

اثر شوری بر میتوکندری های سلولهای کلراید آبش بچه ماهی هامور معمولی

(*Epinephelus coioides*)

- رحیم عبدی*: دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی: ۶۶۹
 - محمد رضا پورخواجه: دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی: ۶۶۹
 - حسین ذوالقرنین: دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، صندوق پستی: ۶۶۹
 - همایون حسینزاده صحافی: موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق ۱ستی: ۶۱۱۶-۱۴۱۵۵
 - حسن مروتی: بخش بافت شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
- تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۸۹

چکیده

به منظور تعیین و تغییر فراوانی سلولهای کلراید در آبش بچه ماهی هامور معمولی طی سازگاری دو ماهه از روش هیستومورفولوژی استفاده گردید. به همین دلیل، نمونه‌های مورد نظر پس از تهیه در فیکساتیو بوئن و گلوتارآلدئید تثبیت شده و بعد از آبگیری در اتانول، پارافینه شدند. در مرحله بعدی از بلوک‌ها، برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون تهیه و برای مطالعه بروش بافت‌شناسی از رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین استفاده گردید. همچنین سایر مراحل آماده‌سازی برای مطالعه توسط میکروسکوپ الکترونی صورت گرفت. پس از انتقال ماهیان در فصل پاییز از آب با شوری ۴۰ ppt که متوسط شوری آب خلیج فارس می‌باشد به تیمارهای ۱۰ ppt، ۲۰ ppt و ۶۰ ppt تغییر در تعداد سلولهای کلراید و تعداد میتوکندری‌ها در بین تیمارهای مختلف طی دوره پانزده روزه سازگاری مطالعه گردید.

کلمات کلیدی: هامور ماهی معمولی، آبش، سلولهای کلراید، میتوکندری

مقدمه

را از طریق آبشش‌ها، و نیز مقداری از یون‌های دو ظرفیتی را از طریق کلیه‌ها دفع می‌کنند (۱۳). موجودات خشکی‌زی و آبی باید فشار اسمزی سلول‌های خود را بوسیله تنظیم جریان یون‌ها و آب از غشای سلولی اغلب با صرف انرژی، کنترل و ثابت نگه دارند. توانایی یک موجود آبی در تحمل تغییرات وسیع شوری بدون مخاطره فرایندهای زیستی، یوری‌هالینیتی (Euryhalinity) نامیده می‌شود. ماهیان استخوانی دریایی باید با از دست دادن آب از طریق اسمز و ورود یون‌ها بویژه Na^+ و Cl^- از طریق انتشار

هامور ماهیان از خانواده Serranidae می‌باشند که در آبهای شور دیده می‌شوند. این ماهیان در اکثر کشورهای جنوب شرق آسیا جزء ماهیان مهم پرورشی می‌باشند و به دلیل داشتن گوشت لذیذ و غنی، دارای ارزش اقتصادی بالایی هستند. هامور معمولی ساکن آب شور است، بنابراین نسبت به محیط خود هیپواسمیتیک می‌باشد. در چنین شرایطی، ماهی بطور غیر فعال آب از دست می‌دهد و نمک جذبی بدست می‌آورد. آنها برای جبران این عمل آب می‌نوشند و بطور فعال یون‌های تک ظرفیتی



۴۱-۴۰ ppt می‌باشد و در نواحی محصور حدود ۵۰ ppt نیز می‌رسد. لذا یک تیمار لب شور ۲۰ ppt، یک تیمار شاهد ۴۰ ppt، یک تیمار با شوری ۱۰ ppt، یک تیمار خیلی شور ۶۰ ppt در نظر گرفته شد. شوری ۱۰ ppt تا ۶۰ ppt بدلیل آنکه گاهی این ماهی در مناطق ساحلی زندگی می‌کند و در اثر بارندگی شدید و تبخیر زیاد شوری این مناطق دستخوش تغییرات شدیدی می‌شوند که بر موجودات این مناطق تاثیر زیادی می‌گذارد.

