های ادراری نیز قابل مشاهده بود. به طور کلی نتایج هیستوپاتولوژیک کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با تیمارهای مختلف تنباکو عوارض چندانی از تغییرات هیستوپاتولوژیکی را نشان نداد.

نتیجه‌گیری نهایی: بر خلاف کبد و کلیه، آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به دلیل ارتباط مستقیم با آلاینده، عوارض پاتولوژیکی بیشتری را در مواجهه با تنباکو نشان داد.

کلمات کلیدی: تنباکو، اکوفیزیولوژی، هیستوپاتولوژی، سم شناسی، *Oncorhynchus mykiss*

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: محسن حیدری، گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

پست الکترونیکی: heydari_mohsen84@yahoo.com

مقدمه

از پودر برگ این گیاه به منظور از بین بردن موجودات شکارگر و نیز علف‌ها در استخرهای ماهی قبل از ماهی‌دار کردن استخر استفاده شده است (۱۱). تنباکو همچنین در مصارف پزشکی به عنوان یک داروی ضد اسپاسم، مدر، قی آور، خلط آور، مسکن و بزاق آور مورد استفاده می‌گیرد. گیاهان بسیاری حاوی نیکوتین هستند اما تنباکو بیش از هر گیاه دیگری حاوی این ماده می‌باشد که به میزان ۲ تا ۵ درصد در برگ

تنباکو برگ‌های خشکیده گیاه *Nicotiana tabacum* است که در اصل در آمریکای شمالی و جنوبی رشد می‌یافت ولی امروزه در بسیاری از نقاط جهان کشت می‌شود. این گیاه به عنوان محصولات کشاورزی از برگ‌های جنس *Nicotiana* به عمل آورده می‌شود. عصاره تنباکو یک ترکیب گیاهی است که انتظار می‌رود به آسانی در محیط تجزیه شود و اثرات سوء زیست محیطی نیز نداشته است (۲۴). استفاده

حلال عصاره‌های حاصله توسط دستگاه لیوفیلیزه شد و تا زمان شروع مراحل آزمایش درون یخچال قرار گرفت.

مواجهه بچه ماهی قزل آلابی رنگین کمان با عصاره تنباکو، در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سرد آبی شهید مطهری یاسوج انجام گرفت. برای این منظور ۱۵۰ قطعه بچه ماهی قزل آلابی رنگین جهت سازگار شدن با شرایط محیط به مدت یک هفته در وان‌های سالن ونیرو این مرکز نگهداری شدند. در این مدت ضمن هوادهی مناسب، غذادهی توسط پلت (روزانه به ازای ۰/۰۲ وزن بدن) صورت گرفت. تغذیه بچه ماهیان ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش سمیت حاد متوقف شد (۵). پارامترهای موثر فیزیوشیمیایی آب شامل pH، اکسیژن محلول و دما به طور روزانه ثبت گردید. بعد از تعیین محدوده کشندگی آزمایش نهایی سمیت حاد عصاره تنباکو بر بچه ماهی قزل-آلابی رنگین کمان برای بررسی سمیت این گیاه از چهار تیمار (غلظت-های ۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر) آب تانک‌های حاوی ماهی زنده و یک گروه کنترل (شاهد) استفاده شد. در هر تیمار ۳۰ عدد ماهی (با میانگین وزنی ۵/۵±۰/۱۴ گرم) درون آکواریوم‌های ۶۰ لیتری محتوی ۴۰ لیتر آب که از قبل هوادهی شده بود قرار داده شد. ماهیان تلف شده از محیط آکواریوم به محض مشاهده جمع آوری و تعداد تلفات ماهی‌ها در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت و ۹۶ ساعت محاسبه و ثبت گردیدند. نمونه‌های اخذ شده از کبد، کلیه و آبشش ماهی قزل آلابی رنگین کمان را ابتدا به مدت یک هفته در فرمالین ۱۰ درصد و سپس به الکل ۷۰ درصد منتقل گردید. سایر مراحل معمول پاسز یافتی با استفاده از دستگاه هیستوکینت (tissue tek rotary, RX-11B) صورت گرفت. در ادامه برای قالب گیری نمونه‌ها از قالب های لوکهارت استفاده گردید. پس تریم کردن قالب ها، توسط دستگاه روتاری میکروتوم (Leica-2245) برش هایی با ضخامت ۵ میکرومتر تهیه گردید (۱۳). سپس لام های رنگ آمیزی شده با رنگ همتوکسیلین و ائوزین با استفاده از میکروسکوپ نوری Olympus و با بزرگنمایی های متفاوت بررسی و تصاویر مناسب توسط دوربین نصب شده بر روی میکروسکوپ Dinolight Digital Microscope و سیستم رایانه ای متصل به دوربین مجهز به نرم افزار Dino capture تهیه و ذخیره شد. در نهایت نتایج پاتولوژیک و تغییرات هیستوپاتولوژیکی در بافت مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

