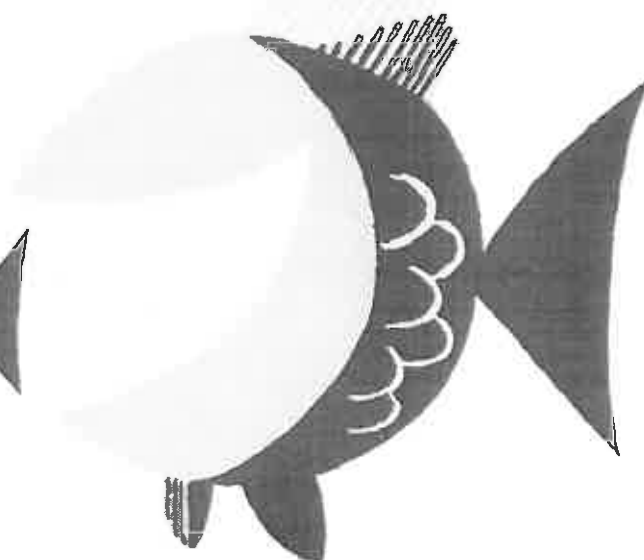


RIISTA-JA KALATALOUDEN TUTKIMUSLAITOS

**KALATUTKIMUKSIA-
FISKUNDERSÖKNINGAR**



46
1992



RIISTA-JA KALATALOUDEN TUTKIMUSLAITOS

KALATUTKIMUKSIA- FISKUNDERSÖKNINGAR



Vastaava toimittaja: Lauri Urho

Toimittajat: Irma Kolari, Marja-Liisa Koljonen, Antti Lappalainen, Riitta Rahkonen, Atso Romakkaniemi, Matti Salminen, Lena Söderholm-Tana, Pirkko Söderkultalahti ja Aune Vihervuori

Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos
Kalantutkimusosasto
Kalanviljelyosasto
PL 202
00151 Helsinki

puh. 90 - 624 211
telex 19101236 vdx sf
telefax 90 - 631 513
telebox tbx668

Kalatutkimuksia – Fiskundersökningar sarjassa julkaistaan kalatalouteen liittyviä tutkimuksia, suunnitelmia, raportteja, selvityksiä, lausuntoja, esitelmiä sekä tutkimusten aineistoja tai muita vastaavia kirjoituksia. Julkaisukieliä ovat pääsääntöisesti suomi ja ruotsi. Kirjoitusohjeita on saatavilla Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen tietopalvelussa (PL 202, 00151 Helsinki).

Julkaisun jakelusta päätetään kunkin numeron osalta erikseen. Julkaisua koskevat tiedustelut osoitetaan tietopalveluun.

Kalatutkimuksia – Fiskundersökningar on jatkoa sarjoille: "Maataloushallituksen kalataloudellinen tutkimustoimisto. Monistettuja julkaisuja" (no:t 1–42) ja "Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos, kalantutkimusosasto. Monistettuja julkaisuja" (no:t 1–98), "Tiedonantoja" (no:t 1–24) ja "Meddelanden" (no:t 1–21).

Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen kalantutkimusosaston ja kalanviljelyosaston muut julkaisusarjat ovat "Finnish Fisheries Research" ja "Suomen Kalatalous".

Ansvarig redaktör: Lauri Urho

Redaktörer: Irma Kolari, Marja-Liisa Koljonen, Antti Lappalainen, Riitta Rahkonen, Atso Romakkaniemi, Matti Salminen, Lena Söderholm-Tana, Pirkko Söderkultalahti ja Aune Vihervuori

Vilt- och fiskeriforskningsinstitutet
Fiskeriforskningsavdelningen
Fiskodlingsavdelningen
PB 202
00151 Helsingfors

tel. 90 - 624 211
telex 19101236 vdx sf
telefax 90 - 631 513
telebox tbx668

I serien Kalatutkimuksia – Fiskundersökningar publiceras undersökningar, planer, rapporter, utredningar, utlåtanden, föredrag samt forskningsmaterial eller motsvarande artiklar som behandlar fiskerihushållningen. Publikationsspråken är i huvudsak finska och svenska. Skrivinstruktioner kan erhållas från Vilt- och fiskeriforskningsinstitutets informationstjänst (PB 202, 00151 Helsingfors).

Publikationens distribuering fastställs skilt för varje nummer. Förfrågningar angående tidskriften bör riktas till informationstjänsten.

Kalatutkimuksia – Fiskundersökningar är en fortsättning på "Maataloushallituksen kalataloudellinen tutkimustoimisto. Monistettuja julkaisuja" (nr 1–42) ja "Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos, kalantutkimusosasto. Monistettuja julkaisuja" (nr 1–98), "Tiedonantoja" (nr 1–24) och "Meddelanden" (nr 1–21).

Övriga publikationsserier från Vilt- och fiskeriforskningsinstitutets fiskeriforskningsavdelning och fiskodlingsavdelning är "Finnish Fisheries Research" och "Suomen Kalatalous".

RIISTA- JA KALATALOUDEN TUTKIMUSLAITOS
KALATUTKIMUKSIA – FISKUNDERSÖKNINGAR

No 46

1992

Nukutusaineiden toissijaiset fysiologiset vaikutukset järvitaimenessa

Tiina Lecklin

**Helsingin yliopisto, eläintieteen laitos
Helsinki**

Helsinki 1992

ISSN 0787-8478
Helsinki 1992
Yliopistopaino

Sisällys

1. Johdanto	1
1.2. Työn tarkoitus	3
2. Aineisto ja menetelmät	4
2.1. Tutkimuksessa käytettyjä nukutusaineita	4
2.2. Aineisto	7
2.3. Menetelmät	8
2.3.1. Pitoisuuskoe	8
2.3.2. Toleranssi- eli sietokoe	9
2.3.3. Nukutuskoe ja näytteenotto	9
2.4. Analytiikka	10
2.5. Histologia	11
2.6. Tilastollinen tarkastelu	11
3. Tulokset	11
3.1. Pitoisuus- ja sietokokeet	11
3.1.1. MS 222	11
3.1.2. Menokaiini	11
3.1.3. Fenoksietanoli	12
3.1.4. Propoksaatti	12
3.1.5. Kinaldiinisulfaatti	12
3.1.6. Klorbutoli	13
3.1.7. Tribromoetanoli	13
3.2. Fysiologiset arvot	14
3.2.1. Veren hematokriitti, hemoglobiini ja MCHC	14
3.2.2. Plasman ionipitoisuudet	16
3.2.3. Punasolujen ionipitoisuudet	17
3.2.4. Lihaksen, aivojen ja punasolujen vesipitoisuus	19
3.2.5. Plasman kortisolipitoisuus	21
3.3. Histologia	22
4. Tulosten tarkastelu	22
4.1. Nukutusainepitoisuudet ja sietokyky	23
4.2. Nukutusaineiden vaikutukset järvitaimenen fysiologisiin arvoihin	25

4.3. Histologia	30
5. Johtopäätökset	30
Kiitokset	32
Tiivistelmä	32
Sammandrag	33
Kirjallisuus	34

1. Johdanto

Kalat ovat vaihtolämpöisiä, vettä hengittäviä eläimiä, joiden poistaminen normaalista elinympäristöstä aiheuttaa niille tukehtumisvaaran. Nukuttamattomia kaloja on vaikea käsitellä. Pyydyttäminen ja käsittely saattavat aiheuttaa niille mekaanisia ihovaurioita, joista saattaa seurata ionitasapainon häiriöitä sekä sieni- ja bakteeritulehduksia. Kalojen käsittelyssä nukutus onkin enemmän kuin välttämättömyys.

Nukutusaineita tarvitaan normaalissa kalanviljelyrutiinissa muun muassa lypsyssä ja merkinnässä. Siirrettäessä kaloja pitkiä matkoja niiden kuolleisuus vähenee, jos ne huumataan lievästi (Lambert 1982, Sado 1985). Nukutus ei ainostaan vähennä mekaanisia vaurioita ja stressiä, vaan myös laskee aineenvaihduntatasoa ja pienentää siten hapen kulutusta ja aineenvaihduntatuotteiden eritystä kuljetusveteen (Ross ja Ross 1984, Stuart 1981). Vaikkakin nukutus itsessään saattaa aiheuttaa sivuvaikutuksia, on siitä saatava hyöty suurempi kuin haitta, jos nukutus on oikein suoritettu ja valvottu (McFarland ja Klontz 1969, Stuart 1981, Ross ja Ross 1984, Marking ja Meyer 1985). Kalanviljelyn lisäksi nukutusaineita käytetään kalatutkimuksessa.

Kaloja nukutettaessa olisi ylimääräiset häiriötekijät karsittava minimiin. Epänormaali tila lisää eläimen stressiä ja vähentää kykyä selviytyä nukutuksesta. Tutkimuksen kannalta on tärkeää, että käytettävä aine vaikuttaa mahdollisimman vähän kalan fysiologiaan, jotta saadut tulokset olisivat vertailukelpoisia. Lähinnä käytännön kalanviljelyyn tarkoitettuja nukutusohjeita on julkaistu eri yhteyksissä (McFarland 1959, Klontz ja Smith 1968, McFarland ja Klontz 1969, Ross ja Ross 1984, Marking ja Meyer 1985, Bell 1987). Näiden antamat ohjeet eivät kuitenkaan aina sovi suoraan suomalaisiin olosuhteisiin.

Jotta välttyttäisiin yliannostuksen aiheuttamilta tappioilta, olisi hyvä osata tunnistaa eri nukutusasteiden aikaiset käyttäytymismuodot. Eräs tärkeimmistä ja selvimmistä vaikutuksista kohdistuu hengitysliikkeiden nopeuteen ja syvyyteen. Nukutusasteista on kirjallisuudessa annettu erilaisia luokituksia (McFarland 1959, Klontz ja Smith 1968, McFarland ja Klontz 1969) (Taulukko 1). Nämä luokitukset ovat peräisin 60-luvulta ja muistuttavat periaatteiltaan nisäkkäiden vastaavia luokituksia (McFarland 1959). Laitettaessa kalat nukutushauteeseen ne ensin uivat kiivaasti uuden ympäristön ja mahdollisesti ärsyttävän kemikaalin vuoksi. Vähitellen ne kuitenkin rauhoittuvat ja alkavat menettää tasapainoaan. Samaan aikaan kun kala kääntyy kyljelleen tai selälleen eikä enää kykene korjaamaan asentoaan, sen kiduskansien liikkeet vähenevät. Lopulta

myös uintiliikkeet loppuvat ja kala makaa paikallaan. Kala ei enää tässä vaiheessa reagoi kosketusärsytykseen. Niinpä sille voidaan tehdä kirurgisia toimenpiteitä. Tämän vaiheen aikana hengityслиikkeet ovat nopeita eikä niitä helposti havaitse. Ensimmäinen merkki yliannostuksesta on hengityслиikkeiden loppuminen ja kiduskansien yhtäkkiset ja rajut avautumiset. Jos kalaa ei tässä vaiheessa siirretä puhtaaseen veteen, on seurauksena sydämen pysähtyminen ja kuolema (Klontz ja Smith 1968, McFarland ja Klontz 1969).

Sopiva nukutusaste määräytyy tehtävän toimenpiteen mukaan. Kirurgisissa toimenpiteissä vaaditaan syvä anestesia, kun taas kuljetuksessa kalat vain rauhoitetaan lievästi. Astetta voidaan säädellä nukutusaineen pitoisuutta ja/tai vaikutusaikaa muuttamalla. Nukutusaineen tehokkuus vaihtelee kalalajin ja -kannan mukaan. Kidusten pinta-ala suhteessa kalan kokoon vaikuttaa annostukseen.

Taulukko 1. Kalan nukutuksen eri vaiheet (Klontz ja Smith 1969).

Aste	Vaikutus
0	Hengitys- ja uintiliikkeet normaalit.
I	Uintiliikkeet epäsäännölliset, osittainen tasapainon menetys, hengityслиikkeet kiihtyvät.
II	Uintiliikkeet hidastuu, tasapainon menetys lähes täydellinen, hengityслиikkeet normaalit.
III 1	Uintiliikkeet hidastuu edelleen, samoin hengitys, tasapainon täydellinen menetys, kala reagoi vielä kosketukseen.
2	Uintiliikkeet hävinneet, kiduskansien liikkeet nopeita, kala ei reagoi ulkoisiin ärsykkeisiin.
3	Ei hengitysaktiivisuutta, kala palautuu siirrettäessä puhtaaseen veteen.
IV	Rajuja, äkillisiä kiduskansien avautumisia, sydämen pysähtyminen, kuolema.

Esimerkiksi samanpainoisten lohen ja ankeriaan vaste samanlaiseen nukutusjärestelyyn poikkeaa toisistaan (Ross ja Ross 1984). Aktiivisilla kaloilla aineenvaihdunta on vilkkaampaa; ne nukahtavat nopeammin ja toipuminen on nopeampaa kuin vastaavankokoisella hitaammalla kalalla. Kalan koko saattaa muuttaa vaikutusaikaa ja myös nukutusaineen poistumisnopeutta. Pieni kala on yleensä vastustuskykyisempi kuin suuri kala (McFarland 1959, Ross ja Ross 1984). Eri kehitysvaiheissa olevilla kaloilla saattaa olla erilainen rasvajakauma tai häiriöalttius. Sukukypsä naaras tai poikkeuksellisen rasvainen kala saavuttavat toivotun nukutusasteen nopeasti, mutta niillä on myös pitempi toipumisaika (Ross ja Ross 1984). Lisäksi tehokkuuteen vaikuttaa veden kemia, lähinnä suolapitoisuus, happamuus ja kovuus. Merivedessä on suurempi puskurikapasiteetti ionikoostumuksensa vuoksi, jolloin nukutusaineiden vaikutukset poikkeavat makeassa vedessä tapahtuvien nukutusten vaikutuksista (Ross ja Ross 1984).

Meriveden Ca^{2+} -ionit toimivat myös vastavaikuttajina joillekin barbituraateille (McFarland ja Klontz 1969, Ross ja Ross 1984). Lämpötila vaikuttaa nukutusaineiden vasteisiin sekä aineenvaihduntanopeuden muutosten että nukutusaineiden fysikaalisten ominaisuuksien muutosten kautta. Myös aineiden imeytymisen kannalta tärkeän solukalvon rakenteessa saattaa tapahtua muutoksia lämpötilan vaikutuksesta (McFarland 1959, Ross ja Ross 1984). Niinpä käytettävää pitoisuutta olisi kokeiltava aina paikallisissa olosuhteissa ennen varsinaista käyttöä mahdollisten virhearvioiden estämiseksi (Klontz ja Smith 1968, Bell 1987).

Nukutusaineiden vaikutusmekanismeja on tutkittu kaloilla melko vähän. Rossin ja Rossin (1984) mukaan nukutusaineiden teho perustuu keskushermoston lamaantumiseen. Aineet vaikuttavat estämällä aksonien toiminnan tai välittäjäaineiden vapautumisen. Ilmeisesti ne vaikuttavat hermosolukalvojen ärtyvyyteen. Usein alempia selkärankaisia nukutettaessa tarvitaan suurempi nukutusaineannos kuin vastaavan kokoisille nisäkkäille. Tämä käännteinen suhde tietyn nukutusasteen ja evoluution välillä on selitettävissä sillä, että evoluution mukana aktiivisten kohtien (reseptoreiden) määrä on lisääntynyt (Ross ja Ross 1984).

Nukutusaine ei saa olla kalalle eikä myöskään ihmiselle myrkyllinen. Suomessa ei kalojen nukutusaineiden käytöstä ole erityistä lakia, joka hyväksyisi tai hylkäisi nukutusaineen ja, jonka perusteella niiden käyttöä valvottaisiin. Myöskään mitään varoaikaa nukutettujen kalojen käytöstä ravinnoksi ei ole säädetty.

1.2. Työn tarkoitus

MS 222 on yleisimmin Suomessa käytettyjä nukutusaineita. MS 222 lamauttaa kalan hengityskeskukseen ja siten kalan hengitysliikkeet lakkaavat. Hengitysliikkeiden loputtua hapen osapaine kalan elimistössä laskee eli syntyy hypoksinen tila (Mattson ja Ripple 1989). Hypoksian kautta MS 222 vaikuttaa myös veren pH:hon ja ionitasapainoon (Soivio ym. 1977, Iwama ym. 1988). Näinollen MS 222 ei kalan fysiologian kannalta ole paras mahdollinen nukutusaine. Kaikki kalanviljelijätäkään eivät ole täysin tyytyväisiä MS 222:en nukutustehokkuuteen. Uusien aineiden käytölle on esiintynyt halukkuutta.

Tässä tutkimuksessa on tarkoitus etsiä maailmalla saatavista nukutusaineista sekä kalanviljelijöitä että tutkijoita tyydyttäviä aineita.