۳ تانک بعنوان تیمارهای شاهد ۴۰ ppt، محتوی آب دریا باقی ماند. شوری‌های ۱۰ ppt و ۲۰ ppt در ۶ تانک دیگر با وارد نمودن آب شیرین و شوری ۶۰ ppt با اضافه کردن نمک دریا به سه تانک باقیمانده بدست آمد. بنابراین برای هر آزمایش سه تکرار در نظر گرفته شد. در طول مدت آزمایش سنجش خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب از قبیل: شوری، دما، pH با استفاده از رفکتومتر نوری (Horiba U-10، ژاپن)، ترمومتر دیجیتال (Horiba U-10، ژاپن) و pH متر دیجیتالی (U-10 Horiba، ژاپن) انجام گرفت. نمونه‌برداری از ماهیان در دو مرحله (در لحظه انتقال و روز پانزدهم) انجام شد. ماهیان پس از صید، بلافاصله (جهت کاهش اثرات عوامل استرس‌زا)، در داخل تشت‌های پلاستیکی محتوی آب همسان با تانک حاوی هر ماهی که دارای ماده بیهوش کننده گل‌میخک بود، بیهوش شدند. کمان آبششی دوم سمت چپ به قطعات کوچکتر (هر کدام حداقل شامل ۵ رشته آبششی Gill filament) متصل به کمان (سپتوم) بریده شده، با قرار دادن بمدت ۴۸ ساعت در محلول بوئن تثبیت و برای نگهداری، در الکل ۷۰ درصد قرار داده شد و پس از انجام مراحل معمول، بافت‌شناسی انجام شد. در نهایت از لامهای میکروسکوپی تهیه شده فتومیکروگرافهای لازم تهیه گردید. همچنین برای مطالعه نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی، براساس مراحل معمول تهیه و آماده‌سازی نمونه‌ها انجام گرفت و در نهایت تعداد میتوکندری‌های موجود در داخل اسلایدهای مشاهده شده در شرایط برابر شمارش شد (۱۱). در نهایت شمارش و پراکنش میتوکندری‌ها در سلولهای کلراید در رشته‌های آبشش توسط نرم‌افزار Image tools 2.0 انجام شد.

نتایج

سلول‌های کلراید آبشش در پایه لاملا و فضای بین لاملایی وجود دارند، شناسایی آنها با توجه به رنگ‌پذیری بیشتر این سلول‌ها نسبت به آئوزین در رنگ آمیزی هماتوکسیلین-آئوزین مشخص گردید. سلول‌های کلراید در مقاطع میکروسکوپی آبشش بصورت یکسری

به محیط داخلی بدن، در برابر تغییرات محیط داخلی بدن مقابله کنند، که این عمل با خوردن آب دریا، کاهش سطح ادرار و دفع فعال نمک از طریق آبشش انجام می‌پذیرد. در حالیکه مکانیسم‌های معکوسی در ماهیان آب شیرین رخ می‌دهد (۱). تنظیم اسمزی مکانیسم حفظ هومئوستازی مایعات درونی بدن است که مسئول کنترل اسمولالیت یا فشار اسمزی پلاسما می‌باشد. ماهیان یوری هالین ظرفیت تنظیم اسمزی تحت شرایط محیطی مختلف از آب شیرین تا آب بسیار شور را دارند. این ظرفیت فیزیولوژیکی عموماً با استفاده از سنجش فعالیت آنزیمی $Na^+/K^+-ATPase$ ، کمیت هورمون‌ها، الکترولیت‌ها، متابولیت‌ها، بیان ژن، مطالعه بافت‌هایی مانند آبشش، کلیه و روده در ماهیان، مورد بررسی قرار می‌گیرد (۲ و ۷). آبشش با تغییر دادن سطح و تعداد سلولهای کلراید یا سلولهای غنی از میتوکندری یا سلولهای یونوسیت بعنوان مهمترین اندام دخیل در تنظیم یونی و اسمزی در ماهیان استخوانی نسبت به شوری‌های مختلف قابل ذکر می‌باشد (۵، ۹ و ۱۲). با توجه به مطالب ذکر شده و نیز اهمیت فوق‌العاده زیاد ماهی هامور از نظر تغذیه‌ای و اقتصادی و نیز عدم انجام مطالعات کافی روی بافت آبشش هامور ماهیان و با توجه به توانایی ماهی هامور در سازگاری با شوری‌های متفاوت محیط و نیز انتظار ایجاد تغییرات و تفاوت‌هایی در سطوح بیوشیمیایی، فیزیولوژیک، سلولی، آنزیمی و بافت‌شناختی بویژه در سلولهای کلراید و در میتوکندری‌های این سلولها که توسط میکروسکوپ الکترونی قابل ردیابی می‌باشند در مواجهه با شوری‌های مختلف در این ماهی، می‌تواند مدل مناسبی برای بررسی مکانیسم‌های تنظیم اسمزی در شوری‌های متفاوت باشد که مطالعه حاضر بر پایه این بنا شده است.

