

VERGELIJKEND ONDERZOEK OP RATTEN EN
KUIKENS OVER DE IDENTITEIT VAN HET
KUNSTMATIGE ANTIRACHITISCHE VITAMINE
(BESTRAALD ERGOSTEROL)
EN HET NATUURLIJKE VITAMINE D UIT
KABELJAUW-LEVERTRAAN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE LANDBOUWKUNDE

OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS
Dr D. L. BAKKER, HOOGLEERAAR IN DE
VEETEELT-WETENSCHAP, TE VERDEDI-
GEN VOOR EEN DAARTOE BENOEMDE
COMMISSIE UIT DEN SENAAAT DER LAND-
BOUWHOOGESCHOOLTEWAGENINGEN OP
DINSDAG 16 APRIL 1935 TE 15 UUR

DOOR

M. J. L. DOLS

N.V. CENTRALE DRUKKERIJ, NIJMEGEN

Het verschijnen van dit proefschrift, zij het ook nu ik reeds verscheidene jaren de Landbouwhoogeschool heb verlaten, biedt mij een welkome gelegenheid dank te zeggen aan allen, die aan mijn wetenschappelijke vorming aldaar hebben medegewerkt.

Vóór alles dank ik mijn hooggeachten promotor, Prof Dr G. Grijns, voor datgene wat ik mij van zijn uitgebreide kennis heb kunnen verwerven. Zijn belangrijke colleges, maar meer nog de persoonlijke gesprekken, die ik met hem mocht hebben, wekten bij mij een bijzondere belangstelling op voor physiologische problemen, die mij steeds is bijgebleven. Ik beschouw het een voorrecht mijn studie met een proefschrift bij hem te kunnen voltooien.

Zeër erkentelijk ben ik ook Prof Dr B. C. P. Jansen voor de gelegenheid, die hij mij geboden heeft om dit onderzoek aan zijn laboratorium te kunnen uitvoeren. De prettige wijze, waarop hij mij met zijn groote kennis en rijke ervaring leiding heeft gegeven bij de bewerking van dit proefschrift, zal ik steeds blijven waardeeren.

Den Heeren H. A. H. Bertels en Mr R. A. H. Bertels, Directeuren van Bertels' Oliefabrieken N.V. te Amsterdam, breng ik mijn oprechten dank voor de groote welwillendheid, waarmee zij mij steeds alle vrijheid schonken om de tijdroovende onderzoekingen die voor mijn proefschrift noodig waren, te kunnen verrichten.

Dr Ph. Arons en Dr H. G. K. Westenbrink dank ik voor hun belangstelling bij mijn onderzoek. De vriendschappelijke raadgevingen en de steun, die ik van hen mocht ondervinden, zijn door mij ten zeerste op prijs gesteld.

Zeër in het bijzonder dank ik ook hier alle leden van het analytische, technische en andere personeel van het Physiologisch-Chemisch Laboratorium te Amsterdam, voor de hulp-

vaardigheid, die ik in alle voorkomende gevallen van hen zoo ruimschoots mocht ondervinden.

Den Heer J. P. van Egmond, chef-instrumentmaker van bovengenoemd Laboratorium dank ik voor zijn steun in tal van technische moeilijkheden, terwijl den Heer J. G. Brienne, analyst aan dit Laboratorium, een woord van lof toekomt voor de vak-kundige assistentie bij het röntgenologisch gedeelte van mijn onderzoek.

Ook Mejuffrouw G. M. van den Heuvel, die steeds zorg droeg voor de benoodigde literatuur, dank ik voor haar hulpvaardigheid.

Ten slotte betuig ik mijn hartelijken dank aan allen, die op eenigerlei wijze behulpzaam zijn geweest bij het bewerken van dit proefschrift.

INHOUD.

	Bladz.
Ter Inleiding	1

EERSTE HOOFDSTUK.

LITERATUUROVERZICHT.

1. Het natuurlijke en het kunstmatige vitamine D	5
2. De verschillende vormen van beenverlamming bij kuikens	16
3. De Ca en P verhouding en de hoeveelheden Ca en P in het kuikenrantsoen, noodig voor een normale been- ontwikkeling	24
4. Critische beschouwingen over enkele oudere onder- zoekingen	29

TWEEDE HOOFDSTUK.

EIGEN ONDERZOEK.

1. Proeftechniek	34
2. Dierproeven	38
Samenvatting	109
Summary	118
Bibliographie	127
Platen.	

TER INLEIDING.

Le plus grand dérèglement de l'esprit est de croire les choses parcequ'on veut qu'elles soient.

Bossuet.

(Traité de la connaissance de Dieu et de soi-même.)

Reeds betrekkelijk lang was het bekend, dat het niet gelukte om dieren op te fokken op voedermengsels, die uitsluitend uit eiwitten, vetten, koolhydraten, enkele zouten en water bestonden. Eveneens wist men ook al lang, dat verschillende ziekten o.a. scheurbuik, door ondoelmatige voeding worden veroorzaakt. Lunin (1881) deelt reeds mede, dat muizen van melk alleen konden leven, maar dat, wanneer men alle stoffen uit melk — die volgens de toenmalige physiologische kennis voor het in standhouden van het organisme noodig waren — samenvoegde, de dieren spoedig stierven.