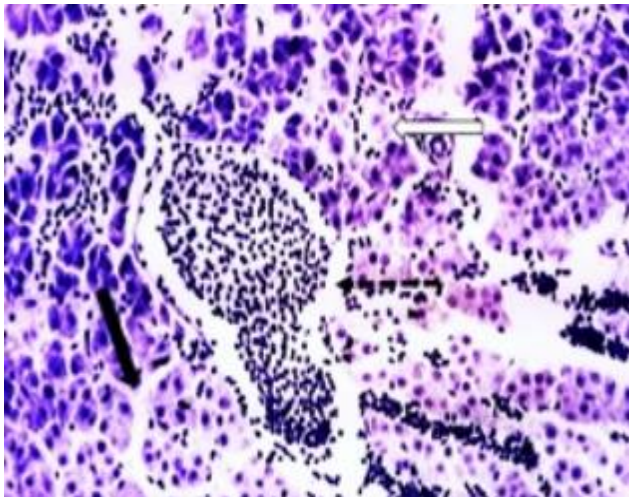
داده‌های در طی انجام آزمایش فاکتورهای فیزیوشیمیایی (pH، دما و اکسیژن محلول) آکواریوم‌ها بطور روزانه سنجیده و ثبت گردید (جدول ۱).

خشک آن یافت می شود. مهره داران و بی مهرگان هر دو گروه دارای گیرنده‌های نیکوتینی با ساختار و فعالیت مشابهی هستند اما می‌توانند ویژگی‌های فیزیولوژیکی و فارماکولوژیکی متفاوتی داشته باشند و نیکوتین احتمالاً می‌تواند موجب سمیت و ایجاد آسیب و صدمات در مهره داران شود (۴). نیکوتین با اثر بر گیرنده استیل-کولین باعث شلی عضلانی می‌گردد (۱۵).

ماهیان یکی از مهمترین موجودات آبی هستند که به علت اهمیت اکولوژیکی، اقتصادی و حساسیت در مقابل آلاینده‌ها به طور گسترده در آزمایشات زیست سنجی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۹). ممکن است گونه‌های مختلف ماهیان نسبت به یک آلاینده یا سم خاص، عکس العمل متفاوتی را از خود نشان دهند. از اینرو در سم شناسی، آزمایشات بر روی ماهیان مختلفی صورت می‌پذیرد تا تاثیراتی که یک آلاینده یا سم می‌تواند بر روی موجودات زنده داشته باشد در بعد وسیعی مورد ارزیابی قرار گیرد. (۲۰). انتخاب یک گونه برای انجام یک آزمایش به در دسترس بودن گونه، سهولت پرورش و حمل و نقل آنها بستگی دارد (۹،۱۴). یکی از عوامل تاثیرگذار در مسمومیت آبیان عامل زمان است. به عبارتی هنگامی که ماهی در معرض غلظت ثابتی از سم قرار بگیرد، به مرور زمان هم مقاومت ماهی تحلیل رفته و هم سم فرصت بیشتری برای تاثیر گذاری روی ماهی را دارد. علاوه بر این در مواردی تجمع سم در بافت‌های ماهی نیز باعث افزایش تاثیر سوء آن بر بدن ماهی (۶) و در مدت ۹۶ ساعت انجام آزمایش‌ها موجب پایین آمدن LC₅₀ می‌شود. مطالعات بسیاری استفاده از نشانگرهای زیستی هیستوپاتولوژیک در اندام‌هایی نظیر کبد، کلیه و آبشش در مواجهه با آلاینده‌های مختلف را مورد بررسی قرار داده است (۲۵، ۲۱، ۱۹، ۱۶، ۱۲، ۳، ۷). بنابراین به نظر می‌رسد که مطالعات هیستوپاتولوژیک می‌تواند ابزار مناسبی جهت بررسی اثر آلاینده‌های محیطی بر آبیان به خصوص ماهی باشد. بدین منظور این مطالعه به بررسی تاثیرات هیستوپاتولوژیک عصاره هیدروالکلی تنباکو بر بافت‌های کبد، کلیه و آبشش در بچه‌ماهی قزل آلابی رنگین کمان پرداخته است.