مواد و روشها

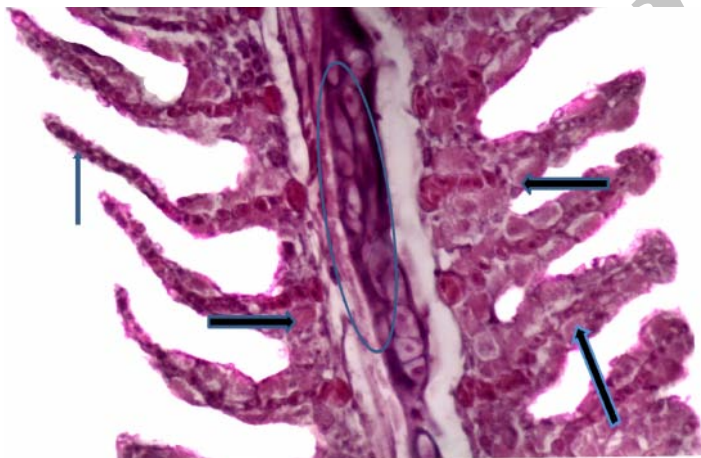
۶۰۰ عدد هامور با وزن حدود یک گرم از ایستگاه تحقیقاتی شیلات بندر امام و ماهشهر تهیه شد، سپس ۴۸۰ عدد سالم از آنها که دارای پارامترهای بیولوژیک مشابه نیز بودند به ۱۶ تانک ۳۰۰ لیتری محتوی آب دریا (هر تانک ۳۰ عدد ماهی) به مدت یک هفته برای سازش با شرایط جدید (سوله تحقیقاتی مورد نظر) انتقال داده شدند. پس از این دوره، شوری‌های مختلف به شرح زیر در مورد تانک‌ها اعمال گردید. در این تحقیق از شوری ۱۰ ppt تا ۶۰ ppt که از حداکثر شوری در آبهای آزاد ایران بیشتر است، استفاده شد. شوری خلیج فارس در بیشتر مناطق آن

سلول‌های کلراید بصورت دو الگوی متمایز در شوری‌های پایین و بالاتر قابل تشخیص به نظر می‌رسید. تیغه‌های برانشی بصورت عمود قرار گرفته‌اند و در بخش‌های انتهایی رشته فاقد تیغه بوده‌اند (شکل ۱).

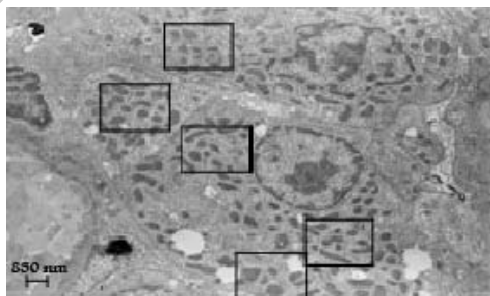
نتایج میکروسکوپ الکترونی

تصاویر میکروسکوپ الکترونی بترتیب از بالا به پایین مربوط به شوری‌های ۱۰ ppt، ۲۰ ppt، ۴۰ ppt و ۶۰ ppt می‌باشد (اشکال ۲ تا ۵).