Lunin schrijft hierover als volgt: „Die Mäuse konnten also unter diesen Lebensbedingungen bei geeigneter Nahrung sehr wohl bestehen; da sie nun aber, wie die obigen Versuchen lehren, mit Albuminaten, Fett, Zucker, Salzen und Wasser nicht zu leben vermochten, so folgt daraus, dass in der Milch ausser dem Casein, Fett, Milchzucker und den Salzen noch andere Stoffe vorhanden sein müssen, welche für die Ernährung unentbehrlich sind. Diesen Stoffen nach zu spüren und ihre Bedeutung für die Ernährung zu erforschen wäre eine Untersuchung von hohem Interesse.”

Vele schrijvers hebben in de latere jaren de proeven van Lunin herhaald met het doel een beter inzicht te krijgen in de beteekenis van de zouten voor het dierlijk organisme; al deze proeven evenwel mislukten, daar de dieren al heel spoedig stierven, zonder dat men nochtans de oorzaak hiervan had kunnen ontdekken.

Naast deze oude waarneming van Lunin staat die van Eijkman, (1896), die vaststelde, dat kippen polyneuritis krijgen,

indien zij met geslepen rijst worden gevoed, maar tevens, dat zij konden worden genezen, door het bijvoederen met rijstzemelen. Eijkman was nu van meening, dat in deze rijstzemelen een stof moest voorkomen, die noodzakelijk was voor het organisme, al had hij aanvankelijk ook geen duidelijk inzicht, hoe hij zich de werking van deze stof moest voorstellen. Aan Grijs (1901) komt dan ook de verdienste toe duidelijk te hebben aangetoond, dat de polyneuritis ontstaat door — wat hij noemt „partieele honger” — een gebrek aan een of meer bepaalde stoffen, die noch eiwit, noch vet, noch koolhydraat, noch een of ander mineraal bestanddeel waren. Hiermede was het begrip gebrek- of deficientieziekte ingevoerd en geformuleerd. Het zou te ver voeren, hier de historie te vervolgen, die leidde tot de ontdekking van verschillende van deze stoffen, die in 1912 door Casimir Funk met den naam vitaminen zijn bestempeld. Wel dient vermeld, dat het aantal van deze stoffen in den loop van de jaren steeds is toegenomen.

Nadat het bestaan van deze stoffen met behulp van dierproeven was aangetoond en tevens het voorkomen in verschillende plantaardige- en dierlijke producten was vastgesteld, hebben tal van onderzoekers getracht deze vitaminen in kristallijnen toestand te isoleeren. Voor een belangrijk deel is men thans hierin geslaagd. Zoo gelukte het aan Jansen en Donath (1926) het antineuritische vitamine (B_1) in kristallijnen toestand uit rijstzemelen af te scheiden. Onafhankelijk van elkaar slaagden Deutsche en Engelsche onderzoekers (1931) de door bestraling van ergosterol verkregen antirachitisch werkzame stof kristallijn te isoleeren. Szent-Györgyi (1932) komt de eer toe het vitamine C het eerste kristallijn te hebben verkregen. Dit kwam vast te staan, toen bleek, dat een door hem in 1928 uit de bijnieren van ossen verkregen stof identiek was met het vitamine C.

Het laatste der bekende vitaminen, dat kristallijn werd geïsoleerd, is het vitamine B_2 , dat door Kuhn (1933) uit melkwei werd afgescheiden en dat vanwege zijn intensief gele kleur en geelgroene fluorescentie lactoflavine genoemd werd. Ook de synthetische bereiding van dit vitamine is aan Kuhn gelukt. Was het reeds geruimen tijd bekend, dat het carotine als het provitamine A moet worden beschouwd, tot nu toe is het niet gelukt het vitamine A in zuiveren toestand af te scheiden. Wel

verkreëg Karrer (1931) uit de levertraan van de heilbot en de makreel zeer sterk actieve preparaten; het bleken olieachtige producten te zijn.

Zooals uit het voorafgaande overzicht duidelijk blijkt, werden de tot nu toe in kristallijnen toestand verkregen vitaminen voornamelijk uit natuurproducten, rijk aan deze stoffen, bereid. Alleen het kristallijne bestraalde ergosterol maakt hierop een uitzondering. Hierbij wordt eerst een in de natuur voorkomende stof door ultraviolette bestraling geactiveerd en vervolgens het actieve gedeelte kristallijn afgescheiden. De bereiding van het natuurlijke kristallijne vitamine D uit levertraan is tot nu toe niet gelukt, ofschoon zooals nog later zal blijken door Ender hier veel is bereikt. Was men echter aanvankelijk overtuigd, dat het bestraalde ergosterol in kristallijnen vorm identiek was met het natuurlijke vitamine D uit levertraan, den laatsten tijd is een zeer sterke twijfel aan deze opvatting gerezen.

Het doel van dit onderzoek is nu een bijdrage te leveren, ten einde een, zoo mogelijk, beter inzicht te krijgen in dit voor de praktische voedingsleer zoo belangrijke vraagstuk.

EERSTE HOOFDSTUK.

LITERATUUROVERZICHT.