2. Aineisto ja menetelmät

2.1. Tutkimuksessa käytettyjä nukutusaineita

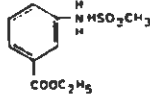
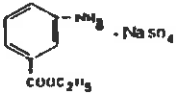
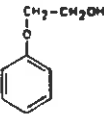
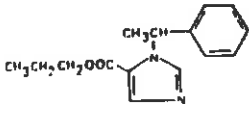
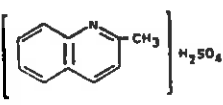
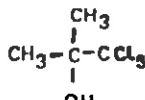
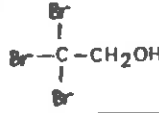
Käytettävän nukutusaineen valintaan vaikuttavat useat seikat. Aineen käytön tulisi olla helppoa. Haluttu nukutusaste olisi saavutettava suhteellisen nopeasti, noin 3-5 minuutissa. Virkoamisen tulisi myös olla nopeaa (5-10 minuuttia). Halutun nukutusasteen tulisi säilyä riittävän kauan. Usein käytännön työssä käsitellään melko suuria kalamääriä, jolloin osa kaloista joutuu olemaan nukutushauteessa pitkiäkin aikoja. Tämä asettaa nukutusaineelle vaatimuksen laajoista sietorajoista. Nukutusaineen tulisi poistua kalan elimistöstä riittävän nopeasti.

Kirjallisuus esittelee kalojen nukutusaineita useita kymmeniä. Suurin osa niistä on kuitenkin aika harvoin käytettyjä käytön hankaluuden, karsinogeenisten eli syöpää aiheuttavien tai muiden epäedullisten ominaisuuksien takia. Kalojen nukutusaineita on tutkittu melko vähän ja suurin osa tutkimuksista keskittyy muutamaankin yleisesti käytettyyn aineeseen. Useimmat tutkimuksista on tehty jo 60-luvulla ja ne pohjautuvat nisäkäsfysiologiaan. Uudempaa, nimenomaan kalafysiologian pohjalta tutkittua tietoa nukutusaineista on vaikea saada. Tähän tutkimukseen on valittu mahdollisia vaihtoehtoja nykyisin Suomessa yleisesti käytettävän MS 222:den tilalle. Tutkimuksessa käytettyjen aineiden kemiallisia ominaisuuksia on kerätty taulukkoon 2.

MS 222 eli trikaiini eli m-aminobentsoaatti metaanisulfonaatti on tutkittu ja tunnettu nukutusaine (Bell 1987). Erittäin vesiliukoisena (125g/100ml vettä, 20 °C) sitä on helppo käyttää kenttäolosuhteissakin (Bell 1987). Vesiliuoksessa MS 222 saattaa hajota auringonvalossa ja olla merivedessä myrkyllistä kaloille (Klontz ja Smith 1968, Bell 1987).

Hajoamisen estämiseksi kantaliuos olisi säilytettävä valolta suojattuna. Liuos säilyy jonkin aikaa tehokkaana, vaikkakin aktiivisuus saattaa hieman laskea säilytyksen aikana. Kantaliuos voidaan säilyttää pakastettuna, jolloin se on käyttökelpoista pidemmän aikaa. Myös kuiva MS 222 olisi syytä säilyttää pakastimessa.

Taulukko 2. Tutkimuksessa käytettyjen nukutusaineiden kemiallisia ominaisuuksia. Lähteinä käytetty teoksia Dictionary of drugs: Chemical data, structures and bibliographies 1990, Comprehensive Medical Chemistry 6 1990, Martindale, The extra Pharmacopoeia 1982/1989 ja Index Nominum: International drug directory 1990/1991.

nukutus- aine	molekyyli- paino	kemiallinen kaava	rakenne kaava
MS 222	261.31	$C_{10}H_9NO_5S$	
menokaiini			
fenoksi- etanoli	138.20	$C_8H_{10}N_2$	
propoksaatti	258.32	$C_{15}H_{18}N_2O_2$	
kinaldiini- sulfaatti	241.47	$C_{10}H_9N H_2SO_4$	
klorbutoli	177.47	$C_4H_7Cl_3O$	
tribromo- etanoli	282.79	$C_2H_3Br_3O$	

MS 222 imeytyy lähinnä kidusten läpi diffuusion tai kantajavälitteisen kuljetuksen avulla (Houston ja Woods 1976, Hunn ja Allen 1974, Ferreira ym. 1984). Imeytymistä edistää emäsosan suuri rasvaliukoisuus ja kidusepiteelin yli vallitseva pitoisuusero ja nukutusaineen sitoutuminen plasman proteiineihin (Hunn ja Allen, 1974). Ihon läpi kulkeutuvan nukutusaineen osuus riippuu kalalajista. MS 222 eritetään pääosin kidusten kautta (Hunn ja Allen 1974). MS 222 on vahvan hapon (metaanisulfonaatti) ja heikon emäksen (etyyli aminobentsoaatti) suola. Sen alhainen dissosiaatiovakio ($pK_a = 3.5$) (Ferreira ym. 1984) aiheuttaa sen, että pH:ssa 7 suurin osa nukutusvaikutuksen kannalta merkittävästä emäsosasta on vapaana (Wedemeyer 1970). Pehmeän veden ($CaCO_3$ -pitoisuus < 50 mg/l) pH laskee MS 222:den vaikutuksesta. pH:n lasku aiheuttaa kalassa Bohr- ja Root-efektit, jolloin veren hapenkuljetusominaisuudet muuttuvat lähinnä hemoglobiinin hapensitomis- ja hapenkuljetuskyvyn heikentyessä (Nikinmaa 1986). pH:n lasku voidaan estää puskuroimalla vesi natriumbikar-

bonaatilla (Bell 1987) tai natriumhydroksidilla (Barton ja Peter 1982, Burleson ja Smatresk 1987). MS 222-kantaliuosta ei kuitenkaan pidä puskuroida, koska etyyli aminobentsoaatti saattaa saostua (Allen ja Harman 1970). Kovassa vedessä ei puskurointia tarvita, koska veden kalsiumkarbonaatti toimii puskuroivana tekijänä (Wedemeyer 1970, Burleson ja Smatresk 1987).

Fenoksietanoli on väritön, aromaattinen neste. Veteen se liukenee vain lievästi (2.6 ml/100 ml vettä, +25 °C)(Klontz ja Smith 1986, Bell 1987). Vettä painavampana ja öljymäisenä se saattaa jäädä astian pohjalle pisaroiksi, joten huolellinen ravistus ennen käyttöä on tarpeen. Fenoksietanolin on todettu olevan bakteerikasvua estävä (Ross ja Ross 1984, Bell 1987). Aineen turvallisuusmarginaali, eli tehokkaan ja kuolettavan pitoisuuden ero, on suuri (Sehdev ym. 1963). Heidän mukaansa +11°C:ssa kuolettava pitoisuus on yli 3 kertaa suurempi kuin tehokas pitoisuus. Kylmemmässä vedessä ero on vielä suurempi. Fenoksietanoli alkoholina poistuu maksan metaboloimana suhteellisen nopeasti, mitä osoittaa myös verrattain lyhyet toipumisajat (Puceat ym. 1989). Puceat'in mukaan fenoksietanoli estää glykogenolyysin toiminnan toisin kuin MS 222, joka edistää glukoosin vapautumista maksasta. Nisäkkäillä fenoksietanolin on todettu aiheuttavan maksa- ja munuaishäiriöitä (Summerfelt ja Smith 1990) ja todennäköisesti vaikutus on sama myös kaloilla. Käytettäessä pieniä pitoisuuksia saattaa kiputunto olla jäljellä. Heräämisen aikana kaloilla on havaittu hyperaktiivisuutta (Summerfelt ja Smith 1990).

Propoksaatti eli propyyli-dl-1-(1-fenyylietyyli)imidatsoli-5-karboksylaatti hydrokloridi on kehitetty nimenomaan vaihtolämpöisten nukutusaineeksi (Bergström 1967) ja sen on sanottu olevan tehokkuudeltaan satakertainen verrattuna MS 222:en (Thienpont ja Niemegeers 1965). Se pysyy vesiliuoksessa neutraalina (Bell 1987). Propoksaatti, kuten sen analogit etomidaatti ja metomidaatti (Amend ym. 1982), ovat hypnoottisia, eli ne eivät varsinaisesti aiheuta anestesiaa (Mattson ja Ripple 1989). Siten kiputunto eläimissä saattaa olla jäljellä ja kala reagoi voimakkaasti ensimmäiseen kosketukseen (Bergström 1967). Toipumisajat kaikilla näillä nukutusaineilla ovat hyvin pitkiä (Amend ym. 1982).

Kinaldiinisulfaatti on vaalean keltaista kiteistä ainetta, joka toisin kuin kinaldiini liukenee helposti veteen. Allenin ja Sillsin (1973) mukaan liukoisuus veteen on 104.5 g/litra. Se saattaa vesiliuoksena ärsyttää limakalvoja (Summerfelt ja Smith 1990). Kuten MS 222, myös kinaldiinisulfaatti alentaa nukutushauteen pH:ta, pehmeässä vedessä pitoisuudella 80 mg/litra

pH:sta 6.55 jopa pH:hon 3.86 (Marking ja Dawson 1973). pH:n laskiessa alle kuuden yhdiste ionisoituu ja menettää tehokkuutensa (Gilderhus ym. 1973), koska syntyvä kinaldinium-ioni ei ole enää rasvaliukoinen (Hunn ja Allen, 1974). Nukuttava aineosa on nimenomaan ionisoitumaton yhdiste. Kinaldiini eritetään kalasta sellaisenaan kidusten kautta (Hunn ja Allen 1974, Brandenburger Brown ym. 1973). Nukutusaine saattaa muodostaa vähitellen saostumia vesiliuoksessa, joten nukutushauteen pitoisuutta olisi hyvä tarkistaa pidemmissä nukutuksissa (Lambert 1982). Markingin ja Dawsonin (1973) mukaan kinaldiinisulfaatti on lämpimässä vedessä kaloille vähemmän myrkyllinen kuin kylmässä vedessä.

Klorbutolin eli 1,1,1-trikloro-2-metyyli-2-propanolin liukoisuus kylmään veteen on hyvin huono (0.8 g/100 ml). Kuumaan veteen se liukenee verrattain hyvin (McFarland ja Klontz 1969). Klorbutoli kuitenkin höyrystyy helposti jopa huoneenlämmössä. Yhdiste on halogenoitu alkoholi ja sen vesiliukoinen osa on alkoholinen hydroksyyli; muu osa on erittäin rasvaliukoinen. Se ei ionisoidu. Kala saattaa klorbutolinukutuksen ja siitä toipumisen aikana haukkoa ilmaa veden pinnalla. Aistiradat toimivat klorbutolinukutuksen aikana, vaikka liikeimpulssien kulku onkin estynyt. Tämä saattaa aiheuttaa lihaskouristuksia (Mattson ja Ripple 1989).

Tribromoetanoli on myös halogenoitu alkoholi. Siinä on lievä aromaattinen tai eetterimäinen tuoksu. Sen liukoisuus veteen on huono, mutta paranee lämmitettäessä liuosta noin +40°C (McFarland ja Klontz 1969). Sen yli ei pitäisi lämmittää, sillä tribromoetanoli on hyvin helposti haihtuvaa. Vesiliuoksessa yhdiste hajoaa dibromoasetaldehydiksi ja vetybromidiksi, jotka ovat ärsyttäviä aineita (McFarland ja Klontz 1969). Tribromoetanoli eritetään maksan kautta glukuronaattikonjugaattina ulos.

2.2. Aineisto

Työ tehtiin Itä-Suomen keskuskalanviljelylaitoksessa vuosina 1989-1990. Koekaloina käytettiin syksyllä -89 kaksikesäisiä (1+) Sorsakosken kannan järvitaimenia (*Salmo trutta lacustris*). Kalat painoivat syksyllä 110.8 ± 3.5 g (keskiarvo \pm keskiarvon keskivirhe) ja olivat 22.1 ± 0.2 cm pitkiä, talvella 139.3 ± 3.8 g ja 23.6 ± 0.2 cm sekä keväällä 133.3 ± 4.3 g ja 24.4 ± 0.3 cm. Kalat siirrettiin pari viikkoa ennen kokeita 2.1 m² lasikuitualtaksiin, jotka peitettiin muovipeitteillä. Altaat oli sijoitettu halliin. Altaksiin johdettiin 30 litraa minuutissa Ylä-Enonveden vettä, jonka laatu on esitetty taulukossa 3. Valaistusrytmi hallissa oli L8:D16.

Taulukko 3.
Ylä-Enonveden veden laatu.
Arvot ovat peräisin ISKKVL:n vesilaboratorion vedenlaaturekisteristä.

lämpötila pvm	happipitoisuus (°C)	johtokyky (mg/l)	pH (mS/m)	
16.10.1989	6.6	8.2	7.9	7.1
05.02.1990	1.9	11.2	7.2	6.9
14.05.1990	9.2	11.2	7.1	6.9

2.3. Menetelmät

Kokeiden väliajat kaloja ruokittiin käsin kaksi kertaa vuorokaudessa. Kaksi vuorokautta ennen kokeita ruokinta lopetettiin. Pitoisuus- ja toleranssikokeisiin kalat haavittiin suoraan altaista nukutushauteisiin. Varsinaista nukutuskoetta ja näytteenottoa varten kalat sumputettiin yksittäin mustiin polyeteeniputkiin noin kaksi vuorokautta ennen koetta. Nukutusastiat olivat PE-muovia ja hauteen tilavuus oli kymmenen litraa. Haudetta ilmastettiin koko ajan. Kokeet tehtiin 16.9.-28.10.1989, 8.2.-25.2.1990 ja 13.5.-7.6.1990. Kokeiden ajankohdat ja veden kulloinenkin lämpötila on esitetty taulukossa 4.

2.3.1. Pitoisuuskoe

Sopivan nukutusasteen määrittämiseksi valituista nukutusaineista kokeiltiin kirjallisuuden ohjearvojen mukaan useita pitoisuuksia. Nukutusaineista tehtiin kantaliuokset, joita laimentamalla saatiin haluttu pitoisuus. Nukutushauteeseen siirrettiin kaksi kalaa kerrallaan ja haude vaihdettiin aina nukutuksen jälkeen. Jokaiselta kalalta mitattiin aika, jona kala saavuttaa sopivan nukutusasteen ja aika, jona kala virkoaa puhtaaseen veteen siirrettyä.

Nukutuksen katsottiin olevan sopiva, kun kalan uintiliikkeet olivat pysähtyneet ja se kääntyi selälleen. Toipumisajaksi laskettiin aika siirrosta puhtaaseen veteen siihen, kunnes kala ui taas aktiivisesti. Virkoamista ei autettu tekohengityksellä. Kalojen reagointia toimenpiteisiin seurattiin jäljittelemällä todellista Carlin-merkintätilannetta työntämällä injektioneula kalan lihaksen läpi selkäevän alapuolelta sekä mitattiin pituus ja paino. Kokeen aikana tarkasteltiin kalan yleistä käyttäytymistä.

Taulukko 4.
Kokeiden ajankohdat ja veden kulloinenkin lämpötila

käytetty nukutusaine	pvm	lämpötila(°C)
kontrolli	23.10.1989	6.5
	12.02.1990	2.2
	15.05.1990	9.6
MS 222	28.10.1989	6.5
	25.02.1990	2.2
	15.05.1990	9.6
menokaiini	27.10.1989	6.6
	20.02.1990	2.2
	03.06.1990	12.5
fenoksietanoli	23.10.1989	6.6
	13.02.1990	2.1
	19.05.1990	9.4
propoksaatti	26.10.1989	6.7
	16.02.1990	2.1
	28.05.1990	10.9
kinaldiinisulfaatti	26.10.1989	6.7
	22.02.1990	2.2
klorbutoli	28.10.1989	6.5

2.3.2. Toleranssi- eli sietokoe

Pitoisuuskokeen perusteella valittiin sopiva pitoisuus kustakin nukutusaineesta: MS 222, 150 mg/litra vettä; menokaiini, 150 mg/l; fenoksietanoli, 0.3 ml/l; propoksaatti, 2 mg/l; kinaldiinisulfaatti, 20 mg/l; klorbutoli, 300 mg/l; tribromoetanoli, 500 mg/l. Hauteeseen haavittiin 5 kalaa. Kalat siirrettiin yksitellen puhtaaseen veteen viiden minuutin välein eli 5, 10, 15, 20 ja 25 minuuttia nukutuksen aloittamisesta. Toipumisaika mitattiin. Jokaiselle nukutusaineelle tehtiin neljä sarjaa. Tehdyn sarjan jälkeen haude vaihdettiin.

2.3.3. Nukutuskoe ja näytteenotto

Koekalat (10 kalaa/nukutusaine) laitettiin mökeistä suoraan nukutushauteisiin. Siirto kesti noin 5 sekuntia. Nukutusainepitoisuudet olivat samat kuin pitoisuuskokeessa. 10 minuutin altistuksen jälkeen kaloista otettiin näytteet. Kontrollikalat tainnutettiin iskulla päähän.