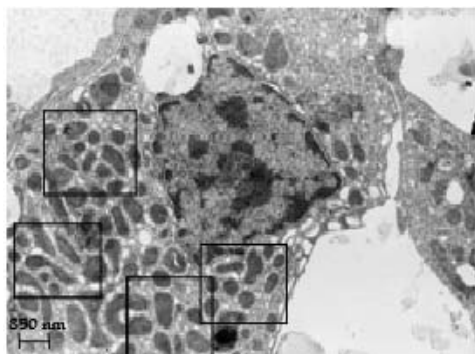
سلول‌های اسیدوفیل از سایر سلول‌های بافت پوششی آبشش قابل تشخیص بودند. نتایج مطالعه حاضر حاکی از شناسایی یک دسته از سلول‌های کلراید در بافت پوششی آبشش بود. در انتقال مستقیم ماهی هامور به تیمارهای مختلف شوری با تغییرات عمده‌ای در تعداد و سطح سلول‌های کلراید همراه گردید. لیکن این تغییرات در طول دوره سازگاری یکسان نبوده و تحت تاثیر شوری و زمان، الگوی متفاوتی از تغییر سطح و تعداد سلول‌های کلراید مشاهده گردید. با این وجود در کوتاه مدت شاید بتوان روند افزایشی در تغییر تعداد سلول‌های کلراید در تیمار ۶۰ ppt و یک روند کاهش در تیمارهای ۱۰ ppt و ۲۰ ppt موثر از شدت شوری را وضع نمود. از طرفی در دراز مدت تغییر تعداد



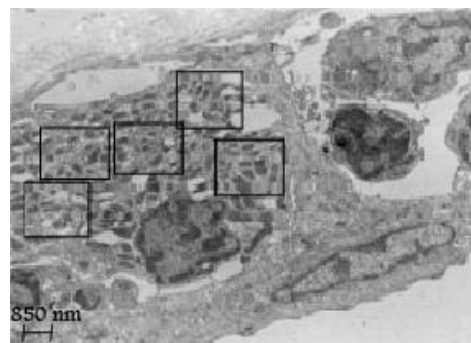
شکل ۱: تصویر میکروسکوپ نوری از رشته آبشش (فیلامنت) بچه ماهی هامور معمولی گروه شوری ۴۰ ppt (شاهد). تیغه‌های آبشش بصورت دو ردیفی در دو سمت رشته قابل تشخیص می‌باشند. در قسمت میانی رشته رگ خونی محتوی سلول‌های خونی قابل رویت می‌باشند (شکل بیضی). سلول‌های یونوسیت با رنگ روشن، اندازه درشت و شکل کروی روی قاعده و فضای بین تیغه‌ها قابل رویت می‌باشند (پیکانهای افقی). همچنین تجمعات سلول‌های سنگفرشی (پیکان عمودی) و جامی (پیکان مایل) روی تیغه‌ها قابل رویت می‌باشند (H&Ex400).



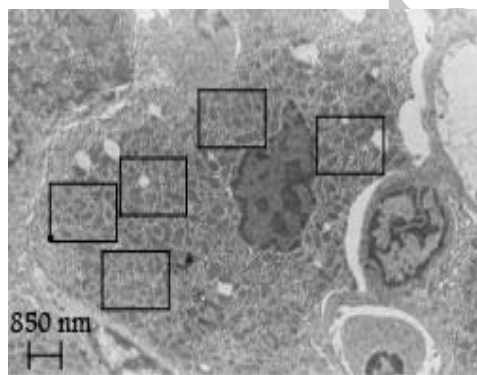
شکل ۲: تصویر میکروسکوپ الکترونی از سلول کلراید رشته آبشش (فیلامنت) به همراه میتوکندری‌ها در داخل مستطیل بچه ماهی هامور معمولی گروه شوری ۱۰ ppt



شکل ۴: تصویر میکروسکوپ الکترونی از سلول کلراید رشته آبشش (فیلامنت) به همراه میتوکندری‌ها در داخل مستطیل بچه ماهی هامور معمولی گروه شوری ۴۰ppt