1. *Het natuurlijke en het kunstmatige vitamine D.*

Na de baanbrekende onderzoeken van Steenbock en Black (1925), Hess, Weinstock en Helman (1925) en van Rosenheim en Webster (1925), waarbij het hen gelukte onafhankelijk van elkaar cholesterol-preparaten door bestraling met ultraviolet licht zeer sterk antirachitisch werkzaam te maken, vonden Hess en Windaus (1926/27) en Rosenheim en Webster (1927, a.), dat niet het cholesterol zelf door bestraling wordt geactiveerd, maar dat het een onzuiverheid moet bevatten, die tot dan toe niet geïsoleerd kon worden. Onafhankelijk van elkaar gelukte het aan Rosenheim en Webster (1927, b.) en aan Windaus en Hess (1927) aan te toonen, dat het in cholesterol voorkomende ergosterol als het pro-vitamine D moet worden beschouwd. Tal van onderzoekers, waaronder onze landgenooten Reerink en van Wijk (1930) hielden zich bezig met pogingen om dit antirachitische vitamine, door ultraviolette bestraling van ergosterol verkregen, kristallijn te isoleeren. Dit laatste gelukte in 1931 aan Bourdillon c.s. — die aan dit kristallijne product den naam calciferol₂ gaf — alsook aan Windaus en zijn medewerkers, die aan hun product, dat identiek bleek te zijn met het calciferol₂, den naam vitamine D₂ toekenden. Dit kristallijne product, dat volgens de onderzoekers moet worden beschouwd als het zuivere vitamine D is een stabiele stof, met een smeltpunt tusschen 115-117°; de rotatie is sterk positief, afhankelijk van het oplosmiddel. Het absorptiespectrum vertoont een zeer karakteristiek maximum bij 265 mμ. De elementaire samenstelling van het bestraalde ergosterol komt met die van het niet bestraalde product overeen en beantwoordt aan de empirische formule C₂₈H₄₄O, terwijl over de structuurformule tot

nu toe geen absolute zekerheid bestaat. (Weidlich, 1933); (Lüttringhaus, 1934).

Minder gelukkig dan met de bereiding van het kunstmatige, antirachitische vitamine was men met de isolatie van het kristallijne vitamine D uit levertraan. Dubin en Funk (1923, 1923/24 a.) beschreven voor het bereiden van een sterk actieve antirachitische fractie uit levertraan een methode, waarbij de traan met behulp van colloidaal palladium tot een vaste massa wordt gehydrogeneerd en waaruit door uitschudden met alcohol of aceton de actieve fractie wordt verkregen. De werkwijze, die door de overige onderzoekers werd gebruikt, berustte voornamelijk op de waarneming van McCollum en Davis (1914), Steenbock, Sell en Buell (1921) en van Zucker, Pappenheimer en Barnett (1922), dat na de verzeeping van de levertraan de antirachitische factor in het onverzeepbare deel van de traan achterblijft en hieruit door het extraheeren met organische oplosmiddelen b.v. æther kan worden verkregen.

Op deze manier maakten Steenbock, Jones en Hart (1923 a, b.) een product, dat zowel het vitamine A, alsook de antirachitische factor bevatte. Zucker (1922) extraheert de levertraan eerst met 95 % alcohol en verzeept, na afdestilleeren van de alcohol, het residu; slaat vervolgens de vetzuren als calciumzeepen neer en extraheert deze met aceton. Na afdestilleeren van de aceton verkreeg hij nu een product, dat 1000 maal zoo geconcentreerd was als de levertraan. Een vitamine A werking vertoonde dit product niet.

In plaats van een extractie met alcohol maken Dubin en Funk (1923/24 b.) gebruik van warme ijszijn en houden hiermede een fractie over die geheel onwerkzaam is. De werkzame fractie wordt, nadat de ijszijn in vacuum is afgedestilleerd, verzeept en vervolgens met æther geëxtraheerd. Na het afdestilleeren van den æther en een herhaling van de verzeeping en extractie wordt de fractie met digitonine behandeld om het cholesterol te verwijderen. Op deze wijze verkregen zij een product, dat 10.000 maal zoo geconcentreerd was als de oorspronkelijke traan en dat 2000 maal zoo sterk werkte, zowel wat betreft het vitamine A als het antirachitische vitamine. Ender (1933) werkt eveneens volgens het genoemde principe en slaagt na verzeeping van tonijnentraan en hieropvolgende extractie en verdere zuivering een fractie te isoleeren waarvan een hoeveel-

heid van $\frac{1}{20}$ γ per dag voldoende is om een rat tegen rachitis te beschutten. Op de eigenschappen van dit product van Ender komen wij nog nader terug. In een latere publicatie komt Ender (1934) met een verbetering van zijn methode voor het isoleeren van het vitamine D uit tonijntraan. Door toepassing van gefractioneerde destillatie, gefractioneerd uitvriezen en door het afscheiden van esterzure zouten en deze aan gefractioneerde kristallisatie te onderwerpen, verkreeg hij preparaten, die zelfs in doseeringen van 0.03 γ per dag bij ratten voldoende waren.

Ondanks vele pogingen is men echter tot nu toe niet geslaagd het vitamine D kristallijn te isoleeren, afgezien van een voorloopige en nog niet bevestigde mededeeling van Basu (1934), waarin hij zegt, dat het hem gelukt is het vitamine D uit de traan van de *Notopterus chital* kristallijn te bereiden. Dit product zou evenals het bestraalde ergosterol een absorptieband vertoonen met een maximum bij 265 $m\mu$; het smeltpunt zou bij 117-120° gelegen zijn.

Over het algemeen kan men zeggen, dat de kennis van de fysische en chemische eigenschappen van het natuurlijke, antirachitische vitamine uit levertraan nog zeer gering is. Zoo is het bekend, dat het natuurlijke vitamine D in oplossing door digitonine niet wordt neergeslagen, zoals Nelson en Steenbock (1925) meedeelen, terwijl het door bestraling met ultraviolet licht schijnt te worden vernietigd, waarop o.m. door Wyman c.s. (1927) en van Leersum (1930) wordt gewezen. Ook is het bekend, dat het genezingsproces bij de experimenteele rattenrachitis op dezelfde wijze verloopt met bestraald ergosterol, als met levertraan, zoals door tal van onderzoekers is aangetoond.