Verinäyte (noin 0.6 ml) otettiin pyrstösuonista 1ml heparinoidulla (NH₄-heparinaatti) injektioruiskulla. Verestä määritettiin heti hematokriitti (Hct) sentrifuugilla (3 min, 9000 G). 10 ul verta otettiin mikropillaariin ja sekoitettiin 3 ml:n hemoglobiinireagenssia (ferri-syanidiliuos). Loput verestä sentrifugoitiin kahdessa Spinco-putkessa ja plasmat erotettiin putkiin, jotka pakastettiin nestetyypeen. Valkosolut ja päällimmäinen kerros punasoluja poistettiin. Loput punasolut säästettiin. Verinäytteenoton jälkeen kala punnittiin ja mitattiin. Vesipitoisuuden määrittämistä varten otettiin kalan aivot ja valkoista lihasta selkävän alapuolelta Eppendorf-putkiin. Histologista tutkimusta varten kalan ensimmäisestä kiduskaaresta prepa-roitiin pala, joka fiksoitiin muovikaseteissa 4% formaldehydissä. Jokaisen kalan sukupuoli määritettiin.

2.4. Analytiikka

Näytteet tutkittiin Helsingin Yliopiston Eläintieteen laitoksella Soivion ja Virtasen (1980) mukaan. Veren hemoglobiinipitoisuus (Hb) mitattiin spektrofotometrillä (Shimadzu CL-720, Micro Flow Spectrophotometer) syanmethemoglobiinimenetelmällä. Laskennallisesti määritettiin MCHC eli punasolujen keskimääräinen hemoglobiinipitoisuus ($MCHC = Hb/Hct$). Plasmasta määritettiin kloridipitoisuus kloridititraattorilla (CMT 10, Chloride Titrator, Radiometer, Copenhagen) sekä natrium- ja kaliumpitoisuudet liekkifotometrillä (FLM 3, Flame Photometer, Radiometer, Copenhagen). Natrium- ja kaliummittausta varten plasma laimennettiin 1:200 laimentimella kuten seerumistandardikin. Toinen punasoluputkista kuivattiin +105°C:ssa 24 tuntia ja määritettiin punnitsemalla solujen vesipitoisuus. Toisen putken punasolut punnittiin ja lisättiin 500 ul 0.6 M perkloorihappoa proteiinien denaturoimiseksi. Sakka erotettiin sentrifugoimalla 2 minuuttia 15 500 G. (Haemofuge 780, Heraeus-Christ, GMBM). Supernatantista määritettiin kloridipitoisuus kloridititraattorilla (CMT 10, Chloride Titrator, Radiometer, Copenhagen) sekä natrium- ja kaliumpitoisuudet liekkifotometrisesti (FLM 3, Flame Photometer, Radiometer, Copenhagen). Kloridititraattori kalibroitiin 5ul:lla 1 M NaCl ja mittaus tehtiin 50 ul:sta näytettä. Natrium- ja kaliumnäytteet laimennettiin siten, että kokonaislaimennukseksi (PCA ja laimennin) tuli noin 1:200. Tulokset laskettiin soluvettä kohti. Vesipitoisuudet lihas- ja hermokudoksesta määritettiin kuten punasoluistakin.

2.5. Histologia

4% formaldehydillä 24 tuntia kestäväidyt kidukset vietiin nousevan alkoholisarjan kautta parafiiniin. Niistä leikattiin 5 um:n leikkeitä, jotka kiinnitettiin munanvalkuaisglyserolilla objektilaseille. Leikkeet värjättiin Masson-Gomorin menetelmällä ja peitettiin Entellanilla (Tuurala ja Oikari 1976).

2.6. Tilastollinen tarkastelu

Aineisto käsiteltiin tilastollisesti Studentin t-testillä. Tilastollinen merkitsevyys on ilmoitettu seuraavasti: NS = $P > 0.10$, o = $P < 0.10$, * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$ ja *** = $P < 0.001$ (Mäkinen 1974).

3. Tulokset

3.1. Pitoisuus- ja sietokokeet

3.1.1. MS 222

MS 222:n pitoisuuden ollessa 50 mg litrassa vettä, kalat saavuttivat tyydyttävän nukutusasteen 5 minuutissa. Suuremmalla pitoisuudella (100-200 mg/l) aste saavutettiin 2-4 minuutissa. Molemmissa pitoisuuksissa heräämiseen käytetty aika oli keskimäärin 3 minuuttia syksyllä ja keväällä. Talvella toipuminen vei pitemmän ajan (3-6 minuuttia). Pitoisuudella 200 mg/l ei aikoihin tullut eroja. Kalat sietivät 100 milligrammaa MS 222:a litrassa vettä hyvin syksyllä ja talvella. Vielä 25 minuutin nukutuksen jälkeen kalat toipuivat keskimäärin kymmenessä minuutissa. Keväällä nukutusajan ollessa yli 15 minuuttia toipumisaikojen vaihtelut olivat suuria. Osalla kaloista kesti yli puoli tuntia virota. Kolme kalaa kahdestakymmenestä kuoli.

3.1.2. Menokaiini

50 milligrammassa menokaiinia litrassa vettä kalat olivat rauhallisia ja tasapaino hävisi viidessä minuutissa. Kalat reagoivat kuitenkin vielä toimenpiteisiin. Siirrettäessä puhtaaseen veteen ne myös toipuivat välittömästi. Pitoisuudella 100-200 mg/litra nukahtaminen tapahtui

noin 3 minuutissa ja kalat olivat erittäin helppoja käsitellä. Virkoaminen nukutuksesta vei saman ajan. Talvella ajat olivat muutaman minuutin pitempiä. Kalojen sietokyky syksyllä oli heikko, jopa niin, että yli 15 minuuttia nukutushauteessa pidetyt kalat kuolivat. Talvella ja keväällä tilanne oli toinen - toipumisajat pysyivät alle kymmenen minuutin, ja jopa pienenevät nukutuksen pidentyessä.

3.1.3. Fenoksietanoli

Pitoisuudella 0.2 ml fenoksietanolia litrassa vettä kalat reagoivat käsittelyyn, vaikka olivat menettäneet tasapainonsa. Suuremmissa pitoisuuksissa (0.3-0.4 ml/litra) toivottu nukutusaste saavutettiin nopeasti, syksyllä ja keväällä 1.5-3 minuutissa, talvella hitaammin, noin 4-5 minuutissa. Samoin toipuminen oli nopeaa, joskus jopa liiankin nopeaa. Nukutusajan pidentäminen ei sanottavasti vaikuttanut virkoamiseen. 25 minuutin nukutuksen jälkeen kalat toipuivat 10 minuutissa. Pitoisuudesta riippumatta kalat olivat nukutuksen aikana rauhallisia, joillakin kaloista esiintyi lieviä pakkoliikkeitä. Hengitysliikkeet olivat tasaisia ja rauhallisia.

3.1.4. Propoksaatti

Propoksaatti nukutti kalat tehokkaasti pitoisuudella 2-3 mg/litra vettä. Tällöin kalat nukahtivat 2-4 minuutissa. Talvella, kylmässä vedessä haluttu nukutusaste saavutettiin vieläkin nopeammin (1-2 minuutissa). Tasapainon menetys tapahtui nopeasti, jopa minuutissa, mutta kalojen uintiliikkeet jatkuivat. Herääminen nukutuksesta saattoi kestää yli 20 minuuttia. Kalat alkoivat kyllä uida pian päästyään puhtaaseen veteen, mutta tasapainon saavuttaminen kesti. Toipumisen aikana kalat haukkoivat henkeään veden pinnalla. Nukutetut kalat olivat huomattavan limaisia. Pidentetty nukutus aiheutti toipumisajan pidentymisen. Jo 15 minuutin nukutuksen jälkeen herääminen kesti lähes tunnin, ja lyhyemmilläkin nukutusajoilla kalat virkosivat vasta 20-30 minuutin kuluttua puhtaaseen veteen siirtämisestä.

3.1.5. Kinaldiinisulfaatti

Alhaisella kinaldiinisulfaattipitoisuudella (10 mg/litra) kalat eivät nukkuneet 10 minuutin nukutuksen jälkeenkään. Useimmat menettivät tasapainonsa verrattain nopeasti, mutta reagointi ärsytykseen oli voimakasta. Täten niiden käsittely oli lähes mahdotonta. Pitoisuuden ollessa 20 mg kinaldiinisulfaattia litrassa vettä kalat saavuttivat jonkinlaisen narkoosin

keskimäärin 4 minuutissa, keväällä hitaammin. Nukutuksen aikana hengitysliikkeet olivat nopeita ja epäsäännöllisiä. Herääminen nukutuksesta tapahtui nopeasti, noin 2-3 minuutissa. Kalat "yskivät" ajoittain voimakkaasti. Niiden iho oli erittäin limainen ja vaaleni nukutuksen aikana. Suurennettaessa pitoisuutta tyydyttävän nukutusasteen saavuttamiseen tarvittava aika piteni, jopa niin, että pitoisuudella 60 milligrammaa kinaldiinisulfaattia litrassa vettä kalat eivät menettäneet tasapainoaan kymmenessä minuutissa. Kalat kestivät 20 mg/litra-pitoisuutta melko hyvin. Vielä 25 minuutin nukutuksen jälkeen herääminen tapahtui 6-9 minuutissa.

3.1.6. Klorbutoli

Klorbutolia kokeiltiin vain syksyllä käytön hankaluuden takia. Pitoisuudessa 300 mg klorbutolia litrassa vettä kalat nukahtivat keskimäärin 5 minuutissa. Nukutusaste ei kuitenkaan ollut tyydyttävä, sillä kalat reagoivat toimenpiteisiin. Ne myös saivat ajoittain lihaskouristuksia. Herääminen oli suhteellisen nopeaa, noin neljässä minuutissa. Kalojen hengitys oli vaikeaa ja epäsäännöllistä heräämisen aikana. Toipumisaika venyi 20 minuuttiin yli 15 minuutin nukutuksessa. Kaksi kalaa kahdestakymmenestä kuoli pidemmän nukutuksen aikana. Klorbutolihaude haisi voimakkaasti kamferilta. Haju kuitenkin haihtui nopeasti.

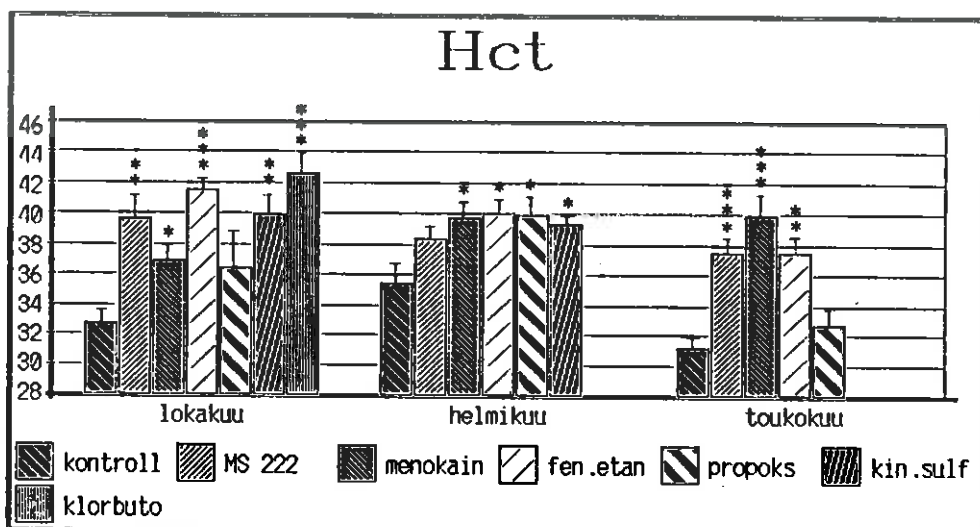
3.1.7. Tribromoetanoli

Myös tribromoetanolia käytettiin vain syksyllä, koska sillä oli lähes mahdotonta saavuttaa kalan käsittelyn kannalta sopivaa nukutusastetta. Pitoisuuden ollessa alle 20 mg/litra vettä kalat olivat rauhallisia, mutta ne eivät nukkuneet. Suuremmilla pitoisuuksilla (100-300 mg/l) kalat menettivät tasapainonsa alle 10 minuutissa, mutta reagoivat voimakkaasti käsittelyyn. Käytettäessä suurempia pitoisuuksia palautuminen oli hidasta. Kalat yrittivät uida, mutta tasapainon saavuttaminen saattoi kestää jopa tunnin 20 minuutin nukutuksen jälkeen. Hengitysliikkeitä oli lähes mahdoton havaita 10 minuutin nukutuksen jälkeen. Hengityksen palautuminen normaaliksi oli hidasta.

3.2. Fysiologiset arvot

3.2.1. Veren hematokriitti, hemoglobiini ja MCHC

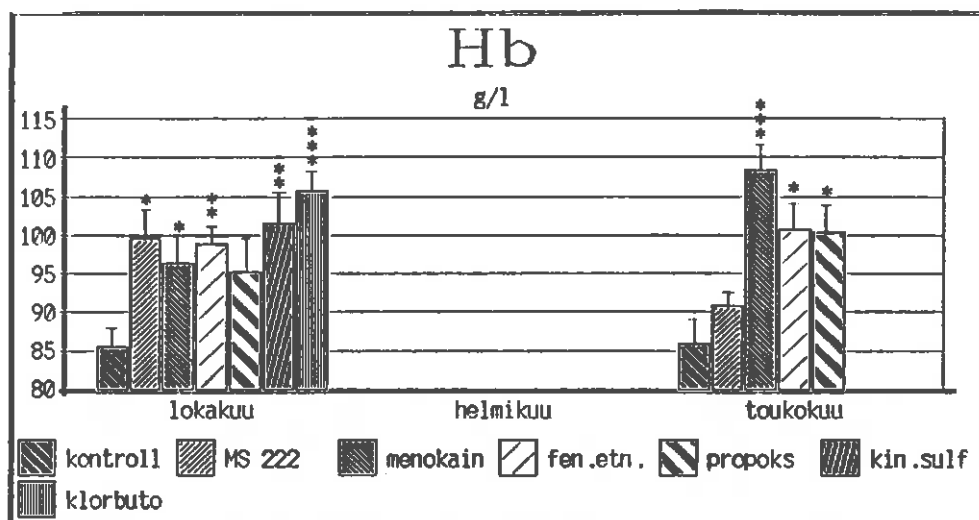
Veren hematokriittiarvot olivat kaikissa koeryhmissä suurempia kuin verrokkiarvot. Propoksaattilla nukutetut kalat eivät poikenneet merkitsevästi verrokkiryhmästä. Talven nukutuksissa veren hematokriittiarvot eivät olleet merkitsevästi verrokkeja suurempia yhdessäkään ryhmässä (kuva 1). Propoksaattilla nukutettujen ja verrokkikalojen veren hematokriittiarvot olivat suurimpia talvella ($p < 0.05$ ja $p < 0.01$). MS 222-, fenoksisetanoli- ja kinaldiinisulfaattiryhmien kalojen veren Hct-arvot olivat suurimmillaan syksyllä, pienentyen kevättä kohti. Menokaiininukutuksen aikana kalojen veren hematokriittiarvot reagoivat päinvastoin, eli kasvoivat kevättä kohti.



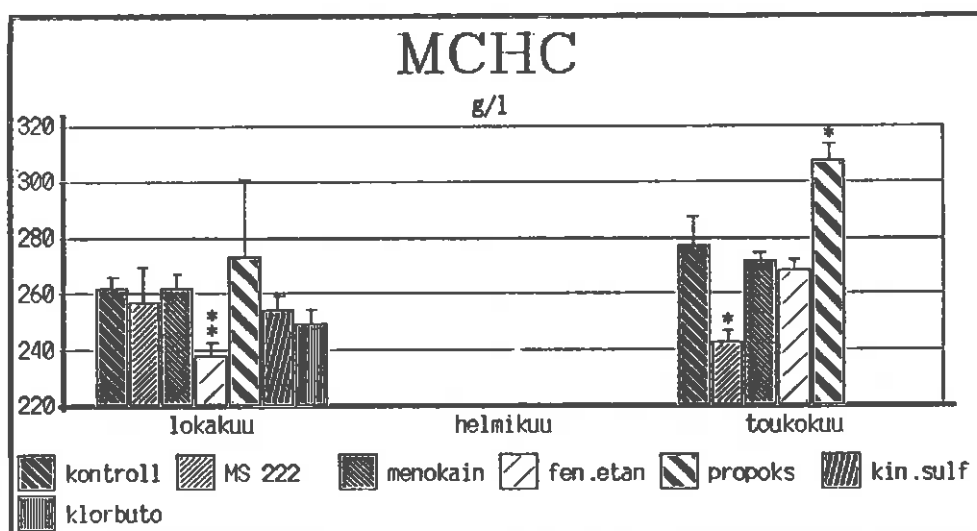
Kuva 1. Järvitaimenen veren hematokriittiarvo 10 minuutin nukutuksen jälkeen eri näytteenottoaikoina. Tarkemmat päivämäärät ja lämpötilat on esitetty taulukossa 3. Pylväät kuvaavat ryhmien keskiarvoja + keskiarvon keskivirhe ($n=10$), tilastolliset merkitsevyydet on laskettu Studentin t-testillä; tilastollisten merkkien selitykset tekstissä.