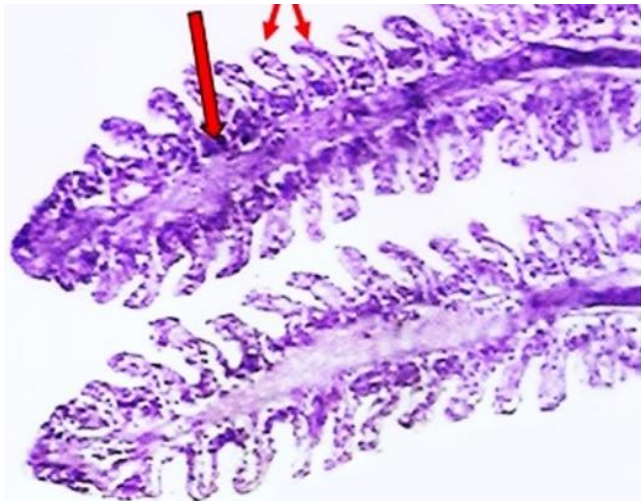
مواد و روش کار

عصاره‌گیری: گیاه تنباکو پس از تهیه از بازار شهر یاسوج به وسیله آسیاب برقی به پودر تبدیل شد. پودر حاصله به نسبت (W/V) ۱/۲۰ در آب مقطر ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری و هر چند مدت یکبار به هم زده می‌شوند. بعد از رد کردن از صافی عصاره‌های حاصل به منظور خروج حلال در تبخیر کننده گردان (روتاری) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (۲۲). پس از خروج



تصویر ۲. تصاویر میکروسکوپ نوری بافت کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با تنباکو. دژنه شدن سلول‌های کبدی (پیکان سفید)، اتساع فضای دیس (پیکان سیاه)، خونریزی (پیکان منقطع سیاه) (H&E ×۷۲۵)

آبشش: در نمونه‌های اخذ شده از آبشش ماهیان گروه کنترل ضایعات هیستوپاتولوژیکی مشاهده نگردید و آبشش از ساختار طبیعی برخوردار بود. رشته‌های آبششی به صورت عمود بر کمان آبششی قرار داشته و همچنین تیغه‌های آبششی عمود بر رشته‌ها مشاهده گردید. (تصویر ۳).



تصویر ۳. ساختار بافت طبیعی آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در گروه کنترل. تیغه آبششی نخستین (پیکان قرمز)، تیغه‌های ثانویه (پیکان دو سرقرمز) (H&E ×۷۲۵)

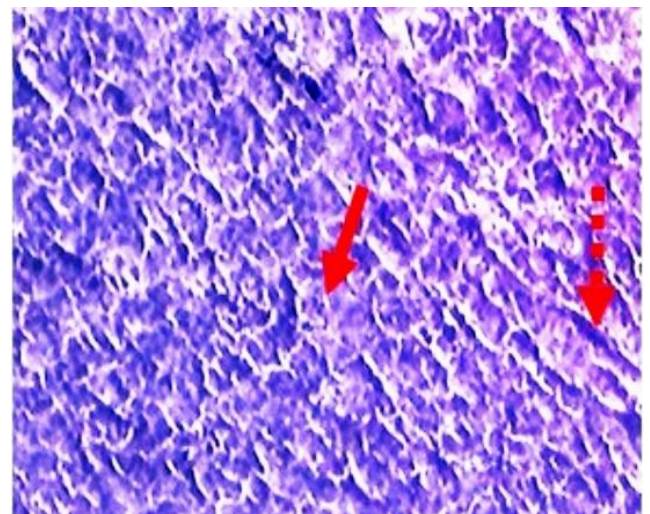
ضایعات هیستوپاتولوژیکی مختلفی در آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با غلظت‌های مختلف تنباکو قابل مشاهده بود. اتساع عروقی، خونریزی و تجمع لوکوسیتی، چماغی شدن انتهای تیغه‌ها، هیپرپلازی، جدا شدن غشای پایه، ایجاد فضای ادماتوزه و کوتاه شدن لاملاها از جمله ضایعات مشاهده شده در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تنباکو می‌باشد. در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر نیز عوارضی