Toch wil het ons voorkomen, dat het gezien deze feiten niet geheel verantwoord is, hieruit tot een identiteit van beide antirachitisch werkzame factoren te besluiten, zolang men niet de beschikking heeft over den antirachitischen factor uit levertraan in kristallijnen toestand. Dit blijkt uit verschillende publicaties die in de laatste jaren zijn verschenen en waarbij chemische en biologische feiten aan het licht kwamen, die voor het bestaan van onderscheidene antirachitische factoren schijnen te pleiten.

Zoo vonden Kon en Booth (1933), dat het vitamine D uit boter gedurende het verzeepen bijna geheel wordt vernietigd,

hetgeen met het vitamine D uit levertraan alsook met het bestraalde ergosterol (Internationale Standaardoplossing) niet het geval was. De tegenwoordigheid van boter in de levertraanoplossing tijdens de verzeeping oefende geen invloed uit op de bestendigheid van het vitamine D uit de traan. Op grond hiervan besluiten onderzoekers tot het bestaan van een ander antirachitisch vitamine, dat in boter zou voorkomen en dat verschillend zou zijn van het vitamine D uit levertraan en van het bestraalde ergosterol. Een bevestiging van deze waarnemingen kwam van Rygh (1934, b.), die vermeldt, dat bij het verzeepen van het aetherextract uit groene planten het hierin voorkomende antirachitische vitamine bijna geheel wordt vernietigd, evenals Kon en Booth bij boter vaststelden. Rygh meent op grond van deze overeenstemming, dat wij in de groene planten met denzelfden antirachitischen factor te doen hebben als ook in boter voorkomt. In een latere publicatie komt Rygh (1934, c.) zelfs tot het aannemen van een derde vitamine D, dat bij boter, ossenlever en hooi voor het grootste deel in het verzeepbare deel van het aetherextract zou voorkomen. Daar in deze korte voorloopige mededeelingen van Rygh geen voldoende gegevens en feiten voor zijn opvatting zijn aangegeven, lijkt ons een beschouwing over de waarde van deze onderzoeken vooralsnog prematuur. In een latere publicatie blijven Kon en Booth (1934, a.) vasthouden aan het bestaan van twee antirachitische factoren in boter en wel een stabiele stof die in het onverzeepbare deel aanwezig is, bekend als vitamine D en een labiele factor, die bij het verzeepen verloren gaat. Bij het bestralen van boter ontstaat volgens onderzoekers alleen de stabiele factor. Pogingen om de twee factoren te scheiden waren tot nu toe vruchteloos; wel meenen zij te mogen aannemen, dat de labiele factor in een constante hoeveelheid voorkomt en dus steeds in gelijke hoeveelheid aanwezig is in een bepaalde kwantiteit melk. In hun jongste onderzoek meenen Kon en Booth (1934, b.), op grond van hun proeven te mogen aannemen, dat de vetzuren uit boter een antirachitische werking bezitten, die niet kan worden toegeschreven aan het onvoldoende verzeepen van de boter. Bij herfstboter, die na het verzeepen een groot deel van zijn antirachitische werking had verloren, indien men alleen het onverzeepbare deel als maatstaf nam, kreeg men weer de oorspronkelijke antirachitische werkzaamheid, door

aan het onverzeepbare deel van de boter de vetzuren toe te voegen. Ofschoon zij erop wijzen, dat men ook hier wederom een labiele factor kan aannemen, zijn zij van meening, dat de verklaring eenvoudiger is, indien de antirachitische werking aan het vet zelf wordt toegeschreven.

Deze waarneming van Kon en Booth kon ook door Rygh (1934, d.) worden bevestigd. Hij vond dat 80 % van het vitamine D, dat in het onverzeepbare deel van boter ontbreekt, kwantitatief in de vrije vetzuren kon worden aangetoond. In tegenstelling met het bestraalde ergosterol werd het antirachitische vitamine in deze vetzuren niet door beenderkool geadsorbeerd. Op het bestaan van verschillende antirachitisch werkzame stoffen wijst eveneens een voorloopige mededeeling van Yoder (1934), die van cholesterol een derivaat maakte, het cholesterileensulfonzuur, dat eveneens antirachitische werkzaamheid vertoonde. In hoever inderdaad de werking aan dit product zelf, dan wel aan een verontreiniging moet worden toegeschreven, dient nog nader te worden onderzocht.

Een zeer interessant onderzoek, waarin de identiteit van het vitamine D uit levertraan en van het bestraalde ergosterol op grond van verschillende waarnemingen wordt bestreden, is van Ender (1933). Deze onderzoeker maakte uit de lever van den tonijn een zeer sterk antirachitisch werkzaam preparaat en onderzocht hiervan het absorptiespectrum. In tegenstelling met het bestraalde ergosterol vertoonde het preparaat uit levertraan géén absorptieband bij 265 m μ . De toevoeging van het kunstmatig bereide vitamine D, in verschillende concentratieverhoudingen, deed onmiddellijk den typischen band bij 265 m μ te voorschijn komen. Daarnaast ging Ender nu het gedrag bestudeeren van zijn preparaat uit tonijnentraan, evenals van het bestraalde ergosterol ten opzichte van phthaalzuuranhydride en vond, dat waar de reactie met het onverzeepbare deel van de tonijnentraan snel verliep, deze bij kamertemperatuur met bestraald ergosterol slechts heel langzaam plaats vond. Deze twee waarnemingen doen Ender besluiten, dat het natuurlijke vitamine D uit levertraan een andere antirachitische factor is dan het kristallijne bestraalde ergosterol. Al is naar onze meening ook met dit onderzoek niet met absolute zekerheid de niet-identiteit van het natuurlijke vitamine D uit levertraan en het kunstmatige antirachitische vitamine aangetoond, de spectrogra-

phische waarnemingen zijn ontegenzeggelijk een sterke aanwijzing, dat er een verschil bestaat, hetwelk in verband met de nog te noemen biologische waarnemingen van groot belang voor dit probleem is.