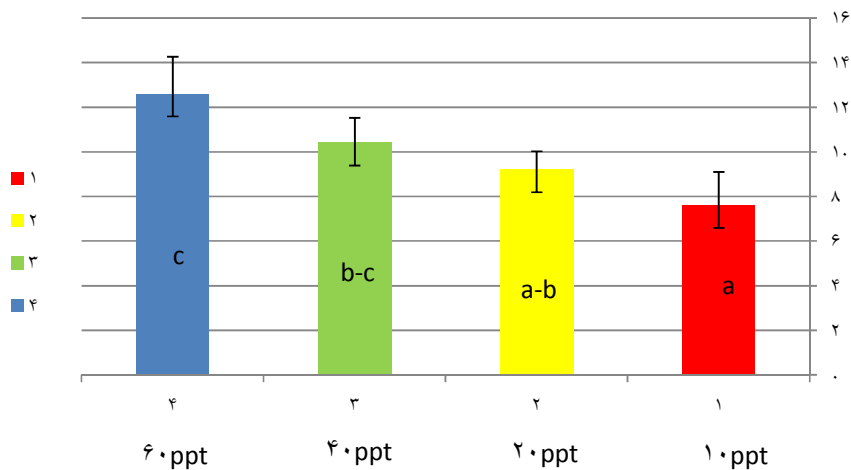


شکل ۳: تصویر میکروسکوپ الکترونی از سلول کلراید رشته آبشش (فیلامنت) به همراه میتوکندری‌ها در داخل مستطیل بچه ماهی هامور معمولی گروه شوری ۲۰ppt



شکل ۵: تصویر میکروسکوپ الکترونی از سلول کلراید رشته آبشش (فیلامنت) به همراه میتوکندری‌ها در داخل مستطیل بچه ماهی هامور معمولی گروه شوری ۶۰ppt

اختلاف تعداد میتوکندری



نمودار ۱: در این نمودار اختلاف تعداد میتوکندری روی ستون عمودی و شوریه‌های مختلف بر روی ستون افقی



ppt اندازه و تعداد میتوکندری‌های سلولها بطور قابل توجهی با ازدیاد شوری افزایش یافته و بیشترین اندازه این سلولها متعلق به شوری ppt ۳۶ می‌باشد. سلول‌های کلراید بعنوان واحدهای اصلی موثر در تنظیم اسمزی ماهیان استخوانی عالی، برای اولین بار از آبشش مارماهی معمولی (*Angiula angiula*) شناسایی شدند (۱۰). مطالعات بعدی، حاکی از توزیع متمایز این نوع از سلولها در ساختار آبشش، گونه‌های مختلف و ارتباط مستقیم بین شکل سلول کلراید و محل قرارگیری آن در ساختمان آبشش بود. بنحویکه در گونه مارماهی پوزه‌دار (*Angiula rostrata*)، تجمع سلول‌های کلراید در قاعده فیلامنت و در میان پلاکتهای خونی، توده‌های متراکمی را در اپی‌تلیوم فیلامنتی حاشیه عروق و ابران و در مجاورت سلول‌های موکوسی تشکیل خواهد داد (۳). از طرفی در گونه مار ماهی معمولی (*Angiula angiula*) این سلولها بصورت پراکنده در راس لاملا و در موضع سطحی‌تری نسبت به سلول‌های گونه پوزه‌دار *Angiula rostrata* قرار خواهند گرفت. تفاوت‌های مورفولوژیک در این سلولها می‌تواند بازتابی از نوع سازگاری ایجاد شده (سازگاری هیپوتونیک یا هیپرتونیک) نیز باشد. در مارماهی معمولی سازگار شده به آب شور، سلولهای کلراید استوانه‌ای شکل به فرم سلول‌هایی باریک با اشکال نامشخص و در انواع سازگار شده با آب شور بصورت سلولهای بیضی شکل متمایز می‌باشند. تفاوت‌های عملکردی در سلول‌های کلراید آب شور و شیرین می‌تواند بازتابی از تفاوت‌های فراساختاری سلول‌های کلراید نیز باشد. تلاشهای اولیه در راستای تفکیک سلول‌های کلراید براساس تفاوت‌های فراساختاری، به شناسایی دو جمعیت عمده از سلول‌های کلراید با غلظت توده الکترونی متفاوت منتهی گردید (۴). عمده‌ترین تفاوت‌های ساختاری میان سلول‌های کلراید از نوع آب شور و شیرین را شاید بتوان در نحوه توزیع میتوکندری‌ها جستجو کرد. بنحویکه در قدم بعدی در یک تحقیق دیگر با بکارگیری رنگ‌آمیزی اسید فوشین موفق به شناسایی دو جمعیت a (با اندازه کوچک و رنگ‌پذیری قوی در مقابل اسید فوشین) و b (با اندازه بزرگتر و رنگ‌پذیری ضعیف در مقابل اسید فوشین) شدند (۱۵). در واقع در سلولهای کلراید از نوع a، تمام سیتوپلاسم به استثنا ناحیه پیرامون چین غشایی توسط تمرکز انبوه میتوکندری‌ها پوشیده خواهد شد. لیکن در انواع b، تعداد محدودتری از میتوکندری‌ها در ساختار سلول‌های کلراید قابل تشخیص می‌باشند (۱۱). افزایش سلول‌های غنی از میتوکندری پس از آدآپتاسیون ماهی شانک gilthead با شوری بالاتر از آب دریا گزارش کرده‌اند. اندازه سلول‌های غنی از میتوکندری در ماهی شانک زرد باله نیز در پاسخ به شوری محیطی پس از ۷ روز افزایش معنی‌دار داشت. به نظر می‌رسد