جدول ۱. مقادیر پارامترهای فیزیوشیمیایی آب مورد استفاده طی انجام آزمایش‌ها

پارامتر	مقدار
دما (°C)	۱۳/۱۱±۰/۹۵
pH	۷/۴۳±۰/۱۴
اکسیژن محلول (mg/lit)	۸/۱۹±۰/۲۹

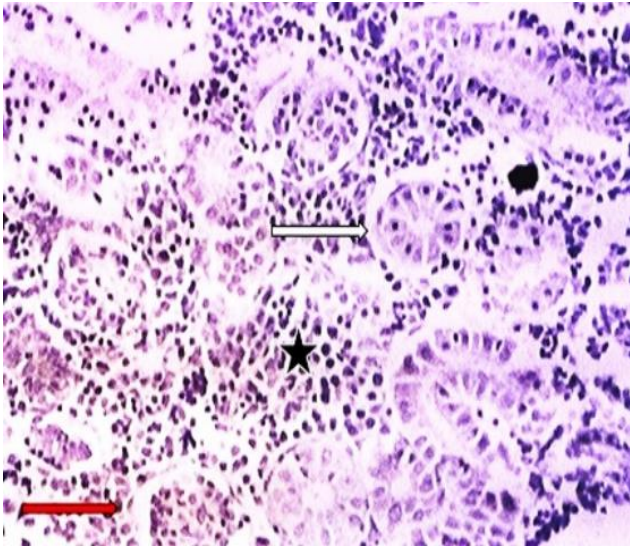
ضایعات هیستوپاتولوژیکی

کبد: در مطالعه حاضر هیچ‌گونه عوارض جدی بافتی در نمونه‌های اخذ شده از کبد ماهیان گروه کنترل مشاهده نگردید و ساختار طبیعی کبد شامل هیاتوسیت‌ها با سیتوپلاسم صورتی دانه‌دار و هسته مدور مرکزی، سینوزوئیدها، مویرگ‌های خونی نامنظم تعدادی سلول‌های کوپفر که وظیفه تصفیه خون را بر عهده دارند، وجود داشت. فضای دیس نیز در میان هیاتوسیت‌ها و سینوزوئیدها دیده می‌شد (تصویر ۱).

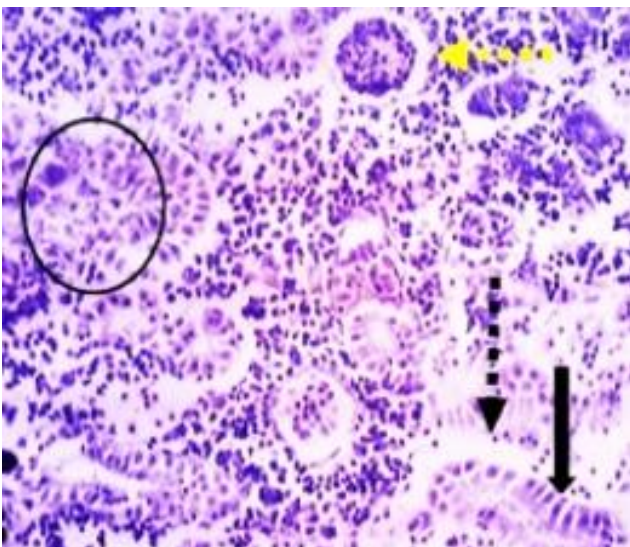


تصویر ۱. ساختار بافت طبیعی کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در گروه کنترل. سینوزوئید (پیکان قرمز)، هیاتوسیت (پیکان منقطع قرمز) (H&E ×۷۲۵)

ضایعات هیستوپاتولوژیکی مختلفی در کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با غلظت‌های مختلف تنباکو قابل مشاهده بود. علاوه بر مشاهده عوارضی چون خونریزی و اتساع فضای دیس، عارضه دژنه شدن سلول‌های کبدی نیز از جمله ضایعات مشاهده شده در تیمار تنباکو با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بود. در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر دژنه شدن بافت کبدی بیشتر قابل مشاهده می‌باشد. با افزایش غلظت تنباکو به ۱۰ میلی‌گرم در لیتر و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر خونریزی افزایش یافته و بافت هیاتوسیت پیوستگی خود را از دست داده و حالت گسستگی را نشان می‌دهد (تصویر ۲).