Tegen deze publicatie van Ender nemen Dalmer, von Werder en Moll (1934) in zekeren zin stelling. Na erop te hebben gewezen, dat een bevestiging van de spectrographische waarnemingen van Ender ongetwijfeld een sterke aanwijzing is voor de niet-identiteit van het natuurlijke vitamine D en het kunstmatige antirachitische vitamine en na de aandacht te hebben gevestigd op de onvoldoende biologische proeven door Ender genomen, gaan zij tegen alle verwachting in uitsluitend een biologische eigenschap van deze twee antirachitische factoren bestudeeren. Vrijwel overeenkomstig de door Ender beschreven werkwijze wordt door hen eveneens een vitamine D preparaat uit tonijnentraan gemaakt, dat zooveel mogelijk bevrijd van vitamine A biologisch wordt onderzocht. Hierbij gingen zij allereerst na, of bij een overdoseering met deze preparaten uit tonijnentraan bij muizen hetzelfde vergiftigingsbeeld te voorschijn kon worden geroepen, zooals dit met het kristallijne antirachitische vitamine het geval was. Daarnaast bepaalden zij den z.g. therapeutischen index, waaronder men volgens Holtz, Laquer, Kreitmair en Moll (1931, a, b.) heeft te verstaan, de verhouding van de kleinste hoeveelheid bestraald ergosterol noodig om de rat tegen rachitis te beschutten en de kleinste hoeveelheid bestraald ergosterol die bij de muis toxische verschijnselen te voorschijn roept. Hierbij bleek, dat het volgens de beschreven methode gemaakte preparaat uit tonijnentraan in de vereischte dosis aan muizen toegediend dezelfde typische vergiftigingsverschijnselen te zien gaf als bij overdoseering met het bestraalde ergosterol in kristallijnen vorm was waargenomen. Ook de therapeutische index van deze preparaten uit tonijnentraan bleek van dezelfde grootte te zijn als van het kristallijne vitamine D, waaruit schrijvers besluiten, dat beide producten — dus eenerzijds het natuurlijke vitamine D uit tonijnentraan en anderzijds het kunstmatige, kristallijne vitamine D — zich biologisch hetzelfde gedragen.

Naar aanleiding van deze conclusie van Dalmer c.s. zouden wij uitdrukkelijk willen opmerken, dat hiermede geenszins be-
wezen is, dat dus beide antirachitische factoren identiek zijn,

temeer daar tegenover de waarneming van Dalmer c.s. tal van onderzoeken staan, waarbij in kwantitatief opzicht althans het biologisch gedrag van het kunstmatige vitamine D geheel anders is dan van het natuurlijke antirachitische vitamine uit levertraan, zooals nader zal worden toegelicht.

De eerste ons bekende waarneming op dit gebied is van Garrahan en Traversaro (1929) die bij craniotabes met bestraalde ergosterol-preparaten, ofschoon aanzienlijk langer toegediend dan was voorgeschreven, teleurstellende resultaten kregen. Ook bij kinderrachitis bleken de resultaten met bestraald ergosterol ver achter te staan bij die, welke met levertraan werden bereikt. Zoo vergeleken Barnes, Brady en James (1930) bij 216 kinderen, die in vier groepen waren verdeeld, de werking van Noorsche levertraan en van een equivalente hoeveelheid vitamine D in den vorm van bestraald ergosterol. Hierbij stelden zij vast, dat in de groep welke levertraan had ontvangen aan het einde van de proef 98 % der patiënten normaal was of ten minste verbeterd; in de groep waarbij uitsluitend bestraald ergosterol was toegediend bleek slechts in 44 % der gevallen genezing of verbetering te zijn bereikt. Tot een soortgelijk resultaat kwamen Sanctis en Craig (1930) in hun onderzoek. Van de 100 kinderen, die zij gedurende $4\frac{1}{2}$ maand met levertraan behandelden, bleken er 97 % tegen rachitis beschut te zijn, terwijl van de 123 kinderen, die gedurende $4\frac{3}{4}$ maand een hoeveelheid vitamine D ontvingen in den vorm van bestraald ergosterol en in ratteneenheden equivalent met de dubbele hoeveelheid levertraan, slechts 77 % beschut was. Hess c.s. (1931) vestigt er de aandacht op, dat ter voorkoming van rachitis bij kinderen vier maal zooveel vitamine D noodig is in den vorm van bestraald ergosterol dan in den vorm van levertraan. Beal en Biely (1932) deelen mede, dat volgens hun ervaring $\frac{1}{40}$ cc bestraald ergosterol met 250 eenheden noodig was ter voorkoming van rachitis bij kinderen, terwijl in den vorm van levertraan 1cc met 112 eenheden voldoende was.

Ofschoon de hiervoor genoemde onderzoeken natuurlijk onder andere en onderling minder uniforme voorwaarden plaats vonden als bij dierproeven gewoonlijk worden genomen en bovendien in verscheidene van deze onderzoeken nog geen gebruik kon worden gemaakt van het kunstmatige vitamine D

in kristallijnen vorm, mag men o.i. deze waarnemingen toch niet als van nul en geener waarde ter zijde leggen, maar moet men ze in verband met de nog te noemen dierproeven zien als één feitenmateriaal, dat in zijn geheel pleit tegen de opvatting, dat het kristallijne bestraalde ergosterol met betrekking tot zijn antirachitische werking de levertraan geheel zou kunnen vervangen.