Nukutettujen kalojen veren hemoglobiinipitoisuudet olivat kaikissa ryhmissä suurempia kuin verrokkikaloissa. Erot olivat tilastollisesti merkitseviä vain syksyn fenoksisetanoli-, kinaldiinisulfaatti- ja klorbutanoliryhmien sekä kevään menokaiiniryhmän kalojen veressä (kuva 2). Talvella veren hemoglobiiniarvoja ei mitattu. MS 222:lla nukutettujen kalojen veren hemoglobiinipitoisuus oli pienempi keväällä kuin syksyllä. Muihin nukutusaineisiin hemoglobiinivaste oli päinvastainen.

Hemoglobiinin suhteellinen osuus punasoluista (MCHC) vastasi lähes kaikkien nukutusaineryhmien kalojen verissä verrokkikalojen arvoja. Suurempi se oli keväällä propoksaattilla ($p < 0.01$) nukutettujen kalojen veressä ja pienempi syksyllä fenoksetanolilla ($p < 0.01$) sekä keväällä MS 222:lla ($p < 0.05$) nukutettujen kalojen veressä (kuva 3). MS 222-ryhmän kalojen veressä MCHC oli pienempi keväällä kuin syksyllä. Muiden nukutusaineryhmien kalojen veressä MCHC-arvot olivat suurempia keväällä kuin syksyllä, fenoksetanoliryhmän kaloilla jopa merkitsevästi.



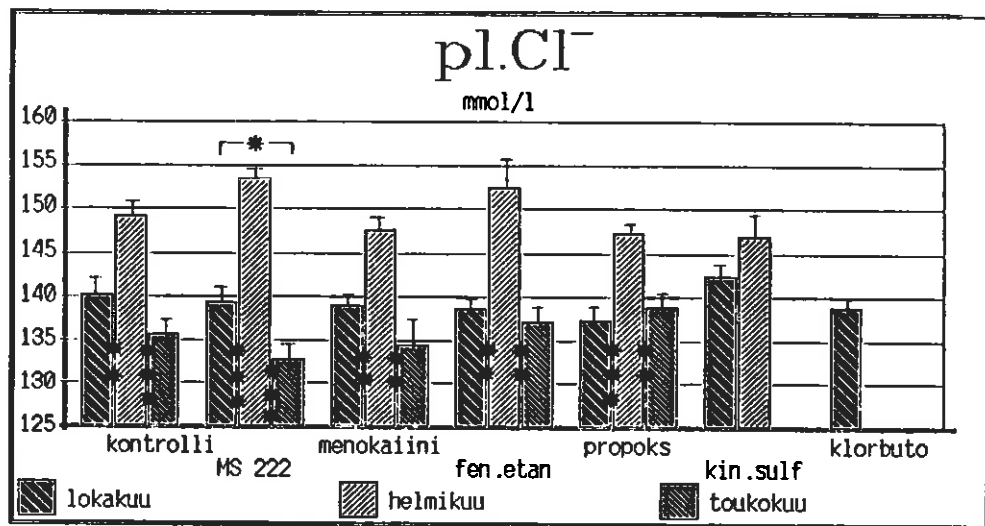
Kuva 2. Järvitaimenen veren hemoglobiinipitoisuus 10 minuutin nukutuksen jälkeen eri näytteenottoaikoina. Selitykset kuten kuvassa 1.



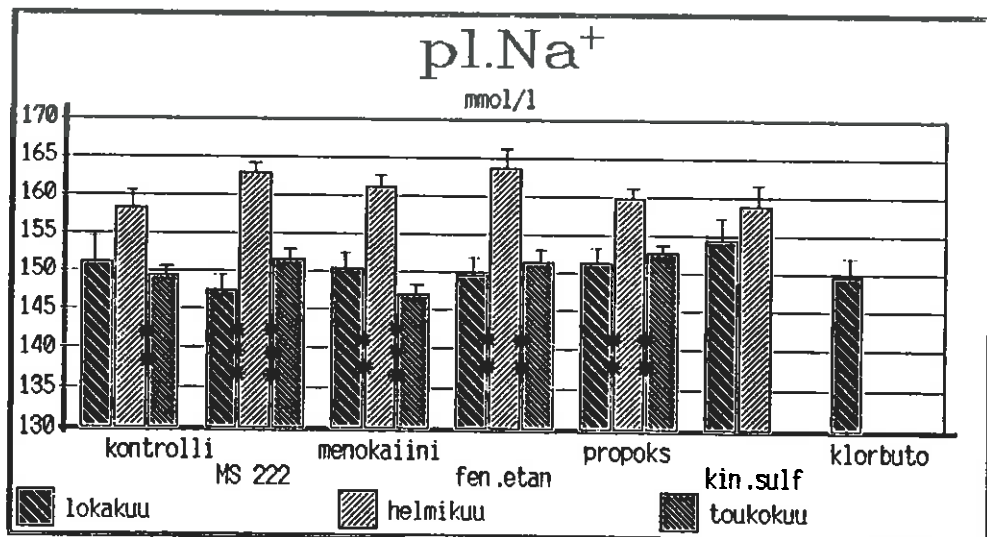
Kuva 3. Järvitaimenen veren MCHC-arvo 10 minuutin nukutuksen jälkeen eri näytteenottoaikoina. Selitykset kuten kuvassa 1.

3.2.2. Plasman ionipitoisuudet

Koeryhmien kalojen plasman kloridipitoisuudet eivät poikenneet tilastollisesti merkitsevästi verrokkien plasman kloridipitoisuuksista. Talvella arvot olivat kaikissa nukutetuissa ryhmissä merkitsevästi suurempia kuin syksyllä ja keväällä. Plasman Cl^- -pitoisuudet olivat pienimmät keväällä nukutetuissa kaloissa. Plasman natriumpitoisuuksien vaihtelut muistuttivat kloridipitoisuuksien vaihteluita. Näytteenottoajankohdan vaikutus koekalojen plasman natriumpitoisuuksiin ei ollut yhtä suuri kuin plasman kloridipitoisuuksiin (kuvat 4 ja 5).

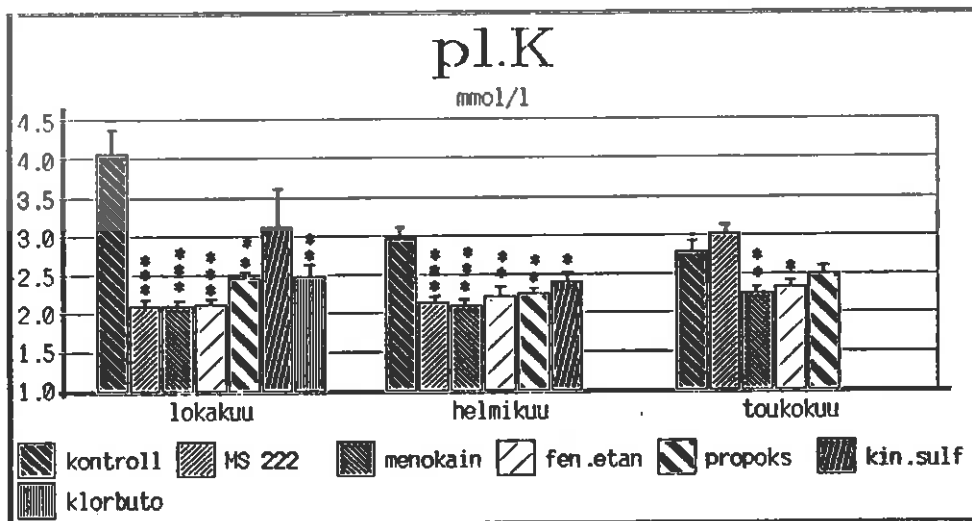


Kuva 4. Järvitaimenen plasman kloridipitoisuus 10 minuutin nukutuksen jälkeen eri näytteenottoaikoina. Selitykset kuten kuvassa 1.



Kuva 5. Järvitaimenen plasman natriumpitoisuus 10 minuutin nukutuksen jälkeen eri näytteenottoaikoina. Selitykset kuten 1.

Verrokkikalojen plasman kaliumpitoisuudet olivat suuria, syksyllä jopa 4.06mmol/l. Syksyllä ja talvella kaikkien muiden paitsi kinaldiinisulfaattiryhmän kalojen plasman kaliumpitoisuudet olivat merkitsevästi pienempiä kuin verrokkikalojen ($p < 0.01$). Keväällä MS 222-ryhmän kalojen plasman kaliumpitoisuudet olivat suurempia kuin verrokkiryhmän kalojen, ei kuitenkaan tilastollisesti merkitsevästi. Muiden nukutusaineryhmien kalojen plasman K^+ -pitoisuudet olivat vähän verrokkipitoisuuksia pienemmät (NS) (kuva 6). Verrattaessa saman nukutusaineen eri näytteenottoaikoja toisiinsa oli eroja vain kolkattujen kalojen plasman kaliumpitoisuuksissa, jossa syksyllä arvot olivat tilastollisesti suurempia, ja MS 222:lla nukutettujen kalojen plasman kaliumpitoisuuksissa, jossa keväällä arvot olivat tilastollisesti pienempiä kuin muina näytteenottoajankohtina.



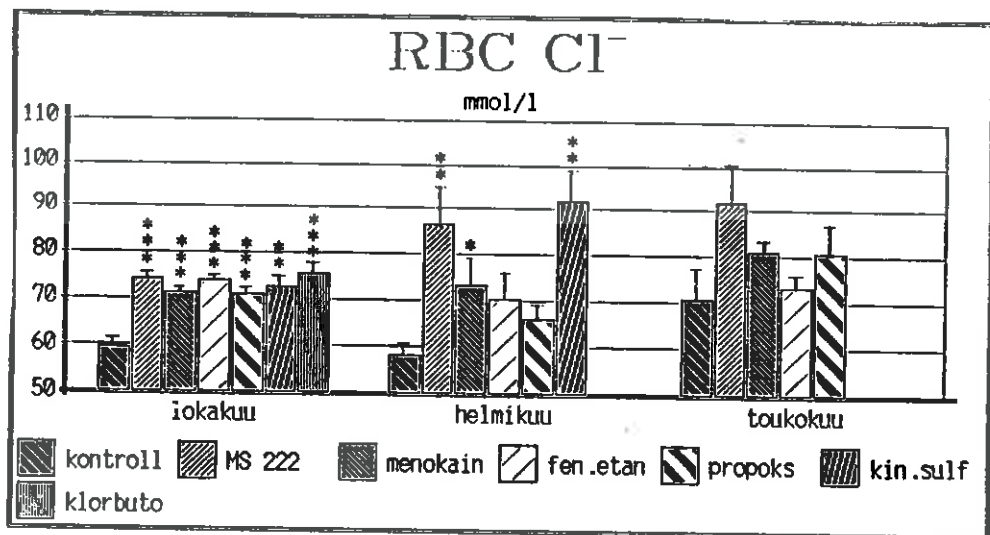
Kuva 6. Järvitaimenen plasman kaliumpitoisuus 10 minuutin nukutuksen jälkeen eri näytteenottoaikoina. Selitykset kuten kuvassa 1.

3.2.3. Punasolujen ionipitoisuudet

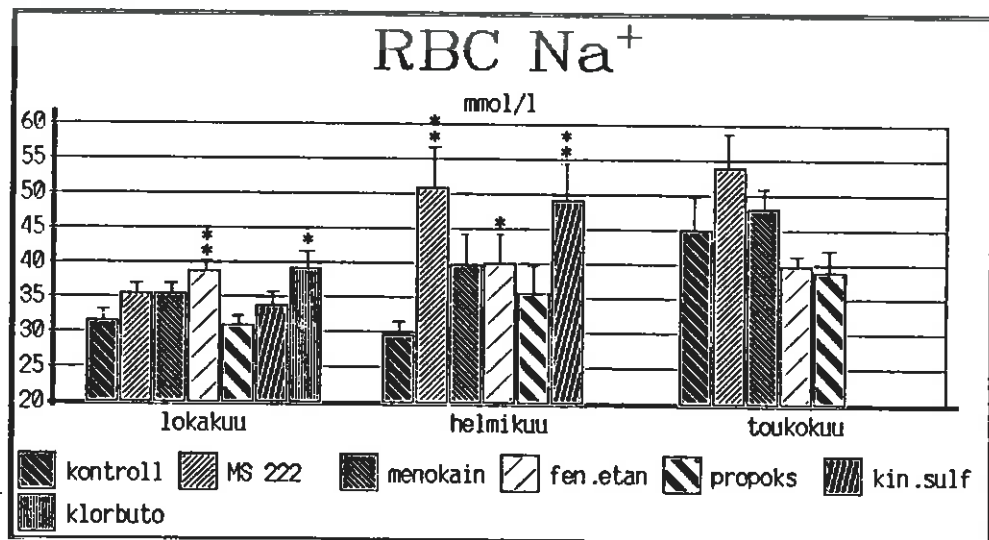
Syksyllä kaikkien koeryhmien kalojen punasolujen kloridipitoisuudet olivat merkitsevästi suurempia kuin verrokkiryhmän kalojen punasoluissa. Nukutusaineryhmien välillä ei ollut vaihtelua. Talvella ja keväällä erot eri nukutusaineryhmien kalojen punasolujen kloridipitoisuuksissa olivat suuret, vaikka tilastollisesti ne eivät olleetkaan niin merkitseviä kuin syksyllä. Tämä johtunee suurista hajonnoista. Talvella erot nukutettujen kalojen punasolujen Cl^- -pitoisuuksiin olivat merkitsevät kinaldiinisulfaatilla ja MS 222:lla ($p < 0.01$) sekä menokaiinilla ($p < 0.01$) nukutettujen kalojen punasoluissa. Muissa nukutusaineryhmissä punasolujen kloridipitoisuudet olivat suurempia kuin verrokkikalojen punasolujen kloridi-

pitoisuudet, vaikkakaan eivät merkitsevästi (kuva 7). Punasolujen kloridipitoisuus kasvoi kevättä kohti kaikilla muilla paitsi fenoksietanolilla nukutetuilla kaloilla, joissa pitoisuus oli lähes sama näytteenottoajankohdasta riippumatta.

Punasolujen natriumpitoisuudet noudattelivat samaa linjaa kuin kloridipitoisuudet. Syksyllä vertailuryhmän ja nukutusaineryhmien punasolujen natriumpitoisuuksissa erot eivät olleet niin suuret kuin kloridipitoisuuksissa. Merkitsevästi suurempia natriumpitoisuuksia mitattiin vain fenoksietanolilla ja klorbutolilla nukutettujen kalojen ($p < 0.01$) punasoluista. Talvella suurempia natriumpitoisuuksia oli fenoksietanoliryhmän ($p < 0.05$) sekä kinaldiinisulfaatti- ja MS 222-ryhmien ($p < 0.01$) kalojen punasoluissa.



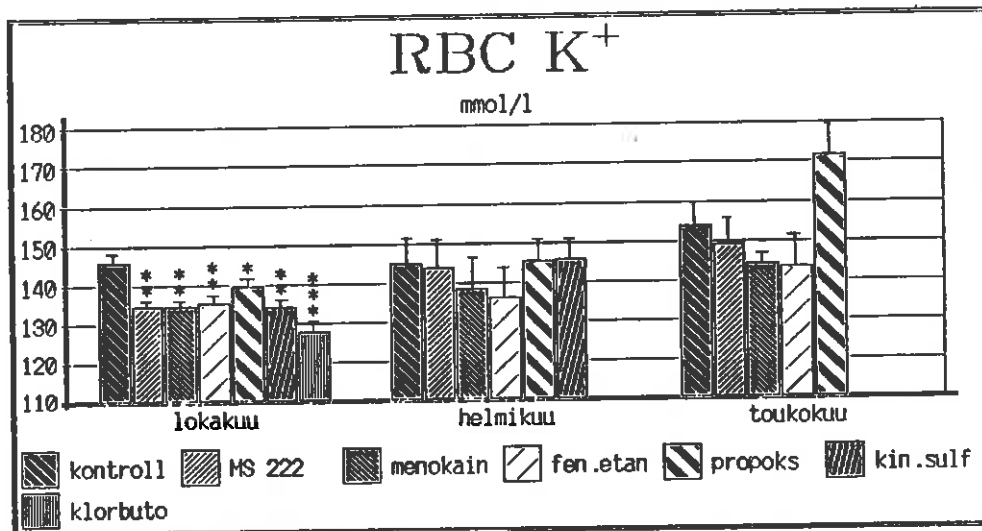
Kuva 7. Järvitaimenen punasolujen kloridipitoisuus 10 minuutin nukutuksen jälkeen eri näytteenottoaikoina. Selitykset kuten kuvassa 1.



Kuva 8. Järvitaimenen punasolujen natriumpitoisuus 10 minuutin nukutuksen jälkeen eri näytteenottoaikoina. Selitykset kuten kuvassa 1.

Muiden nukutusaineryhmien kalojen punasolujen natriumpitoisuuksissa ei ollut merkitseviä eroja, vaikka ne olivatkin korkeampia kuin verrokkikalojen punasolujen natriumpitoisuudet. Keväällä ei mikään nukutusaineryhmä poikennut tilastollisesti merkitsevästi verrokkiryhmästä, vaikka erot olivatkin melko suuret. Kuten punasolujen kloridipitoisuudetkin, myös natriumpitoisuudet suurenivat kevättä kohden (kuva 8).