تصویر ۵. ساختار بافت طبیعی کلیه ماهی قزل آلی رنگین کمان در گروه کنترل. جسمک کلیوی (پیکان قرمز)، لوله‌های ادراری (پیکان سفید)، بافت همبند داربستی (ستاره سیاه) (H&E ×۷۲۵)

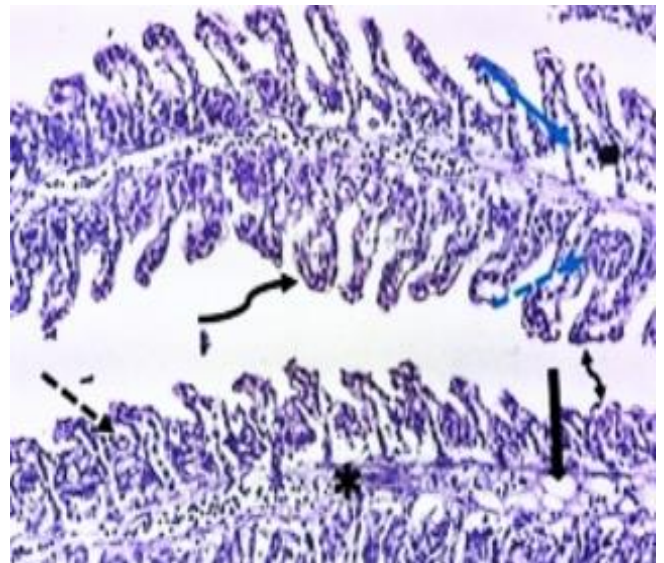


تصویر ۶. تصاویر میکروسکوپ نوری بافت کلیه ماهی قزل آلی رنگین کمان در مواجهه با تنباکو. جدا شدن اپیتلیوم از غشای پایه (پیکان منقطع سیاه)، هیپرتروفی و اتساع مویرگ گلومرولی (پیکان منقطع زرد)، نکروز لوله‌های ادراری (دایره توخالی)، دژنره شدن لوله‌های ادراری (پیکان سیاه) (H&E ×۷۲۵)

بحث

وظایفی چون متابولیسم مواد خارجی و انجام پروسه‌هایی از قبیل نقل و انتقالات بیولوژیکی، کبد را به یکی از مهمترین اندام‌های موجود در بدن جانداران مبدل کرده است (۱۸). کبد نسبت به انواع آلودگی‌ها از حساسیت بالایی برخوردار بوده و این حساسیت می‌تواند به شکل صدمات و آسیب‌های بافتی منعکس گردد. بنابراین تغییر در ساختار کبد می‌تواند در ارزیابی سلامت ماهیان حائز اهمیت باشد. در مطالعه حاضر تاثیر غلظت‌های مختلف تنباکو در مواجهه با

چون واکوئولاسیون ظهور پیدا کرده است و علاوه بر ضایعات مذکور در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، اتساع عروقی و خونریزی نیز با شدت بیشتری قابل مشاهده می‌باشند. آنوریسم و اتصال لاملاهای مجاور (لاملار فیوژن) نیز در تیمار تنباکو با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شده و هیپرپلازی در این تیمار از گسترش بیشتری برخوردار بوده است. اتصال لاملاهای مجاور از جمله بارزترین عوارض مشاهده شده در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تنباکو بوده و سایر عوارض ذکر شده نیز با شدت بیشتری قابل مشاهده می‌باشند (تصویر ۴).



تصویر ۴. تصاویر میکروسکوپ نوری بافت آبشش ماهی قزل آلی رنگین کمان در مواجهه با تنباکو. خونریزی و تجمع لوکوسیتی (ستاره سیاه)، چماقی شدن انتهای تیغه‌ها (پیکان منحنی سیاه)، هیپرپلازی (پیکان منقطع سیاه)، جدا شدن غشای پایه و ایجاد فضای ادماتوزه (پیکان آبی)، آنوریسم (پیکان منقطع آبی)، اتصال لاملاهای مجاور (پیکان منحنی دوسر)، واکوئولاسیون (پیکان سیاه) (H&E ×۷۲۵).