Ook in de pluimveeteelt is gebleken, dat de werking van het kristallijne bestraalde ergosterol niet op een lijn gesteld kan worden met de werking van een equivalente hoeveelheid vitamine D in den vorm van levertraan. Reeds Holmes (1925) vestigde de aandacht op den gunstigen invloed van het vitamine D op de broedresultaten; later kon dit door Edson (1932) worden bevestigd. Branion en Smith (1932) bevestigen eveneens den gunstigen invloed van het vitamine D op de broedresultaten, maar stelden daarbij vast, dat het bestraalde ergosterol veel minder effectief was dan levertraan. McDonald en Massengale (1932) vonden, dat de eierdooier van kippen, die een groote hoeveelheid bestraald ergosterol hadden ontvangen, waarvan volgens de ijkproef het aantal ratteneenheden vitamine D overeenkwam met 25 % levertraan, veel minder werkzaam was ter voorkoming van rachitis, dan de eierdooier van kippen, die slechts 2 % levertraan in hun rantsoen hadden gekregen. Werd vervolgens de 2 % levertraan in het rantsoen door een hoeveelheid bestraald ergosterol vervangen, die 10.000 maal zooveel ratteneenheden vitamine D bevatte, dan was het gehalte aan vitamine D in den eierdooier slechts 185 maal verhoogd. De Vaney, Munsell en Titus (1933) onderzochten hoeveel vitamine D uit levertraan en hoeveel uit bestraald ergosterol in den eierdooier werd vastgelegd. Ook hier bleek wederom dat het vitamine D in den vorm van levertraan veel effectiever was dan in den vorm van bestraald ergosterol. Dit blijkt ook uit een onderzoek van Krauss, Bethke en Monroe (1932); zij bestudeerden de antirachitische werking van botervet afkomstig van koeien, die bestraald ergosterol hadden ontvangen zoowel bij ratten als bij kuikens. De grootste doseering botervet afkomstig van koeien, die bestraald ergosterol hadden ontvangen en die overeenkwam met 12.5 ratteneenheden per 100 g voeder bleek minder effect te hebben op het aschgehalte van de beenderen bij kuikens, dan een doseering levertraan overeenkomende met 3.3 ratten-

eenheden. Een grootere hoeveelheid botervet werd niet toegediend.

De beste aanwijzingen voor een kwantitatief verschil in werking tusschen het vitamine D uit levertraan en het bestraalde ergosterol vinden wij naar onze meening in de diverse proeven, welke met groeiende kuikens werden genomen en waarbij de invloed van beide producten op het voorkomen van de rachitische beenzwakte („leg weakness”) werd bestudeerd.

De eersten die naar ons weten hierop de aandacht vestigden waren Mussehl en Ackerson (1930). Zij stelden vast, dat kuikens op het door hen gebruikte grondrantsoen aangevuld met 2 % levertraan goed groeiden en geen enkel verschijnsel van rachitis vertoonden. Werd in de plaats van levertraan bestraald ergosterol aan het grondrantsoen toegevoegd, in een hoeveelheid overeenkomend in vitamine D met 50 % levertraan, dan bleek de groei niet alleen onvoldoende, maar vertoonden de kuikens bovendien verschijnselen van rachitis. Tot een zelfde conclusie kwamen Massengale en Nussmeier (1930). In hun proeven met kuikens hadden zij, indien bestraald ergosterol als vitamine D bron werd gebruikt, 100 maal zooveel ratteneenheden noodig als in den vorm van levertraan. Hess en Supplee (1930) vermelden te hebben waargenomen, dat ofschoon 1% levertraan in hun rantsoen voldoende was om de kuikens tegen rachitis te beschutten, een in vitamine D equivalente hoeveelheid bestraald ergosterol onvoldoende was en dat in dezen vorm veel meer ratteneenheden noodig waren. Steenbock, Kletzien en Halpin (1932) deelen mede te hebben vastgesteld, dat onder hun proefvoorwaarden een hoeveelheid bestraald ergosterol, in ratteneenheden vitamine D overeenkomend met 120 % levertraan, noodig was om bij kuikens rachitis te voorkomen. Door in plaats van maaskiemolie levertraan als oplosmiddel voor het bestraalde ergosterol te nemen trachtten onderzoekers na te gaan of levertraan soms een anderen factor bevat of dat het antirachitische vitamine uit levertraan en het bestraalde ergosterol twee verschillende antirachitische factoren zijn. Daar het onverschillig was in welke oplossing het bestraalde ergosterol werd toegediend besluiten zij, dat het door ultraviolette bestraling van ergosterol verkregen product een andere stof is dan het vitamine D uit levertraan. King, Hull en Hall (1933), die dit vraagstuk eveneens bestudeerden, konden de waarnemingen der

vorige onderzoekers in zoover bevestigen, dat ook zij vonden dat het bestraalde ergosterol veel minder effectief is dan een equivalente hoeveelheid vitamine D in den vorm van levertraan. Zij vestigen evenwel de aandacht op het feit, dat bij een meer normale Ca/P verhouding de verschillen veel kleiner zijn dan bij een sterk abnormale Ca/P verhouding.