Syksyllä kaliumpitoisuudet olivat kaikkien nukutusaineryhmien kalojen punasoluissa pienempiä kuin verrokkikalojen punasoluissa. Menokaiinilla ja MS 222:lla nukutettujen kalojen punasolujen kaliumpitoisuuksissa erojen merkitsevyys oli vain suuntaa-antava, muissa nukutusaineryhmissä ne olivat merkitsevästi pienempiä. Muissa näytteenotoissa ei eroja nukutettujen ja verrokkikalojen punasolujen välille muodostunut. Kaikki kalojen punasolujen kaliumpitoisuudet olivat pienempiä tai lähes samoja kuin verrokkikalojen punasolujen kaliumpitoisuudet. Poikkeuksena kevään propoksaattiryhmän kalojen punasolut, joiden kaliumpitoisuudet olivat suurempia, tosin merkitsevyys oli vain suuntaa-antava. Myös kalojen punasolujen kaliumpitoisuudet suurenivat kevättä kohti (kuva 9).

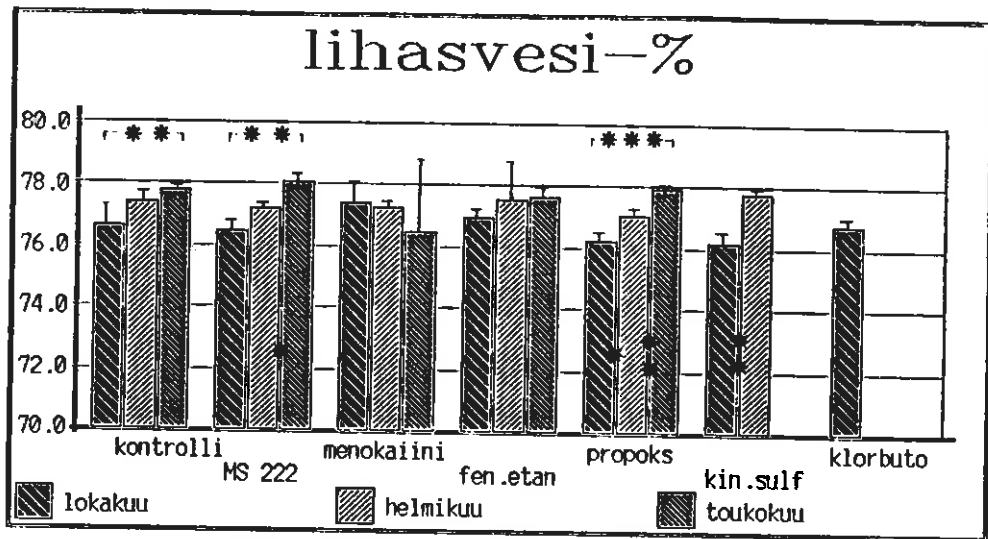


Kuva 9. Järvitaimenen punasolujen kaliumpitoisuudet 10 minuutin nukutuksen jälkeen. Selitykset kuten kuvassa 1.

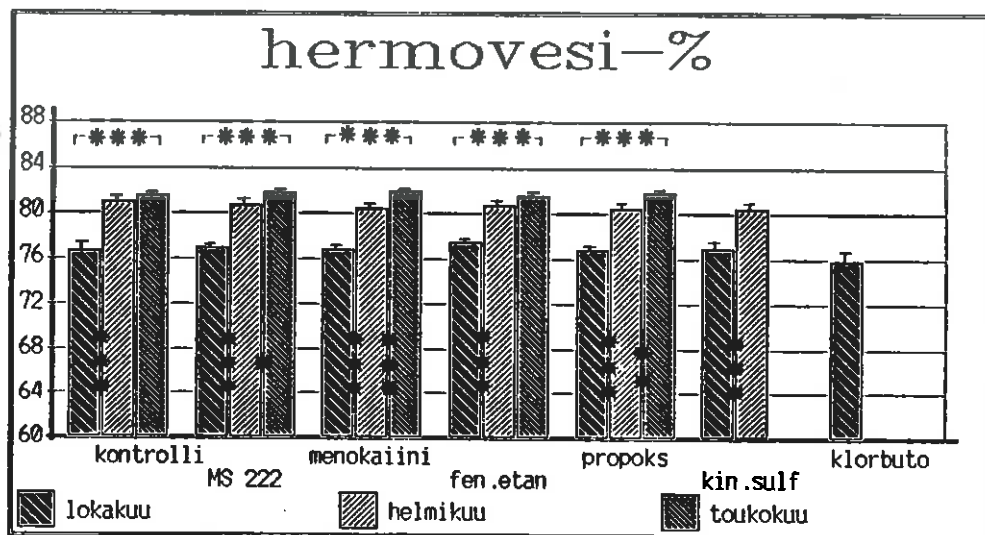
3.2.4. Lihaksen, aivojen ja punasolujen vesipitoisuus

Lihaksen vesipitoisuudessa ei koeryhmien ja verrokkiryhmän kalojen välillä ollut eroja. Eroja ei myöskään saatu kalojen aivojen vesipitoisuuksissa. Hermokudoksen vesipitoisuudet olivat kaikkien nukutusaineryhmien kaloissa pienimmät syksyllä ja suurimmat keväällä.

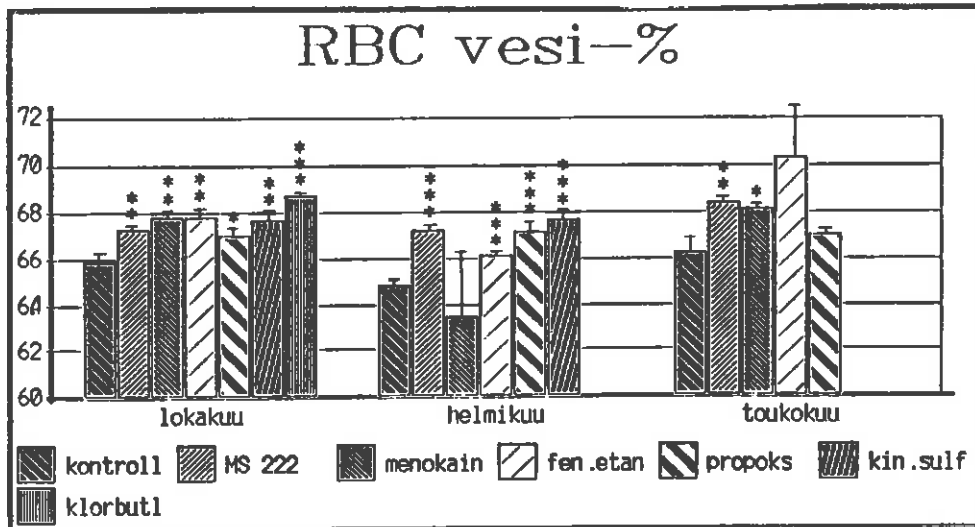
Ero syksyn ja kevään välillä oli tilastollisesti merkitsevä. Myös kalojen lihaskudoksen vesipitoisuudet kaikissa muissa nukutusaineryhmissä paitsi menokaiiniryhmässä olivat pienimmät syksyllä, ei kuitenkaan tilastollisesti merkitsevästi (kuvat 10 ja 11). Punasolujen vesipitoisuudet olivat kaikilla koeryhmän kaloilla suurempia kuin verrokkiryhmän kaloilla, poikkeuksena talvella menokaiinilla nukutettujen kalojen punasolut, joissa vesipitoisuudet olivat verrokkiryhmän kalojen punasolujen vesipitoisuuksia pienempiä. Keväällä erot kolkattuihin kaloihin eivät olleet tilastollisia (kuva 12).



Kuva 10. Järviheimen lihaksen vesipitoisuus 10 minuutin nukutuksen jälkeen. Selitykset kuten kuvassa 1.



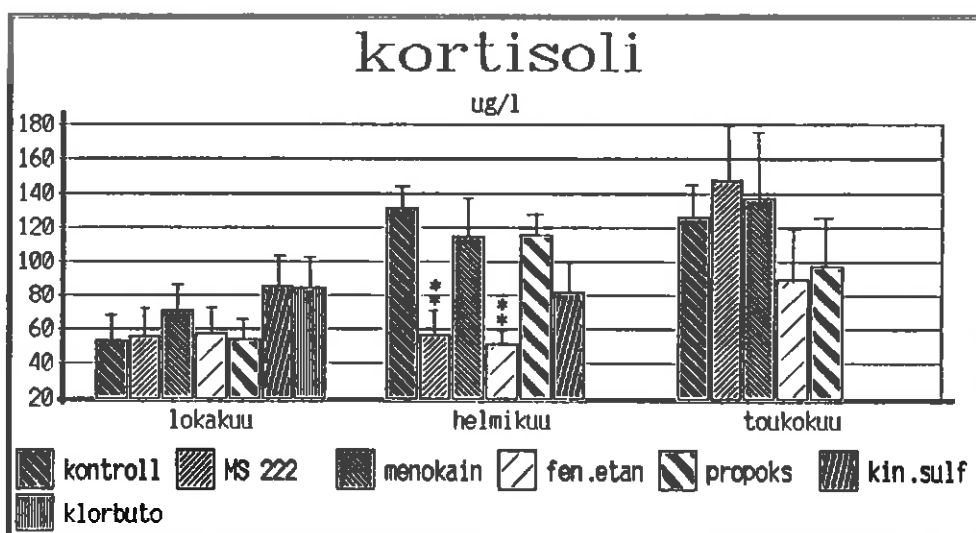
Kuva 11. Järviheimen aivojen vesipitoisuus 10 minuutin nukutuksen jälkeen. Selitykset kuten kuvassa 1.



Kuva 12. Järvitaimenen punasolujen vesipitoisuus 10 minuutin nukutuksen jälkeen. Selitykset kuten kuvassa 1.

3.2.5. Plasman kortisolipitoisuus

Syksyllä nukutettujen kalojen plasman kortisolipitoisuudet olivat samantasoisia tai vähän suurempia kuin verrokkikalojen plasman kortisolipitoisuudet. Talvella verrokkipitoisuudet olivat suurempia kuin muut, nukutettujen kalojen plasman kortisolipitoisuudet. Tilastollisesti pienempiä plasman kortisolipitoisuuksia mitattiin fenoksietanolilla ja MS 222:lla nukutetuissa kaloissa. Keväällä tilastollisia eroja ei nukutusaine- ja verrokkiryhmien välillä ollut (kuva 13).



Kuva 13. Järvitaimenen plasman kortisolipitoisuus 10 minuutin nukutuksen jälkeen. Selitykset kuten kuvassa 1.

Kaikkien koeryhmien kalojen plasman kortisolipitoisuudet olivat syksyllä pienempiä kuin muina näytteenottokertoina. Fenoksietanolilla ja MS 222:lla nukutetuilla kaloilla vielä talvella plasman kortisolipitoisuudet pysyivät alhaisina, mutta niilläkin pitoisuudet olivat keväällä suuremmat.

3.3. Histologia

Yleisesti ottaen kalojen kidukset olivat suhteellisen hyväkuntoisia. Minkäänlaisia nukutusaineen aiheuttamia rakennevaurioita ei voitu havaita. Nukutusaineryhmien kalojen kidukset eivät poikenneet toisistaan vaan kaikissa oli sekä hyviä että huonoja. Joissain kidusleikkeissä oli havaittavissa lievää epiteelien irtoamista ja rypistymistä. Kidusten epiteelien pinnalta löydettiin loisia, jotka määritettiin *Trichophyra* sp.:ksi (Post 1987). Niitä esiintyi kaikkina näytteenottokertoina, mutta erityisesti keväällä. Kloridisolujen määrä kalojen kiduksissa oli suuri talvella ja keväällä.

4. Tulosten tarkastelu

Pitoisuus- ja toleranssikokeissa pyrittiin löytämään sopiva nukutusainepitoisuus. Halutun nukutusasteen arvioiminen oli kuitenkin hankalaa. Koska kalat kylmissä vesissä ovat jo ilman nukutusaineitakin rauhallisia, oli lähes mahdotonta sanoa, milloin kalat saavuttivat halutun nukutusasteen. Kalojen reaktiot eri nukutusaineille poikkesivat toisistaan hyvinkin paljon. Mitään yhtenäistä linjaa ei pystytty havaitsemaan. Nukutusasteiden luokittelu onkin tehty lähinnä nisäkäsfysiologian lähtökohdista eikä siten välttämättä vastaa kalojen reaktioita. Lisäksi erilaisiin ympäristöolosuhteisiin sopeutuneet kalat reagoivat eri tavoin nukutusaineisiin. Useimmat tutkimuksista on tehty lämpimän veden kaloilla. Suomen kylmissä olosuhteissa tilanne poikkeaa varmasti tropiikin tilanteesta.

Nukutushauteen pH vaikuttaa nukutuksen tehokkuuteen ja kalan fysiologiseen tilaan. Toisaalta nukutusaine itse voi muuttaa veden kemialla. Tulosten tarkastelua olisi varmasti helpottanut, jos nukutushauteen pH, tai mahdollisesti muitakin arvoja, olisi mitattu.

4.1. Nukutusainepitoisuudet ja sietokyky

Tässä tutkimuksessa käytetty MS 222-pitoisuus 100-200mg/litra vettä vastasi yleisiä suosituksia (Klontz ja Smith 1968, McFarland ja Klontz 1969, Stuart 1981, Ross ja Ross 1984, Bell 1987). Eri tutkimuksissa on käytetty pienempiä nukutusainepitoisuuksia kalojen siirroissa kuin muissa toimenpiteissä. Myöskin nukutus- ja toipumisajat olivat odotettujen kaltaisia. Poikkeuksena tähän oli keväällä havaittu kalojen sietokyvyn pieneneminen pidennettäessä nukutus-aikaa MS 222-nukutuksessa. Samaan aikaan kanyloitujen järvitaimenten toipumisessa todettiin myös vaikeuksia (Itäluoma, julkaisematon tieto). Marking (1967) on todennut MS 222:n olevan myrkyllisempää lämpimässä vedessä. Piikkimonni toipuu hitaammin MS 222-nukutuksesta lämpimässä vedessä kuin kylmässä vedessä (Huish 1972). Myös kuolleisuus nousi merkittävästi lämpimässä vedessä. Tässä työssä käytetyt kalat smolttiutuivat keväällä (eli muuttuivat jokipoikasesta vaelluspoikaseksi) ja olivat siten herkemässä fysiologisessa tilassa kuin syksyllä. Myös menokaiinin olettaisi MS 222:n sukulaisena käyttäytyvän samoin. Näissä molemmissahan nimenomaan nukuttava ainesosa on sama. Ero rakenteessa vaikuttaa lähinnä aineen liukoisuuteen veteen. Kalat kuitenkin kestivät keväällä nukutusta menokaiinilla hyvin. Kalojen kannalta herkin aika oli mahdollisesti jo mennyt ohi, sillä menokaiininukutus suoritettiin vasta kesäkuun puolella, kun veden lämpötila oli +12,5°C.

Fenoksietanoli toimi tehokkaasti eli nukutti kalat suhteellisen helposti. Kirjallisuudessa esiintyviä viittauksia siihen, että kiputunto kaloilla saattaisi olla jäljellä (Ross ja Ross 1984), ei havaittu. Kalat toipuivat nukutuksesta jo käsittelyn aikana, mikä viittaa siihen, että nukutus ei ollut riittävän syvä. Sehdevin ym. (1963) tutkimukset, joiden mukaan fenoksietanolin turvallisuusmarginaali on korkea, tukevat tehtyjä havaintoja, joiden mukaan kalat virkosivat nopeasti riippumatta nukutusajasta. Toimivan ja tappavan pitoisuuden ero kasvaa kylmässä vedessä (Sehdev ym. 1963), jopa niin että +4°C vedessä punalohi toipuu vielä 12 tunnin nukutuksesta.

Vaikkakin propoksaatti onkin kehitetty vaihtolämpöisten eläinten nukutusaineeksi, löytyy siitä kirjallisuutta melko vähän. Metomidaattia ja etomidaattia on tutkittu enemmän. Bergström (1967) on nukuttanut lohikaloja propoksaatilla ja laskenut LD₅₀-arvoja (pitoisuus, jossa kuolleisuus on 50 %) eri lämpötiloissa. Hänen mukaansa +9.5°C voi pitoisuudella 2.5 ppm (2.5 mg/litra) pitää kalaa nukutushauteessa 15 minuuttia ilman riskiä. Lämpötilan laskiessa turvallinen pitoisuus suurenee. Edellä mainittu pitoisuus vastaa hyvin tässä tutkimuksessa

havaittua tehokasta pitoisuutta. Tässä tutkimuksessa propoksaatilla nukutetut kalat toipuivat hitaasti. Pitkiä toipumisaikoja ovat havainneet myös Mattson ja Ripple (1989) nukuttaessaan turskia metomidatilla.