کلیه: در نمونه‌های اخذ شده از کلیه ماهیان گروه کنترل، ضایعات هیستوپاتولوژیکی مشاهده نگردید. و کلیه، از ساختار طبیعی برخوردار بود. جسمک‌های کلیوی و لوله‌های ادراری با ساختار طبیعی در میان بافت همبند داربستی قرار داشتند (تصویر ۵).

ضایعات هیستوپاتولوژیکی مختلفی در بافت کلیه ماهی قزل آلی رنگین کمان در غلظت‌های مختلف تنباکو مشاهده گردید. جدا شدن اپیتلیوم از غشای پایه، هیپرتروفی و اتساع مویرگ گلومرولی و دژنره شدن لوله‌های ادراری از جمله ضایعات مشاهده شده در همه تیمارهای تنباکو می‌باشد. در غلظت‌های بالاتر تنباکو یعنی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نکروز لوله‌های ادراری نیز قابل مشاهده بود (تصویر ۶).

3. Alijani Ardeshtir, R., Movahedinia, A., Rastgar, S. (2017). Fish liver biomarkers for heavy metal pollution: a review article. *American J Toxicol*, 2(1), 1-8.
4. Ballivet, M., Alloïd, C., Bertrand, S., Bertrand, D. (1996). Nicotine acetylcholine receptors in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol*, 258(2), 9-21. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0248> PMID: [8627624](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8627624/)
5. Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, R., Ahmadi, A. (2011). Effect of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pestic Biochem Phys*, 99, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.09.001>
6. David, M., Mushigeri, S.B., Shivakumar, R., Philip, G.H. (2003). Response of *Cyprinus carpio* (Linn) to sublethal concentration of cypermethrin: alterations in protein metabolism profiles. *Chemosph*, 56, 347-352. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.02.024> PMID: [15183996](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15183996/)
7. Devlin, E.W. (2006). Acute toxicity, uptake and histopathology of aqueous methyl mercury to fathead minnow embryos. *Ecotoxicol*, 15(1), 97-110. <https://doi.org/10.1007/s10646-005-0051-3> PMID: [16400529](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16400529/)
8. Evans, D.H. (Ed.) (1998). *The physiology of fishes*. Second edition. CRC Press. Boca Raton, USA. 519 pp. ISBN: 0-8493-8427-3
9. Hedayati, A., Safahieh, A., Savari, A., Movahedinia, A., Zare, P., Bagheri, T. (2011). Serum biochemical change induced by in vitro sub chronic mercury chloride in yellowfin sea bream (*Acanthopagrus latus*). *Iranica J Energ Environ*, 2(3), 208-214. <https://doi.org/10.5829/idosi.ijee.2011.02.03.682>
10. Hinton D.E., Baumann P.C., Gardner G., Hawkins W.E., Hendricks J.D., Okihiro M.S. (1992). Histologic biomarkers. In: *Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. Huggett R.J., Kimerli R.A., Mehrle Jr. P.M. and Bergman H.L. (eds.). Lewis Publishers. Boca Raton, USA. P. 156-196. ISBN: 9781315891170
11. Konar, S.K. (1970). Nicotine as a fish poison. *Prog Fish Culturist*, 32, 103-104. [https://doi.org/10.1577/15488640\(1970\)32\[103:NAAF PJ2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/15488640(1970)32[103:NAAF PJ2.0.CO;2)
12. Mela, M., Randi, M., Ventura, D., Carvalho, C., Pelletier, E., Ribeiro, C.O. (2007). Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotox Environ Safe*, 68(3), 426-435. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.11.013> PMID: [17296226](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17296226/)
13. Movahedinia, A., Abtahi, B., Bahmani, M. (2012). Gill histopathological lesions of the sturgeons. *Asian J Anim Vet Adv*, 7(8), 710-717. <https://doi.org/10.3923/ajava.2012.710.717>
14. Movahedinia, A., Savari, A., Morovvati, H., Kochanian, P., Marammazi, J.G. (2009). The effects of changes in salinity on gill mitochondria-rich cells of juvenile yellowfin seabream, *Acanthopagrus latus*. *J Biol Sci*, 9(7), 710-720. <https://doi.org/10.3923/jbs.2009.710.720>