از اطلاعات آماری بدست آمده از نمودار ۱ چنین بر می‌آید که تیمار ppt ۱۰ در سطح ۵ درصد با تیمار ppt ۲۰ اختلاف معنی‌داری ندارد ولی با تیمار ppt ۴۰ و ppt ۶۰ در سطح ۵ درصد اختلاف دارد. تیمار ppt ۲۰ در سطح ۵ درصد با تیمارهای ppt ۱۰ و ppt ۴۰ اختلاف معنی‌داری ندارد ولی با تیمار ppt ۶۰ در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری دارد. تیمار ppt ۴۰ در سطح ۵ درصد با تیمار ppt ۲۰ و ppt ۶۰ اختلاف معنی‌داری ندارد ولی با تیمار ppt ۱۰ اختلاف معنی‌داری دارد. تیمار ppt ۶۰ در سطح ۵ درصد با تیمار ppt ۲۰ و ppt ۱۰ در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری دارد. بنابراین اختلاف تعداد میتوکندری‌های شوری‌های ppt ۱۰ و ppt ۲۰ نزدیک بهم (a-b) و در شوری‌های ppt ۲۰ و ppt ۴۰ نیز این شرایط برقرار می‌باشد (b-c).

بحث

تنظیم اسمزی در ماهیان استخوانی با دخالت مستقیم سلول‌های کلراید و از طریق یکسری عملکردهای کاملاً متمایز در ماهیان ساکن آبهای شور و شیرین به انجام می‌رسد. در ماهیان دریازی وظیفه عمده این سلولها تنظیم اسمزی از طریق ترشح یون کلر توام با ترشح غیرفعال یون سدیم خواهد بود. ترشح فراغشایی یون کلر از این سلولها بصورت یک فرآیند پیچیده و با دخالت ۴ نوع عمده از ناقلها و کانال‌های حاضر در غشاء راسی و قاعده‌ای جانبی (کانالهای کلر حاضر در غشای راسی سلول، ناقل یونی $Na^+/K^+/2Cl^-$ حاضر در غشای قاعده‌ای جانبی، پمپ $Na^+/K^+ATPase$ غشای قاعده‌ای جانبی و کانال‌های پتاسیمی غشای قاعده‌ای جانبی) به انجام می‌رسد ترشح کلرید سدیم از آبشش‌ها بصورت ترکیبی از انتقال فعال ثانویه یون کلر (Cl^-) و انتقال غیرفعال سدیم (Na^+) صورت می‌گیرد. نیروی محرکه انتقال فعال کلر با فعالیت پمپ $Na^+/K^+ATPase$ تامین می‌گردد. در واقع فعالیت این پمپ به حفظ غلظت درون سلولی سدیم در مقادیر پایین‌تر از محیط بیرون و غلظت پتاسیم در مقادیر بالاتر از محیط بیرون سلول کمک می‌کند (۷). مشخصه اصلی این سلولها تراکم بالای میتوکندری در این سلولها می‌باشد. این سلولها هم چنین بافت پوششی جانبی- قاعده‌ای را از طریق چین خوردن یا سیستم توبولی گسترش می‌دهند. در این بافت پوششی گسترش یافته آنزیم مهم تنظیم کننده یونی، $Na^+-K^+ATPase$ قرار می‌گیرد (۱۴). در مطالعه‌ای که روی تغییرات فیزیولوژیک آبشش ماهی تیلاپیا توسط Guner و همکاران در سال ۲۰۰۵ صورت گرفته، مشخص گردید در انتقال تدریجی ماهیان به شوری‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۶

juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) reared at different temperatures and salinities. *Aquaculture*, 218:671-683.