Sopiva kinaldiinisulfaattipitoisuus tässä tutkimuksessa oli 20-30 milligrammaa litrassa. Samanlaisia pitoisuuksia ovat käyttäneet Gilderhus ym. (1973). Marking ja Dawson (1973) ovat mitanneet kinaldiinisulfaatin LC_{50} -arvoja. Heidän mukaansa nämä arvot vaihtelevat suuresti riippuen kalalajista sekä veden kovuudesta ja pH:sta. On todettu, että kalalla saattavat refleksit säilyä nukutuksen aikana (Gilderhus ym. 1973). Tässäkin tutkimuksessa oli havaittavissa kalojen reagoitua kosketukseen, vaikka kalat olivatkin saavuttaneet tyydyttävän nukutusasteen. Hämmästyttä herättänyt havainto oli, että suurennettaessa kinaldiinisulfaattipitoisuutta kalat eivät enää reagoineetkaan siihen toivotulla tavalla eli eivät nukahtaneet lainkaan. Ilmeisesti kinaldiinisulfaatti vaikuttaa omaan tehokkuuteensa laskemalla nukutusasteen pH:ta niin paljon, ettei nukutuksen kannalta tehokasta muotoa ole enää tarpeeksi jäljellä (Gilderhus ym. 1973). Kinaldiinisulfaatilla nukutetuilla kaloilla havaittiin ihon vaalenemista. Summerfeltin ja Smithin (1990) mukaan kalojen verenpaine laskee nukutuksen aikana. Tämä saattaa aiheuttaa ihossa verenkierron muutoksia. Toisaalta nukutusaineet voivat vaikuttaa ihon melanoforeihin, jotka ovat hermostollisen säätelyn alaisia joko suoraan tai hormonien välityksellä (Prosser 1973).

Sekä klorbutolin että tribromoetanolin käyttö oli hankalaa. Käytettäessä näitä aineita nukkuville näyttävät kalat reagoivat kuitenkin voimakkaasti käsittelyyn. Klorbutoli ilmeisesti haihtui melko nopeasti, jolloin aineen pitoisuus nukutushauteessa väheni nopeasti. Klorbutolilla nukutetut kalat saivat lihaskouristuksia. Myös Mattson ja Ripple (1989) ovat havainneet klorbutolilla nukutetuilla kaloilla vastaavia oireita.

Taulukossa 5 on esitetty tämän tutkimuksen perusteella suositeltavat nukutusainepitoisuudet, sekä käytettäessä näitä pitoisuuksia ajat, joilla kalat nukahtavat ja toipuvat nukutuksesta. Jokaisen nukutuksen kohdalla olisi kuitenkin tehtävä nukutuskoe, jolla selvitetään sopiva pitoisuus paikallisia olosuhteita silmällä pitäen.

4.2. Nukutusaineiden vaikutukset järvitaimenen fysiologisiin arvoihin

MS 222:lla nukutettujen kalojen veren hematokriittiarvon ja hemoglobiinipitoisuuden on havaittu nousevan useissa tutkimuksissa (Houston ym. 1971, Reinitz ja Rix 1977, Soivio ym. 1977). Näiden veriarvojen suureneminen lisää veren hapenkuljetuskykyä, joten ne reagoivat MS 222:n aiheuttamaan hypoksiaan. Toisaalta nämä arvot kohoavat kaikenlaisen käsittelyn vaikutuksesta. Näytteenoton vaikutusta kirjolohen veriarvoihin ovat selvittäneet muun muassa Soivio ym. (1974) ja Railo ym. (1985). Myös hauen veren hematokriittiarvon ja hemoglobiinipitoisuuden on todettu suurenevan käsittelyn vaikutuksesta (Soivio ja Oikari 1976). Tässä työssä pyrittiin ylimääräiset häiriötekijät karsimaan mahdollisimman vähiin, jotta todelliset nukutuksen aiheuttamat vasteet saataisiin kalassa näkyviin. Tutkimuksessa olivat lähes kaikilla nukutetuilla kaloilla veren hematokriittiarvot ja hemoglobiinipitoisuudet lisääntyneet. Ainoastaan keväällä oli MS 222:lla nukutettujen kalojen veren hemoglobiinipitoisuus pieni. Näiden kalojen MCHC oli myös pieni, mikä osoittaa punasolujen turvonneen (Soivio ym. 1974b). Propoksaatilla nukutettujen kalojen veren Hct-arvot ja Hb-pitoisuus eivät

Taulukko 5. Tutkimuksen perusteella järvitaimenelle suositeltavat nukutusainepitoisuudet ja niitä vastaavat havaitut vaikutus- ja toipumisajat. Lämpötilat ovat suuntaa-antavia.

nukutus- aika	pitoisuus litraa kohti	vaikutus- aika (min)	
		+10°C / +2°C	+10°C / +2°C
MS 222	0.1-0.2 g	2 - 4	2 - 4
meno- kaini	0.1-0.2 g	2-3½ / 3-7	1½ - 3½
fenoksi- etanoli	0.3-0.4 ml	2-3½ / 2½-4	1-3 / 3½-5
propok- saatti	2-3 mg	1-5 / 1-2	> 20
kinaldiini- sulfaatti	20-30 mg	2-10 / 2-4	1½ - 3½
klor- butoli	0.3 g	5 - 10	2 - 6
tribromo- etanoli	0.5 g	2½ - 7	3½ - 10

poikenneet verrokkikaloiden arvoista. Ilmeisesti propoksaatti ei vaikuta kaloiden hapen saantiin, koska tarvetta veren hapenkuljetuskyvyn parantamiseen ei ole. Suurten MCHC-arvojen perusteella näyttäisi siltä että, näiden kaloiden punasolut olisivat kutistuneet.

Veren hematokriitin ja hemoglobiinin suurenemista aiheuttaa muun muassa plasmatilavuuden pieneneminen. Vettä joko eritetään ulos kidusten ja munuaisten kautta, tai toisaalta soluväli-tilan vesipitoisuus ja imunesteen tilavuus saattavat suurentua. Ainakin MS 222:n on todettu vaikuttavan solukalvojen läpäisevyyteen. Solukalvojen läpäisyyden muuttuessa veden jakautuminen eri kudosten välillä muuttuu. Toisaalta myös punasolujen lukumäärän muutokset vaikuttavat veren hemoglobiinipitoisuuteen ja hematokriittiarvoon. Punasoluja voi tulla verenkiertoon kalan kudosten verivarastoista. Kaloilla verivarastona toimii lähinnä perna, mutta myös munuainen (Soivio ym. 1974a). Fängen ja Nilssonin (1985) mukaan lohikaloilla pernan painossa on suuria vuodenaikaisia vaihteluita. Reinin lohi saattaa varastoida jopa neljänneksen koko veritilavuudestaan pernaan. Nämä verivarastot tyhjenevät happivajauksen ja useiden lääkeaineiden vaikutuksesta (Fänge ja Nilsson 1985). Pernal toimintaa säätelee autonominen hermosto. Häiriö kalan normaalissa elämässä saa aikaan katekoliamiinien vapautumisen (Mazeaud ja Mazeaud 1981). Nämä aiheuttavat muun muassa pernassa verisuonten supistumisen ja punasolujen vapautumisen verenkiertoon (Fänge ja Nilsson 1985). Joillakin kaloilla, kuten suutari ja ruutana, pernalla toimii säätelee kolinerginen hermostus (Fänge ja Nilsson 1985). Kirjolohella ei verisolujen määrä munuaisessa pienene MS 222-nukutuksen aikana, joten punasoluja ei mitään ilmeisemmin vapaudu verenkiertoon. Plasmasta kylläkin siirtyy nestettä munuaiskudokseen (Soivio ym. 1974a). Tässä tutkimuksessa todennäköisesti myös kolkatuilla kaloilla verivarastot tyhjenevät ja vaikuttavat myös verrokkikaloiden veren hematokriittiarvoihin ja hemoglobiinipitoisuuteen kuten nukutetuilla kaloillakin. Soivion ja Nikinmaan (1981) mukaan hypoksian aikainen pernan painon muutos vastaa vain noin 2% veritilavuuden suurenemisesta, joten se tuskin selittää hemoglobiinin ja hematokriitin muutosta.

Myös punasolujen uudismuodostus aiheuttaa hematokriitin ja hemoglobiinin nousua. Kaloilla erytropoiesi eli punasolujen syntyminen tapahtuu lähinnä etumunuaisessa. Ahvenella ja särjellä punasoluja syntyy myös pernassa (Yamamoto ym. 1980). On kuitenkin hyvin epätodennäköistä, että uusia soluja ehtisi muodostua 10 minuutin nukutuksen aikana.

Punasolujen tilavuutta kuvaava suure, MCHC, ei tässä tutkimuksessa ole nukutetuilla kaloilla muuttunut. MCHC:n pieneneminenhän kuvastaa punasolujen turpoamista (Soivio ym 1974b). Soivio ym. (1977) ovat todenneet punasolujen turpoavan MS 222- ja bentsokaiininukutuksen aikana. Punasolujen turvotessa niiden sisäinen ATP-pitoisuus pienenee (ATP/Hb-suhde ei muutu), jolloin myös solun sisäinen pH suurenee. pH:n nousu parantaa esimerkiksi hypoksisen lohikalan veren happiaffiniteettia (Soivio ja Nikinmaa 1981). Solujen turvotessa tapahtuva hemoglobiinin laimeneminen lisää omalta osaltaan myös veren happiaffiniteettiä (Soivio ja Nikinmaa 1981). Punasolun tilavuuden muutoksia voidaan selittää sekä adrenergisen vasteen että veren pH:n ja hapen osapaineen muutoksilla (Nikinmaa 1986). Muun muassa Iwama ym. (1989) ovat mitanneet kirjolohen veren pH:n ja pO_2 :n pienenemistä fenoksietanoli-, metomidaatti- ja MS 222-nukutuksen aikana. Myös Soivio ym. (1977) ovat havainneet MS 222:n aiheuttavan veren hapen osapaineen ja pH:n pienenemistä lohikalan veressä. Veren katekoliamiinien pitoisuuden kohotessa sekä kloridi että natriumpitoisuus nousee Cl^-/HCO_3^- - ja Na^+/H^+ - vaihtajien aktivoituessa (Nikinmaa 1986), kuten tässä tutkimuksessa on käynyt syksyllä fenoksietanolilla nukutettujen kalojen punasoluissa. Näiden solujen MCHC:kin on laskenut. Syksyllä muilla nukutusaineilla nukutettujen kalojen punasolujen noussut kloridipitoisuus viittaa veren pH:n ja hapen osapaineen laskuun, koska natriumpitoisuus ei ole reagoinut. Talvella ja keväällä MS 222:lla nukutettujen kalojen punasolut näyttäisivät reagoineen myös adrenaliiniin ja turvonneen. Samoin talvella kinaldiinisulfaatilla nukutettujen kalojen punasolut.

Plasman ioni- ja kudosten vesipitoisuuksissa ei ole nukutusaineista johtuvia eroja. Willfordin (1970) mukaan MS 222 ei aiheuta aivojen vesipitoisuudessa muutoksia. Hän on havainnut myös, että vesipitoisuudessa esiintyy vuodenaikaisia vaihteluja. Havainto tukee tämän tutkimuksen tuloksia. Lämpötilan aiheuttamat erot nukutettujen kalojen plasman ionitasapainoon ovat suurempia kuin eri nukutusaineiden aiheuttamat erot. Kylmässä vedessä aineenvaihdunnan hidastuessa aktiiviset kuljetusmekanismit ovat hitaita, jolloin passiiviset, pitoisuuseroihin perustuvat kuljetusmekanismit aiheuttavat ioni- ja vesitasapainon häiriöitä (Davenport 1992). Kudosten vesipitoisuudet olivat keväällä korkeimmillaan. Ilmeisesti kalat eivät olleet vielä täysin sopeutuneet lämpimään veteen, jolloin aktiiviset kuljetussysteemit eivät toimineet täydellä teholla. Menokaiininukutus suoritettiin viimeisenä, jolloin lihaksen vesipitoisuuskin on jo ehtinyt tasaantua. Kirjolohen plasman kaliumpitoisuuden on todettu pienenevän MS 222-nukutuksen aikana (Soivio ym. 1975, Soivio ym. 1977). Tässä tutkimuksessa nukutettujen kalojen plasman kaliumpitoisuus on myös pienempi verrokkikalojen

plasman kaliumpitoisuuteen nähden. Toisaalta verrokkikaloiden tainnuttamiseksi käytetty isku päähän suurentaa plasman K^+ -pitoisuutta. Myös punasolujen kaliumpitoisuus on nukutetuilla kaloilla pienentynyt. Jensenin (1990) mukaan kalium saattaa siirtyä myös soluvälitiloihin.

Kalan etumunuaisen solut reagoivat erilaisiin stressitekijöihin, kuten kylmään, käsittelyyn ja nukutukseen muun muassa erittämällä kortisolia. Kortisolipitoisuus kalan plasmassa nousee myös "luonnollisesti" lohikalan valmistuessa siirtymään makeasta vedestä suolaiseen veteen (Barton ym. 1985). Myös järvitaimenen on todettu smolttiutuvan, vaikkakaan se ei koskaan luonnollisissa olosuhteissa pääsisikään suolaiseen veteen (Soivio ym. 1989). Toisaalta smolttiutuvan kalan plasman kortisolipitoisuudessa tapahtuu erilaisten häiriötekijöiden johdosta herkemmin muutoksia kuin jokipoikasella. Myös tässä tutkimuksessa näkyy selvästi kalojen häiriöherkyyden lisääntyminen kevättä kohti. Kultakalalla on todettu plasman kortisolipitoisuudessa huomattavaa vuorokaudenaikaisvaihtelua (Matty 1985). Nichols ja Weisbart (1984) ovat havainneet lohikalan plasman kortisolipitoisuudessa 1-2 tunnin välein esiintyviä huippuarvoja. Täten häiriintymättömienkin yksilöiden väliset kortisolipitoisuuksien vaihtelut voivat olla hetkellisesti hyvinkin suuria. Kortisoli säätelee kalan vesi- ja elektrolyyttitasapainoa. Esimerkiksi smolttiutuvan lohikalan kidusten Na^+K^+ -ATPaasi-aktiivisuus kasvaa kidusten kloridisolujen lukumäärän lisääntyessä kortisolin vaikutuksesta (Matty 1985, Richman ja Zaugg 1987). Hoarin (1988) mukaan lohikalan vaelluspoikanen alkaa kortisolin, tyroksiinin ja kasvuhormonin vaikutuksesta käyttää rasvoja energiaraaka-aineena hiilihydraatien sijaan. Toisaalta sen rasva-aineenvaihdunta muuttuu siten, että pitkäketjuisten tyydyttymättömien rasvahappojen osuus solukalvoissa kasvaa. Muutokset erilaisten rasvojen suhteellisissa osuuksissa heijastuvat solukalvon fluiditeettiin eli juoksevuuteen ja sitä kautta läpäisevyyteen. Täten nukutusaineiden imeytymis- ja poistumisnopeus saattaa vaelluspoikasella poiketa vastaavista jokipoikasen arvoista. Tämä olisi otettava huomioon annostusta valittaessa.

Bartonin ja Peterin (1982) mukaan kirjolohen plasman kortisolipitoisuus nousee sekä 15 minuutin MS 222-nukutuksen (50 mg/l) että 15 minuutin fenoksietanolinukutuksen (0.5 ml/l) jälkeen. Fenoksietanolilla nukutettujen kalojen plasman kortisolipitoisuudet olivat kuitenkin merkittävästi suurempia kuin MS 222 :lla nukutettujen kalojen. Laidley ja Leatherland (1988) toteavat, että alhainen pitoisuus (62.5 mg/l) aiheuttaa suurentuneen plasman kortisolipitoisuuden kirjolohella, kun taas suurempi pitoisuus (125 mg/l) ei vaikuta sanottavasti kortisolipitoisuuteen. Tämän he selittävät sillä, että riittävän korkea pitoisuus aiheuttaa nukutuksen ennenkuin ACTH-taso ehtii reagoida. Eräässä tutkimuksessa MS 222:n (80 mg/l)

käyttö ennen kalan häirintää pienensi selvästi stressin vaikutusta kalan plasman kortisolipitoisuuteen (Thomas ja Robertson 1991). Myös kinaldiinisulfaattilla (20 mg/l) ja metomidaa-tilla (7 mg/l) oli selvästi stressiä ehkäisevä vaikutus. Toisaalta pitempi nukutus aika itsessään aiheutti suuremmat plasman kortisolipitoisuudet käytettäessä nukuttamiseen MS 222:ta ja kinaldiinisulfaattia. Metomidaatilla nukutettujen kalojen plasman kortisolipitoisuuksissa ei tapahtunut muutoksia. Edellä mainitun tutkimuksen mukaan metomidaatti estää kortikosteroidivasteen estämällä ACTH:n toiminnan. Etomidaatin on todettu vaikuttavan samoin ihmisellä (Klausen ym. 1983). Propoksaatin luulisi toimivan edellisten analogina samoin. Propoksaatilla nukutettujen kalojen plasman kortisolipitoisuudet ovatkin tässä tutkimuksessa verrokkikaloiden plasman kortisolipitoisuuksia pienemmät. Thomas ja Robertson (1991) suosittelevatkin, että metomidaattia ja sen analogeja ei pitäisi käyttää, kun kala asetetaan altiiksi vakaville häiriöille, kuten esimerkiksi kirurgisille toimenpiteille, koska kalan normaalit reaktiot eivät silloin toimi. Tässä tutkimuksessa kalat eivät reagoineet fenoksietanolinukutukseen kortisolin eritystä lisäämällä. Tätä havaintoa tukee Iwaman ym. (1989) tutkimus, jossa kirjolohen plasman kortisolipitoisuus pieneni käytettäessä nukutukseen sekä MS 222:a, fenoksietanolia, että metomidaattia. Verinäytteet oli kuitenkin otettu kanyylin kautta, jolloin toistuva näytteenotto on saattanut laimentaa verta.