15. Narahashi, T., Fenester, C., Quick, M.W., Laster, R.A., Marszalec, W., Aistrup, G.L., Sattelle, D.B., Martin, B.R., Levin, E.D. (2000). Symposium overview: mechanism of action of nicotine on neuronal acetylcholine receptors, from molecule to behavior. *Toxicol Sci*, 57(2), 193-202. <https://doi.org/10.1093/toxsci/57.2.193> PMID: [11006350](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11006350/)
16. Oliveira Ribeiro, C., Belger, L., Pelletier, E., Rouleau, C. (2002). Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environ Res*, 90(3), 217-225. PMID: [12477467](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12477467/)
17. Poosti, A., Sedigh Marvasti, A. (1999). *Atlas of fish histology*. Tehran University Press. Tehran, Iran. P. 328.
18. Rezvani Gilkalae, S., Sharifpour, A., Kazemi, R. (2006). Histopathologic effects of environmental factors on the Caspian Sea Hunter bony fishes (salmon and perch). *Iran Fish Res Org*. Tehran, Iran. 50pp.
19. Sadeghi, P., Kazerouni, F., Savari, A., Movahedinia, A., Safahieh, A., Ajdari, D. (2015). Application of biomarkers in Epaulet grouper (*Epinephelus stoliczkae*) to assess chromium pollution in the Chabahar Bay and Gulf of Oman. *Sci Total Environ*, 518-519, 554-561. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.017> PMID: [25777961](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25777961/)
20. Sadeghi, P., Savari, A., Movahedinia, A., Safahieh, A., Azhdari, D. (2014). An assessment of hematological and biochemical responses in the tropical fish *Epinephelus stoliczkae* of Chabahar Bay and Gulf of Oman under chromium exposure: ecological and experimental tests. *Environ Sci Pollut Res*, (2014) 21(9), 6076-6088. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2536-1> PMID: [24469769](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24469769/)
21. Salamat, N., Movahedinia, A., Etemadi-Deylami, E., Mohammadi, Y. (2015). Pike (*Esox lucius*) bio-indicator of heavy metal pollution in Anzali Wetland. *Water Qual Expo Health*, 7(2), 251-254. <https://doi.org/10.1007/s12403-014-0138-2>
22. Salehi, P., Sonboli, A., Eftekhari, F., Nejad Ebrahimi, S., Yousefzadi, M. (2005). Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of *Ziziphora clinopodioides subsp. rigida* (BOISS.) RECH. f. from Iran. *Biol Pharm Bull*, 28(10), 1892-1896. PMID: [16204941](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16204941/)
23. Sattari, M. (2002). *Ichthyology vol. I: Anatomy and Physiology*. Naghsh-e-Mehr. Tehran, Iran. 659pp.
24. Sharifpour, A., Soltani, M., Abdolhai, H., Ghayumi, R. (2002). Anesthetic effect of Clove flower (*Eugenia caryophyllata*) essence in variety pH and temperature condition in common carp (*Cyprinus carpio*) fry. *Iran Sci Fish J*, 4, 59-74.
25. Taheri, R., Salamat, N., Movahedinia, A. (2015). Using immune responses in *Euryglossa orientalis* and *Acanthopagrus latus* from Persian Gulf as indicators of environmental health. *Mar pollut bull*. 98(1-2), 47-57. <https://doi.org/10.1016/j.marpollbul.2015.07.014> PMID: [26169227](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26169227/)
26. Takashima, F., Hibiya, T. (1995). *An atlas of fish histology: normal and pathological features* (2nd ed.). Lubrecht and Cramer Ltd. New York, USA. 213pp. ISBN:3437307827
27. Thophon, S.M., Kruatrachue, E.S., Upathan, P., Pokethitiyook, S., Sahaphong Jarikhuan, S. (2003). Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer* in acute and subchronic cadmium exposure. *Eviron Pollut*, 121, 307-320. PMID: [12685759](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12685759/)
28. Van Dijk, J.E., Gruys, E., Mouwen, J. (2007). *Color atlas of veterinary pathology*: Saunders Elsevier, 160p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-2758-1.X5001-0>
29. Yaghoobi, Z., Safahieh, A., Ronagh, M.T., Movahedinia, A., Mousavi, S.M. (2017). Hematological changes in Yellowfin Seabream (*Acanthopagrus latus*) following chronic exposure to bisphenol A. *Comp Clin Path*, 26(6), 1305-1313. <https://doi.org/10.1007/s00580-017-2530-3>