- 9- **Katoh, F., Hyodo, S., Kaneko, T., 2004.** Vacuolar-type proton pump in the basolateral plasma membrane energizes ion uptake in branchial mitochondria-rich cells of killifish, *Fundulus heteroclitus*, adapted to a low ion environment. *J. Exp. Biol.*, 206:793-803.
- 10- **Keys, A. and Willmer, E.N., 1932.** Chloride secreting cell in the gills of fishes, with special reference to the common eel. *J. Physiol.*, lxxvi, No. 3, pp.368-378.
- 11- **Lin, H.C. and Sung, W.T., 2003.** The distribution of mitochondria-rich cells in the gills of air-breathing fishes. *Physiol. Biochem. Zool.*, 76:215-228.
- 12- **Laize-Carrion, R.; Gaurreiro, P.M.; Fuentes, J.; Canario, A.V.M.; Martin del Rio, M.P. and Mancera, J.M., 2005.** Branchial osmoregulatory response to salinity in the gilthead sea bream, *Sparus auratus*. *J. Exp. Zool.*, 303:563-570.
- 13- **Lee, K.M.; Kaneko, T., Katoh, F. and Aida, K., 2006.** Prolactin gene expression and gill chloride cell activity in fugu *Takifugu rubripes* exposed to a hypoosmotic environment. *Gen. Com. Endo.*, 149:285-293.
- 14- **Marshall, W.S.; Lynch, E.M. and Cozzi, R.R., 2002.** Redistribution of immunofluorescence of CFTR anion channel and NKCC cotransporter in chloride cells during adaptation of the killifish *Fundulus heteroclitus* to sea water. *J. Exp. Biol.*, 205:1265-1273.
- 15- **Shirai, N. and Utida, S., 1970.** Development and degeneration of the chloride cell during seawater and freshwater adaptation of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Z. Zellforsch.*, 103:247-264.

بدلیل اختلاف کمتر در اسمولالیتی و غلظت یون‌ها بین محیط و مایعات بدن ماهی، در محیط با شوری کمتر از ۴۰ درصد، نیاز به دفع فعال یون‌های اضافی، کاهش یافته است. لذا در یک پاسخ سازشی، با کاهش تعداد و اندازه سلول‌های غنی از میتوکندری، تعداد آنزیم‌ها و ناقل‌های یونی (که در غشای سلولی جای دارند) و در نتیجه، فعالیت این سلول‌ها کمتر می‌شود (۸).

منابع

- 1- **Alderdice, D.F., 1988.** Osmotic and ionic regulation in the teleost eggs and larvae. *In: Fish Physiology. The physiology of developing fish. Eggs and larvae, Vol. 11, part A.* (W.S. Hoar and D.J. Randall eds.) Academic Press, London, UK. pp.163-251.
- 2- **Boutet, I., Long Ky, C.L. and Bonhomme, F., 2006.** A transcriptomic approach of salinity response in the euryhalin teleost, *Dicentrarchus labrax*. *Gene*, 379:40-50.
- 3- **Cetman, H.C., 1957.** Adaptive changes in the chloride cells of *Anguilla rostrata*. *Am. J. Physiol.*, 97:602-610.
- 4- **Doyle, W.L. and Gorecki, D., 1961.** The so called chloride cell of the fish gill. *Physiol. Zool.*, 34:81-85, Pls: 1-3, figs:1-6.
- 5- **Evans, D.H., 1997.** The physiology of fishes. Boca Raton, CRC Press, 519P.
- 6- **Guner, Y., Ozden, O., Cagirgan, H., Altunok, M. and Kizak, V., 2005.** Effect of salinity on the Osmoregulatory functions of the gills in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Turk. Vet. Anim. Sci.*, 29:1259-1266.
- 7- **Hirose, S.; Kaneko, T.; Naito, N. and Takei, Y., 2003.** Molecular biology of major components of chloride cells. *J. Com. Biochem. Physiol.*, Part B, 136:593-620.
- 8- **Imsland, A.K.; Gunnarsson, S.; Foss, A. and Stefansson, S.O., 2003.** Gill Na^+/K^+ -ATPase activity, plasma chloride and osmolality in