Tässä tutkimuksessa havaittiin eri nukutusaineiden aiheuttavan hyvinkin erilaisia vaikutuksia, kun verrattiin erilaisia lämpötiloja ja näytteenottoajankohtia. Kalojen ruumiinlämpö seuraa melko tarkasti ympäröivän veden lämpötilaa. Elliotin (1981) mukaan kalojen ruumiinlämpö on noin 0.6°C korkeampi kuin veden lämpötila, riippuen vähän kalan koosta ja iästä. Vain muutamat hyvin aktiiviset kalat, kuten tonnikala, pystyvät säätelemään ruumiinlämpönsä lähinnä paikallisesti käyttäen hyväkseen lihasten tuottamaa lämpöä (Elliot 1981). Epäsuorasti käyttäytymisen kautta tapahtuva lämmönsäätely on kylläkin hyvin yleistä. Useiden kalalajien on nimittäin luonnonolosuhteissa todettu siirtyvän vesissä lämpötilan mukaan. Eri kalalajeilla optimilämpötilat ovat erilaisia. Esimerkiksi järvitaimenella se on noin 4-19°C ja karpilla 15-32°C (Elliot 1981). Myös eri kehitysasteilla on erilaiset lämpötilaoptimit. Näiden lämpötilarajojen ylä- tai alapuolelle joutuessaan kala stressaantuu. Stressaantumisasteeseen vaikuttaa myös lämpötila, johon kala on sopeutunut. Jos vielä lisätään ylimääräinen stressitekijä, kuten käsittely tai nukutusaineet, saattavat vaikutukset olla kohtalokkaita (Elliot 1981). Veden lämpötila vaikuttaa aineenvaihdunnan muutosten kautta solukalvojen rasvakoostumukseen (Davenport 1992) ja siten ainakin rasvaliukoisten nukutusaineiden imeytymisnopeuteen. ATP:n tuotto eri lämpötiloissa vaihtelee eri kalalajeilla riippuen vuodenaikaisyyklin

vaiheesta ja lämpötilasta, johon ne ovat sopeutuneet. Esimerkiksi nieriän maksasolujen energia-aineenvaihdunta muuttuu siten, että kala alkaa tuottaa kylmässä (+5°C) ATP:tä hiilihydraattien avulla (Johnston ja Dunn 1987). Näin ravinnosta saatavat rasvat voidaan varastoida ja käyttää sukurauhasten raaka-aineena tai vaelluksella energiavarastona. Toisilla lajeilla taas maksan rasvavarastot ovat suurimillaan lämpimässä vedessä (+25°C). Davenportin (1992) mukaan alhaisessa lämpötilassa passiivisten ionivirtojen ja aktiivisten ATP-energialla toimivien pumppusysteemien tasapaino häiriintyy. Tämä tasapaino pystytään säilyttämään vain melko suppealla lämpötila-alueella (Johnston ja Dunn 1987). Nämä eri kuljetussysteemit reagoivat eri tavoin lämpötilan muutoksiin. Davenportin (1992) mukaan passiivisten ionivirtojen Q_{10} -arvo on 1.2-1.4, kun taas aktiivisten mekanismien vastaava arvo on 2-4. Q_{10} -arvo kemialliselle reaktiolle osoittaa kuinka paljon reaktion nopeus muuttuu lämpötilan muuttuessa 10°C (Davenport 1992). Lämpötilan muuttuessa aineenvaihdunnan säätelyyn vaikuttavat välillisesti entsyymeissä tapahtuvat aktiivisuuksien muutokset (Johnston ja Dunn 1987). Johnstonin ja Dunnin (1987) mukaan useat entsyymien aktiivisuuteen vaikuttavat seikat ovat lämpötilasta riippuvia, muun muassa proteiinien konformaatiomuutokset ja erilaisten isoentsyymien muodostus. Myös sytoplasmassa tapahtuu entsyymien aktiivisuuteen vaikuttavia muutoksia lämpötilan muuttuessa. Esimerkiksi lämpötilan lasku muuttaa sytoplasman emäksisemmäksi (Johnston ja Dunn 1987).

4.3. Histologia

Soivio ja Hughes (1978) ovat havainneet MS 222:n aiheuttavan kirjolohen kiduksissa vasodilataatiota eli verisuonten laajentumista. Verisoluja myös kerääntyi kiduslehdyköihin. Tässä tutkimuksessa kidusten histologisessa tarkastelussa ei havaittu minkään nukutusaineen aiheuttavan selviä vaurioita kidusten rakenteeseen. Ilmeisesti laitoskalojen kidusten lähtötaso on jo niin epätasainen, että nukutusaineista johtuvia rakennemuutoksia oli mahdoton paikallistaa. Toisaalta 10 minuutin nukutus on verrattain lyhyt aiheuttaakseen merkittäviä vaurioita. Postin (1987) mukaan koekalojen kiduksissa olevat loiset eivät aiheuta kaloissa suurta häiriötä, joten ne eivät ilmeisesti ole vaikuttaneet tuloksiin.

5. Johtopäätökset

Tämän tutkimuksen tarkoituksenaan oli löytää vaihtoehtoinen nukutusaine MS 222:lle. Mikään tutkituista aineista ei kuitenkaan ollut ylitse muiden. Huonoimpia olivat klorbutoli ja

tribromoetanoli, joita ei tämän tutkimuksen perusteella voi suositella kenellekään. Muilla ainella oli hyvät ja huonot puolensa. Erot nukutusaineiden välillä olivat kuitenkin kokonaisuudessaan hyvin pieniä. Enemmän eroja syntyi eri nukutusajankohtien sekä kalojen fysiologisen tilan vaikutuksesta. Esimerkiksi MS 222-nukutus näytti olevan smolttiutuville taimenille huonompi vaihtoehto kuin fenoksietanolinukutus. Toisaalta fenoksietanolin on todettu aiheuttavan käyttäjillä muun muassa päänsärkyä, käsien tunnottomuutta ja voimattomuutta (Morton 1990). Yleisesti on tutkittu hyvin vähän nukutusaineiden vaikutusta ihmisiin, vaikka myös tämä puoli olisi otettava huomioon.

Tärkeä nukutusaineiden valintaperuste on myös käyttökustannukset. Nimenomaan hinta suhteessa tehokkaaseen pitoisuuteen ratkaisee (Taulukko 6). Kuinka kauan samaa nukutushaudetta voidaan käyttää riippuu kalojen biomassasta. Nukutusaineet myös absorboituvat kaloihin ja siten poistuvat nukutushauteesta eri nopeuksilla.

Mitään tyhjentävää ohjetta siitä, mitä nukutusainetta tulisi käyttää, ei tämän tutkimuksen perusteella voi antaa.

Taulukko 6: Nukutusaineiden hintavertailu. Nukutusaineista on laskettu tehollinen hinta, eli kuinka paljon maksaa 10 litran nukutushaude tietyllä pitoisuudella. Hinnat ovat peräisin Yliopiston apteekin hinnastosta lokakuussa 1991.

Nukutusaine	pitoisuus	tehollinen hinta (mk/10 l)
MS 222	100 mg/l	4,00
fenoksietanoli	0.3 ml/l	1,66
propoksaatti	2 mg/l	0,02
kinaldiinisulfaatti	20 mg/l	1,72
klorbutoli	300 mg/l	1,66
tribromoetanoli	500 mg/l	47,65

Kiitokset

Kiitän FT Antti Soiviota työni ohjauksesta ja ikuisesta optimistisuudesta, koko eläintieteen laitoksen väkeä hyödyllisistä neuvoista ja henkisestä tuesta, ISKKVL:n henkilökuntaa käytännön avusta ja Virpiä yhteistyöstä. Viimeisenä vaan ei vähäisimpänä kiitokset kotiväelle ja Tessulle.

Tiivistelmä

Tutkimuksen tarkoituksena oli etsiä tarjolla olevista kaloille käytetyistä nukutusaineista MS 222:a eli trikaiinia korvaava valmiste, joka olisi tehokas, turvallinen ja taloudellinen.

Tutkimuksessa käytetyt nukutusaineet olivat MS 222, menokaiini, fenoksietanoli, propoksaatti, kinaldiinisulfaatti, klorbutoli ja tribromoetanoli. Tutkimus tehtiin kaksikesäisillä (1+) järvitaimenilla ISKKVL:n tiloissa kolmena eri vuodenaikana. Sopivaa pitoisuutta eri lämpötiloissa haettiin pitoisuus- ja toleranssikokeilla. Kalojen fysiologista vastetta nukutusaineille mitattiin 10 minuutin nukutuksen jälkeen otetuilla veri- ja kudospäytteillä.

Halutun nukutusasteen arvioiminen oli hankalaa. Yleisesti ottaen kylmän veden aikana nukutusaineet nukuttivat hitaammin, mutta toisaalta myös toipuminen oli hitaampaa. Poikkeuksen tähän teki propoksaatti, joka oli talvella nopeampi. Keväällä havaittiin kalojen sietokyvyn MS 222:lle heikkenevän, jopa niin, että kolme kalaa kahdestakymmenestä kuoli.

Mikään tutkituista nukutusaineista ei ole täysin haitaton kalalle. Nukutusaineen kerääntyessä aivojen hengityskeskukseen tiedonvälitys aivojen ja kidusten välillä loppuu ja hengitysliikkeet lakkaavat. Syntyy happivaje. Kala pyrkii tasapainottamaan syntyvää hapen puutetta parantamalla veren hapenkuljetuskykyä, jolloin hematokriitti ja hemoglobiinipitoisuus suurenevat. Hapensaannin tehostamiseen liittyvät myös punasolujen tilavuuksien muutokset, lähinnä punasolujen turpoaminen. Tutkituista nukutusaineista näyttäisi propoksaatti vaikuttavan vähiten näihin veriarvoihin, ainakin syksyllä ja keväällä. Sen huono ominaisuus oli pitkä toipumisaika. MS 222:n käyttö kalojen nukuttamiseen keväällä on arveluttavaa. Tulosten mukaan se aiheuttaa punasolujen turpoamista ja elektrolyyttitasapainon häiriöitä enemmän kuin muut nukutusaineet. Fenoksietanolin kohdalla tilanne oli päinvastainen. Se toimi tyydyttävimminkin keväällä. Klorbutoli ja tribromoetanoli ovat käyttökelpoisia vain lyhyissä nukutuksissa, joissa

pyritään kalojen lievään huumaamiseen. Kivuliaita toimenpiteitä varten ei näillä aineilla saa aikaan riittävän syvää, hallittua nukutusta.

Tämän tutkimuksen perusteella ei voi antaa yksiselitteistä ohjetta siitä, mikä nukutusaine olisi paras. Jokainen nukutuskerta on olosuhteiltaan erilainen. Niinpä olisi aina erikseen harkittava ja testattava, mikä on kalalle turvallisin nukutusaine.

Sammandrag

Undersökningens mål var att av de bedövningsmedel för fisk som finns att tillgå, söka en ersättning för MS 222 dvs trikain. Medlet borde vara effektivt, säkert och ekonomiskt.

De bedövningsmedel som användes i undersökningen var MS 222, menokain, fenoxetanol, propoxat, kinaldinsulfat, klorbutol och tribromoetanol. Undersökningen gjordes med två somrig insjö-öring under tre årstider vid Östra Finlands centralfiskodlingsanläggning. Lämplig koncentration för olika temperaturer söktes genom koncentrations- och toleranstest. Fiskens fysiologiska status mättes genom blod- och vävnadsprov som togs efter 10 minuters anestesi.

Att bestämma graden av anestesi var svårt. Generellt sövdé bedövningsmedlet långsammare då vattnet var kallt, men också återhämtningen var långsammare. Ett undantag var propoxat, vars effekt var snabbare på vintern. På våren tålde inte fiskarna MS 222 lika bra, tre fiskar av tjugo dog.

Inget av de bedövningsmedel som undersöktes var utan olägenheter för fisken. Då bedövningsmedlet samlas i hjärnans andningscentrum upphör informationsutbytet mellan hjärna och gälar och andningsrörelserna upphör. Syrebrist uppstår. Fisken försöker kompensera syrebristen genom att förbättra blodets syretransportförmåga med den följd att hematocrit och hemoglobin höjs. Till den effektivare syreupptagningen hör också förändringar i de rödas blodkropparnas volym, de sväller. Av de bedövningsmedel som undersöktes verkar propoxat påverka dessa blodvärden minst, åtminstone på hösten och våren. Medlets svaghet är den långa återhämtningen. Användning av MS 222 på våren är tvivelaktigt. Enligt resultaten sväller de röda blodkroppar och elektrolytbalansen störs mera än då man använder de andra medlen. Vid användning av fenoxetanol var situationen motsatt. Medlets effekt var mest tillfredsställande på våren. Klorbutol och tribromoetanol är användbara vid korta sövningar,

då man försöker söva fiskarna lätt. För smärtsamma ingrepp får man inte till stånd en tillräcklig djup, kontrollerad anestesi med dessa ämnen.

På basen av denna undersökningen kan man inte ge entydiga anvisningar om vilket bedövningsmedel som skulle vara bäst. Varje gång man söver fisk är förhållandena olika. Alltså bör man alltid överväga och testa vilket bedövningsmedel som är säkrast för fisken.

Kirjallisuus

- Allen, J.L. & Harman, P.D. 1970. Control of pH in MS 222 anesthetic solutions. *Prog. Fish Cult.* 32(2), 10 p.
- Allen, J.L. & Sills, J.B. 1973. Preparation and properties of quinaldine sulfate an improved fish anesthetic. *U.S. Fish. Wildl. Serv., Invest. Fish. Control* 47, 7 p.
- Amend, D.F., Goven, B.A. & Elliot, D.G. 1982. Etomidate: Effective dosages for a new anesthetic. *Transactions of the American Society III*, p. 337-341.
- Barton, B.A. & Peter, R.E. 1982. Plasma cortisol stress response in fingerling rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to various transport conditions, anaesthesia and cold shock. *J. Fish Biol.* 20, p. 39-51.
- Barton, B.A., Schreck, C.B., Ewing, R.D., Hemmingsen, A.R. & Patino, R. 1985. Changes in plasma cortisol during stress and smoltification in Coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 59, p. 468-471.
- Bell, G.R. 1987. An outline of anesthetics and anesthesia for salmonids, a guide for fish culturists in British Columbia. *Can. Data Rep. Fish. Aquat. Sci. No. 1534*, 16 p.
- Bergström, E. 1967. Propoxate as an anaesthetic for salmon (*Salmo salar* L.). Swedish salmo research institute. Report LFI medd. 7.
- Brandenburger Brown, E.A., Franklin, J.E., Pratt, E. & Trams E.G. 1972. Contributions to the pharmacology of quinaldine (uptake and distribution in the shark and comparative studies). *Comp. Biochem. Physiol.* 42A, 223-231.
- Burleson M.L. & Smatresk N.J. 1989. The effect of decerebration and anesthesia on the reflex responses to hypoxia in catfish. *Can. J. Zool.* 67, p. 630-635.
- Comprehensive Medical Chemistry 6. Cumulative Subjects Index & Drug Compendium. Hansch, Sammer & Taylor (toim.). Pergamon Press, 1990.
- Davenport, J. 1992. Animal life at low temperature. Chapman & Hall, London, 246 p.
- Dictionary of Drugs. Chemical data, structures and bibliographies. J. Elks & C.R. Ganellin (toim.). Chapman and Hall, London, 1990.