Bethke, Record en Kennard (1933) hebben deze proeven nog eens overgedaan, waarbij zij bestraald ergosterol in lijnolie, maisolie of levertraan oplosten, maar steeds met hetzelfde resultaat, dat in den vorm van bestraald ergosterol 15 tot 20 maal zooveel ratteneenheden vitamine D noodig waren als in den vorm van levertraan, om een normale beenontwikkeling te krijgen. In Nederland kon Ubbels (1933; 1934) onder praktijkvoorwaarden deze waarnemingen eveneens bevestigen. Daar naar onze meening geen der genoemde onderzoekingen met pluimvee geheel onaanvechtbaar is, besloten wij onder strenge laboratoriumvoorwaarden de proeven te herhalen. Met een geheel andere methode kwamen wij eveneens tot dezelfde resultaten als de reeds genoemde onderzoekers, zooals uit onze voorloopige mededeeling (1934) blijkt. Dit neemt niet weg, dat onze bezwaren tegen de door de andere onderzoekers gevolgde methode blijft bestaan, waarop wij nog nader terugkomen.

De eenige onderzoeker, die inzake de werking van het bestraalde ergosterol en levertraan, tot een andere conclusie komt is Voet (1934). Zij meent in haar onderzoek te hebben aangetoond, dat bij het toedienen van een gelijk aantal internationale eenheden, de werkzaamheid van Davitamon D, Dohyfralolie en levertraan, ter voorkoming van rachitische processen bij kuikens overeenkomen. In dit verband mag ook niet uit het oog worden verloren, dat Russel, Taylor en Cox (1932) hebben vastgesteld, dat het geen verschil uitmaakte of bij de toediening van het bestraalde ergosterol dit per capsule in den mond werd toegediend, dan wel intraperitoneaal werd gegeven. Daar tegenover hebben King, Hull en Hall (1933) gevonden, dat het bestraalde ergosterol in den mond toegediend méér effect had, dan indien het door het voeder werd verwerkt.

Konden wij dus de meening van verschillende onderzoekers bevestigen, waarbij zij tot de conclusie kwamen, dat het bestraalde ergosterol veel minder effectief is voor kuikens dan een in vitamine D equivalente hoeveelheid levertraan, toch valt

hieruit a priori niet af te leiden, dat de oorzaak van dit verschil in werking tusschen het natuurlijke vitamine D uit levertraan en het kunstmatige vitamine D dus wijst op het niet identiek zijn van deze twee antirachitische factoren. Het zou immers mogelijk kunnen zijn, dat hier een andere factor in het spel is.

Zoo veronderstelden Holmes en Pigott (1930), alsook Poulsson (1931), dat het vitamine A uit levertraan verantwoordelijk zou zijn voor dit verschil in werking. Uit proeven van Russel en Klein (1931), Rohmer en Dubois (1931), Steenbock, Kletzien en Halpin (1932), Hunter, Dutcher en Kandel (1932), Bethke, Record en Kennard (1933), alsook uit ons eigen onderzoek (1934) staat wel vast, dat het vitamine A niet verantwoordelijk is voor de minder effectieve werking van bestraalde ergosterol-preparaten bij kuikens.

Een andere mogelijkheid zou kunnen zijn, dat het vitamine D in den vorm van bestraald ergosterol minder goed in het lichaam geresorbeerd wordt dan in den vorm van levertraan. Naar deze kwestie werd een uitvoerig onderzoek ingesteld door Klein en Russel (1931) die evenwel vonden, dat wanneer de kuikens vitamine D in den vorm van bestraald ergosterol wordt toegediend in een hoeveelheid die drie maal zoo veel ratteneenheden bevat als de contrôle-groep in den vorm van levertraan ontvangt, in de faeces van de ergosterol-kuikens toch veel minder vitamine D wordt teruggevonden. Hieruit besluiten zij, dat derhalve veel meer vitamine D in den vorm van bestraald ergosterol is vastgelegd, maar dat de werking dus niet evenredig is aan het aantal vitamine D eenheden dat in dezen vorm werd gegeven, indien hierbij de werking van de veel geringere hoeveelheid vitamine D in den vorm van levertraan wordt vergeleken. Dit resultaat is niet geheel en al in overeenstemming met andere onderzoekingen. Schönheimer (1931) had nl. aangetoond, dat plantensterolen in het darmkanaal slechts weinig worden geresorbeerd, zoodat ergosterol hierop wel geen uitzondering zal maken; in latere onderzoekingen stelden Schönheimer en Dam (1932) en Menschick en Page (1932) vast, dat bij leggende hennen ergosterol in zeer geringe mate wordt geresorbeerd. Een nauwkeurig onderzoek lijkt ons dus in dit vraagstuk wel gewenscht, ofschoon het natuurlijk mogelijk is, dat door de bestraling, de structuur van het molecule ergosterol zoodanig gewijzigd wordt, dat ook de resorptie verandert. Of, zooals

Chidester, Asworth en Willes (1932) zich voorstellen, het jodiumgehalte van levertraan nog van invloed is, valt voorloopig niet te zeggen; hiertoe dienen nadere gegevens van deze onderzoekers te worden afgewacht.

Een andere mogelijkheid, die men zou kunnen opperen is wel deze, dat de kuikenrachitis niet dezelfde ziekte is als de experimenteele rattenrachitis. Op deze kwestie komen wij nog nader uitvoeriger terug, evenals op het door verschillende onderzoekers gebruikte criterium voor het vaststellen van rachitis, waartoe dikwijls het aschgehalte der beenderen wordt gebruikt.