- Elliot, J.M. 1981. Some aspects of thermal stress on freshwater teleost. *Teoksessa: Stress and fish*, A.D. Pickering (toim.), Academic Press, London, p. 209-245.
- Ferreira, J.T., Schoonbee H.J. & Smit, G.L. 1984. The uptake of anaesthetic benzocaine by the gills and the skin of three freshwater fish species. *J. Fish Biol.* 25, p. 35-41.
- Fänge, R. & Nilsson, S. 1985. The fish spleen: structure and function. *Experientia* 41, p. 152-158.
- Gilderhus, P.A., Berger, B.L., Sills, J.B. & Harman, P.D. 1973. The efficacy of quinaldine sulfate as anesthetic for freshwater fish. *U.S. Fish. Wildl. Serv., Invest. Fish. Control* 49, 9 p.
- Hoar, W.S. 1988. The physiology of smolting salmonids. *Teoksessa: Fish physiology*, vol.XI, W.S. Hoar & D.J. Randall (toim.), Academic Press, London, p. 275-343.
- Houston, A.H. & Woods, R.J. 1976. Influence of temperature upon tricaine methane sulfonate uptake and induction of anesthesia in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 54C, p. 1-6.
- Huish, M.T. 1972. Some responses of the brown bullhead to MS 222. *Prog. Fish Cult.* 34(1), p. 27-32.
- Hunn, J.B. & Allen, J.L. 1974. Movement of drugs across the gills of fishes. *Ann. Rev. Pharm.* 14, p. 47-55.
- Index Nominum: International Drug Directory 1990/1991. Swiss Pharmaceutical Society (toim.). Medpharma, Stuttgart, Scientific Publ.
- Iwama, G.K., McGeer, J.C. & Pawluk M.P. 1989. The effects of five fish anaesthetics on acid base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. *Can. J. Zool.* 67, p. 2065-2073.
- Jensen, F.B. 1990. Nitrite and red cell function in carp: control factors for nitrite entry, membrane potassium ion permeation, oxygen affinity and methaemoglobin formation. *J. exp. Biol.* 152, p. 149-166.
- Johnston, I.A. & Dunn, J. 1987. Temperature acclimation and metabolism in ectotherms with particular reference to teleost fish. *Teoksessa: Symposia of the Society for experimental biology, XXXXI Temperature and animal cells*, K. Bowler & J. Fuller (toim.), The Company of Biologists Limited, Cambridge, p. 67-93.
- Klausen, N.O., Moelgaard, J., Ferguson, A.N., Jensen, J.K., Larson, C. & Paaby, P. 1983. Negative synacthen test during etomidate infusion. *Lancet* 2, p. 848.
- Klontz, G.W. & Smith, L.S. 1968. Methods of using fish as biological research subjects. *Teoksessa: Methods of Animal Experimentation III*, W.I. Cay (toim.), Academic Press, New York, p. 323-385.

- Laidley, C.W. & Leatherland, J.F. 1988. Cohort sampling, anaesthesia and stocking density effects on plasma cortisol, thyroid hormone, metabolite and ion levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J.Fish Biol.* 33, p. 73-88.
- Lambert, T.C. 1982. Techniques for the capture and handling of atlantic mackerel with special reference to use of quinaldine. *Prog. Fish Cult.* 44(3), p. 145-147.
- Marking, L.L. & Dawson V.K. 1973. Toxicity of quinaldine sulfate to fish. U.S. Fish Wildl. Serv., Invest. Fish. Control 48, 7 p.
- Marking, L.L. 1967. Toxity of MS 222 to selected fishes. U.S. Fish Wildl. Serv., Invest. Fish. Control. 12, 10 p.
- Marking, L.L. & Meyer, F.P. 1985. Are better anaesthetics needed in fisheries? *Fisheries, Bethesda* 10(6), p. 2-5.
- Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 28th/29th eds. 1982/1989. Pharmaceutical Press, London.
- Mattson, N.S. & Riple T.H. 1989. Metomidate, better anesthetic for cod (*Gadus morhua*) in comparison with benzocaine, MS 222, chlorobutanol and phenoxyethanol. *Aquaculture* 83, p. 89-94.
- Matty, A.J. 1985. Fish endocrinology. London. Croom Helm, 267 p.
- Mazeaud, M.M. & Mazeaud, F. 1981. Adrenergic response to stress in fish. *Teoksessa: Stress and fish, A.D. Pickering, (toim.), Academic Press, London, p. 50-75.*
- McFarland, W.N. 1959. A Study of effects of anaesthetics on the behavior and physiology of of fishes. *Pub. Inst. Marine Sci.* 6, p. 22-55.
- McFarland, W.N. & Klontz, G.W. 1969. Anesthesia in fishes. *Fed. Proc.* 28(4), p. 1535-1540.
- Morton, W.E. 1990. Occupational phenoxyethanol neurotoxicity. A report of three cases. *J. Occupational Med.* 32(1), p. 42-45.
- Mäkinen, Y. 1974. Tilastotiedettä biologeille. *Synapsi ry., Turku, 3. painos, 306 p.*
- Nichols, D.J. & Weisbart, M. 1984. Plasma cortisol concentrations in Atlantic salmon, *Salmo salar*. Episodic variations, diurnal change, and short term response to adreno corticotropic hormone. *Gen. Comp. Endocrin.* 56, p. 169-176.
- Nikinmaa, M. 1986. Control of red cell pH in teleost fishes. *Ann. Zool. Fennici* 23, p. 223-235.
- Nikinmaa, M. & Soivio, A. 1982. Blood oxygen transport of hypoxic *Salmo gairdneri*. *J. Exp. Zool.* 219, p. 173-178.
- Prosser, C.L. 1973. Comparative animal physiology. Saunders, Philadelphia, 3.painos

- Post, G. 1987. Textbook of fish health. T.F.H. Publications, Inc., New Jersey, 2.painos, 888 p.
- Puceat, M., Garin, D. & Freminet, A. 1989. Inhibitory effect of anaesthesia with 2 phenoxyethanol as compared to MS222 on glucose release in isolated hepatocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 94A, p. 221-224.
- Railo, E., Nikinmaa, M. & Soivio, A. 1985. Effects of sampling on blood parameters in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* 26, p. 725-732.
- Reinitz, G.L. & Rix, J. 1977. Effect of tricaine methanesulfonate (MS 222) on hematocrit values in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 56C, p.115-116.
- Richman, N.H. & Zaugg, W.S. 1987. Effects of cortisol and growth hormone on osmoregulation in pre and desmoltified coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 65, p. 189-198.
- Ross, G.R. & Ross, B. 1984. Anaesthetics and sedative techniques for fish. Institute of aquaculture, University of Stirling, Scotland, 35 p.
- Sado, E.K. 1985. Influence of anaesthetic quinaldine on some tilapias. *Aquaculture* 46(1), p. 217-222.
- Sehdev, H.S., McBride, J.R. & Fagerlund U.H.M. 1963. 2 phenoxyethanol as a general anaesthetic for Sockeye salmon. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 20(6), p. 1435-1440.
- Soivio, A. & Hughes, G.M. 1978. Circulatory changes in secondary lamellae of *Salmo gairdneri* gills in hypoksia and anaesthesia. *Ann. Zool. Fenn.* 15, p. 221-225.
- Soivio, A., Muona, M. & Virtanen, E. 1989. Smolting of two populations of *Salmo trutta*. *Aquaculture* 82, p. 147-153.
- Soivio, A., Mälkönen, M. & Tuurala, O. 1974. Effects of asphyxia and MS 222 anaesthesia on the circulation of the kidney in *Salmo gairdneri* Richardson. A microscopical study. *Ann. Zool. Fennici* 11, P. 271-275.
- Soivio, A. & Nikinmaa, M. 1981. The swelling of erythrocytes in relation to the oxygen affinity of the blood of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Teoksessa: Stress and fish*, A.D. Pickering, (toim.), Academic Press, London, p. 103-119.
- Soivio, A., Nyholm, K. & Huhti, M. 1975. Concentration of K^+ , Na^+ and Mg^{++} in blood plasma of *Salmo gairdneri* Richardson in relation to the increase of haematocrit value in vitro. *Ann. Zool. Fennici* 12, p. 141-142.
- Soivio, A., Nyholm, K. & Huhti, M. 1977. Effects of anaesthesia with MS 222, neutralized MS 222 and benzocaine on the blood constituents of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Fish Biol.* 10, p. 91-101.

- Soivio, A. & Oikari, A. 1976. Haematological effects of stress on a teleost, *Esox lucius* L. *J. Fish Biol.* 8, p. 397-411.
- Soivio, A. & Virtanen, E. 1980. Methods of physiological experiment on fish. *Ekotoxicologiska metoder for akvatisk miljö. Raportti no.16, Nordforsk*, 34 p.
- Soivio, A., Westman, K. & Nyholm, K. 1974. Changes in hematocrit values in blood samples treated with and without oxygen: a comparative study with four salmonid species. *J. Fish Biol.* 6, p. 763-769.
- Stuart, N.C. 1981. Anaesthetics of fishes. *J. Small. Anim. Pract.* 22(6), p. 377-381.
- Summerfelt, R.C. & Smith, L.S. 1990. Anesthesia, surgery and related techniques. *Teoksessa: Methods for fish biology, C.B. Schreck & P.B. Moyle (toim.)*, 1990, American fisheries society, Bethesda, Maryland, p. 213-272.
- Thienpont, D. & Niemegeers C.J.E. 1965. Propoxate (R7464): a new potent anaesthetic agent in cold blooded vertebrates. *Nature* 205(4975), p. 1018-1019.
- Thomas, P. & Robertson, L. 1991. Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS 222, quinaldine sulfate and metomidate. *Aquaculture* 96, p. 69-86.
- Tuurala, O. & Oikari, A. 1976. Helsingin yliopiston Eläintieteen laitoksen fysiologian osaston, histologisen tekniikan kurssimoniste.
- Wedemeyer, G. 1970. Stress of anaesthesia with MS 222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Bd. Canada* 27, p. 909-914.
- Willford, W.A. 1970. Effect of MS 222 on electrolyte and water content in the brain of rainbow trout. *U.S. Fish. Wildl.Serv., Invest. Fish. Control* 43, 7 p.
- Yamamoto, K., Itazawa, Y. & Kobayashi, H. 1980. Supply of erythrocytes into the circulating blood from the spleen of exercised fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 65A, p. 5-11.

RIISTA-JA KALATALOUDEN TUTKIMUSLAITOS
**KALATUTKIMUKSIA-
FISKUNDERSÖKNINGAR**



- No. 31. Valtion kalanviljelyn XIII neuvottelupäivät. Uhanalaisten arvokalalajien ja -kantojen säilyttäminen: tavoitteet ja keinot (State fish culture conference, No. XIII. Conservation of valuable and threatened fish species and stocks: objectives and methods). 5. - 6.4.1989, Jyväskylä. U. Eskelinen, M. Pursiainen ja R. Rahkonen (toim.). Helsinki 1991. 74 s.
- No. 32. JUNTUNEN, K. ja MUJE, P.: Isokoskeloiden (*Mergus merganser*) saalistuksen vaikutus Inarin Juutuanjoen taimenitutustusten tuloksellisuuteen (Predation by mergansers (*Mergus merganser*) on planted brown trout smolts in the River Juutuanjoki). Helsinki 1991. 58 s.
- No. 33. SALMINIITTY, J.: Merialueen kalanviljely-yritysten taloudellisen kehityksen arviointi perinteisen tilinpäätösanalyysin avulla (Economic development of marine fish farms evaluated from analysis of accounts). Helsinki 1991. 70 s.
- No. 34. VALKEAJÄRVI, P., BAGGE, P., HAKKARI, L., JANHONEN, I. ja OLKIO, K.: Konneveden nuotta-apajat (Seining sites in Lake Konnevesi). Helsinki 1991. 28 s. + 22 karttaa.
- No. 35. Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen kalantutkimusosaston ja kalanviljelyosaston toimintakertomus vuodelta 1989 (Report on the activities of the Fisheries Division and Aquaculture Division of the Finnish Game and Fisheries Research Institute in 1989). s. 1-70.
Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen kalantutkimusosaston ja kalanviljelyosaston toimintakertomus vuodelta 1990 (Report on the activities of the Fisheries Division and Aquaculture Division of the Finnish Game and Fisheries Research Institute in 1990). s. 71-148. Helsinki 1991.
- No. 36. NYLANDER, E., AHVONEN, A. ja PRUUKI, V.: Kalastustilastoja Tornionjoen vesistöstä vuosilta 1987-1989 (Statistics on fishing in the Tornionjoki River basin in 1987-1989). s. 1-48.
KARTTUNEN, V., ROMAkkANIEMI, A. ja PRUUKI, V.: Kalastustilastoja Tornionjoen vesistöstä vuodelta 1990 (Statistics on fishing in the Tornionjoki River basin in 1990). s. 49-78.
AHVONEN, A.: Kalastuskirjanpidon käyttökelpoisuus Tornion-Muonionjoen kalakantojen seurannassa (The value of fishermen's book-keeping data in monitoring fish stocks in the Rivers Tornionjoki and Muonionjoki). s. 79-113. Helsinki 1991.
- No. 37. MUTENIA, A. ja SALONEN, E.: Lokan ja Porttipahdan peled- ja vaellussiikakantojen tila vuosina 1982-1989 (The state of peled (*Coregonus peled* (Gmelin)) and migratory whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) in the Lokka and Porttipahta reservoirs, Northern Finland, in 1982-1989). 68 s. Helsinki 1991.
- No. 38. AHONEN, M., JÄÄSKÖ, O., HEINIMAA, P., PASANEN, P. ja SIMOLA, O.: Inarijärveen vuosina 1972-1985 tehtyjen harmaanierian Carlin-merkintöjen tulokset (Results of Carlin tagging experiments with lake trout (*Salvelinus namaycush* (Walbaum))) in Lake Inari in 1972-1985). 53 s. Helsinki 1991.
- No. 39. LEHTONEN, H.: Suomen ja Japanin välisen elintarvikealan tutkimusyhteistyön ja tutkijavaihdon kehittämisen arviointivaltuuskunnan matka Japaniin (Report of the visit of Finnish study group to Japan for evaluating targets for advancement of scientific collaboration and exchange of scientist in food research between Finland and Japan). s. 1-12.
TUUNAINEN, P., WESTMAN, K. ja PARMANNE, R.: Suomen ja Japanin kalatalouden tieteellisen ja teknisen yhteistyön kehittäminen (Possibilities to develop scientific cooperation in fisheries between Finland and Japan). s. 13-48.
RUOHONEN, K.: Japanin vesiviljelystä ja sen tutkimuksesta (Aquaculture and its research in Japan). s. 49-104.
SUURONEN, P.: Pyyntitekniikasta ja sen tutkimuksesta Japanissa (Fishing technology in Japan). s. 105-157. Helsinki 1991.
- No. 40. Rapu-Kräft-Symposium (Symposium on Crayfish). 23.-24.8.1990, Hämeenlinna. Wallin, I. ja Westman, K. (toim.). Helsinki 1991. 116 s.
- No. 41. HEIKINHEIMO-SCHMID, O., RAHKONEN, R., WESTMAN, K. ja TUUNAINEN, P.: Country report of Finland for the intersessional period of the European Inland Fisheries Advisory Commission (EIFAC) 1990-1991. (Suomen kansallinen raportti Euroopan sisävesikalastuskomission (EIFAC) istuntojen väliseltä ajalta 1990-1991). 29 p. Helsinki 1992.
- No. 42. Valtion kalanviljelyn XI neuvottelupäivät. Kalatautiin torjunta. Valtion kalanviljelylaitosten suunnittelun ja rakentamisen nykytila (State fish culture conference, No. XI. Prevention of fish diseases. The present situation in the planning and building of the state fish culture stations). 31.3.-1.4.1987, Polvijärvi. Lavikainen, R. ja Rahkonen, R. (toim.). 68 s. Helsinki 1992.
- No. 43. AHONEN, M.: Inarijärveen vuosina 1965-1986 tehtyjen nierian Carlin-merkintöjen tulokset (Results of Carlin tagging experiments with arctic char (*Salvelinus alpinus* (L.)) in Lake Inari in 1965-1986). 38 s. Helsinki 1992.
- No. 44. SETÄLÄ, J. ja KLEMOLA, O.: Siian kalastajahinnanmuodostus Merenkurkussa (Factors affecting the price formation in the whitefish fishery in the northern Quark, the Baltic Sea). s. 1-46.
SETÄLÄ, J. ja AHLFORS, A.: Siian fileoinnin kannattavuus (Profitability of filleting whitefish (*Coregonus lavaretus* s.l.)). s. 47-77. Helsinki 1992.
- No. 45. AHVONEN, A., JUTILA, E., JÄRVENPÄÄ, T., LAPPALAINEN, A., RASK, M. ja VUORINEN, P.: Metsätalouden vaikutukset kaloihin, rapuihin ja kalatalouteen. Kirjallisuusselvitys (Effects of forestry on fish, crayfish and fishery. A review of the literature). 69 s. Helsinki 1992.
- No. 46. LECKLIN, T.: Nukutusaineiden toissijaiset fysiologiset vaikutukset järvitaimenessa (The secondary physiological effects of some anesthetics on brown trout (*Salmo trutta* m. *lacustris* (L.))). 38 s. Helsinki 1992.

RIISTA-JA KALATALOUDEN TUTKIMUSLAITOS

**KALATUTKIMUKSIA-
FISKUNDERSÖKNINGAR**



SISÄLTÖ – INNEHÅLL – CONTENTS

LECKLIN, T.: Nukutusaineiden toissijaiset fysiologiset vaikutukset järvitaimenessa (The secondary physiological effects of some anesthetics on brown trout (*Salmo trutta m. lacustris* (L.)) (Sammandrag: De sekundära fysiologiska effekterna av några bedövningsmedel på insjööring). 38 s.

**ISSN 0787-8478
Helsinki 1992
Yliopistopaino**