Van belang is hier ook de veronderstelling, bij ons weten alleen door Bergami (1933) geuit, waarbij hij zegt, dat het heel goed zou kunnen zijn, dat het bestraalde ergosterol niets anders is dan het provitamine D, dat eerst in het lichaam van het dier in het vitamine D wordt omgevormd. De rat zou nu hiertoe beter in staat kunnen zijn dan het kuiken. Eveneens kan hier worden gewezen op een recent onderzoek van Waddel (1934), die in kuikenproeven vaststelde dat bestraald cholesterol, aan kuikens toegediend in een hoeveelheid equivalent in ratten-eenheden met een bepaalde hoeveelheid levertraan, een zelfde antirachitisch effect had, in tegenstelling met een in ratten-eenheden equivalente hoeveelheid bestraald ergosterol. Hieruit besluit onderzoeker, dat het in cholesterol voorkomende provitamine géén ergosterol is maar een andere stof. Ofschoon ook deze opvatting een bevestiging vraagt, is zij de vermelding, alsmede ons nader onderzoek, ten volle waard. Het door Waddel gebruikte cholesterol was niet eerst via de dibromide-methode gezuiverd. In een voorloopige mededeeling vermelden Bills, Massengale en Imboden (1934) ten slotte, dat ook het natuurlijke vitamine D, zooals het in levertraan voorkomt, geen enkelvoudige stof is. In hun proeven met kuikens konden zij aantonen, dat het vitamine D uit de tonijnentraan slechts 15 % van de werkzaamheid vertoonde van een, in ratteneenheden equivalente hoeveelheid vitamine D, in den vorm van kabeljauwlevertraan of heilbottraan.

2. De verschillende vormen van beenverlamming bij kuikens.

Een bij kuikens veelvuldig voorkomende afwijking is ongetwijfeld de beenverlamming, vaak beter gekenmerkt met den

naam beenzwakte. De oorzaken van deze beenafwijkingen zijn geheel verschillend. Zoo kunnen verlammingen optreden ten gevolge van aandoeningen van infectieusen- of parasitaire aard bv. coccidiosis en wormen; doch ook in tal van andere gevallen zien wij beenafwijkingen optreden. In een korte mededeeling heeft Doyle (1931) een differentieel-diagnose gegeven van de bij kuikens voorkomende beenafwijkingen, die hij naar gelang van het orgaansysteem dat is aangetast, in drie groepen verdeelt: 1. de vorm, waarbij de beenderen zijn aangetast; hiertoe behooren: a. rachitis; b. „slipped tendon” („losse hakkepees”); c. myelocytosis; d. osteomyelitis en osteoarthritis; e. fracturen. 2. de vorm, waarbij het zenuwstelsel is aangetast en waartoe behooren: a. polyneuritis; b. de „onbekende” verlamningsziekte (neurolymphomatosis gallinarum); c. aandoeningen van het zenuwstelsel als gevolg van gezwellen; d. „crazy-chick disease”. 3. de vorm, waarbij de spieren of de peezen van het been zijn aangedaan: a. myositis en tumores; b. tendovaginitis.

Ook Bethke (1933) bestudeerde de verschillende vormen van beenverlamming en onderscheidt hierbij vier groepen en wel a. rachitis of echte beenzwakte; b. „losse hakkepees” of perosis; c. „crazy-chick disease”; d. voedingsparalyse.

Wanneer wij zelf de verschillende vormen van beenafwijking willen indeelen op grond van eigen ervaring en aan de hand van de in de literatuur voorkomende gegevens, dan zouden wij onderscheid willen maken tusschen die afwijkingen welke een gevolg zijn van infectieziekten of andere aandoeningen en die afwijkingen die het gevolg zijn van een of andere voedingsfout. Tot deze laatste groep behooren dan voor zoover thans bekend: a. de rachitis; b. de groep afwijkingen, samengevat onder den naam perosis; c. de voedingsparalyse; d. de polyneuritis.

In het kort zullen wij over deze laatste groep van afwijkingen aan de hand van de in de literatuur voorkomende gegevens een en ander mededeelen.

Perosis; hieronder wordt verstaan, een onder verschillende namen in de literatuur beschreven beenafwijking. Zoo spreken Titus en Ginn (1931) en Titus (1931; 1932) van „deforming leg weakness”; Hunter c.s. (1931; 1933) spreken van „hock-disease”; Hunter c.s. (1931), Holmes c.s. (1933) en Milby (1933) van „slipped tendon”, terwijl Hall en King (1931) aan deze afwijking

den naam van „range paralysis” toekennen, die evenwel ook voor andere aandoeningen wordt gebruikt.

Het eerste symptoom voor de perosis is het gedurende geruimen tijd achtereen rusten op de hakken; het spronggewricht is een weinig gezwollen en voelt zacht aan. Enkele dagen later zijn de gewrichten duidelijk verdikt; de huid ter plaatse vertoont een blauwgroene kleur, veroorzaakt door een bloeduitstorting in het daaronder liggende weefsel. Als secundair verschijnsel treden hierbij somtijds infecties op (Payne c.s., 1932). Men spreekt nu van „hock-disease”. Met de verdikking van het gewricht gaat veelal ook een lichte buiging van de metatarsi en tibia gepaard, zoodat sommige schrijvers nu van „deformed legbone” spreken. Heel dikwijls gebeurt het ook, dat het articulaire kraakbeen aan het distale uiteinde van de tibia zich verdikt, waardoor de groeve tusschen de condylus vervlakt, de pees uit deze groeve schiet en het gewricht onbekwaam wordt. Zelfs komt het voor, dat zonder dat de groeve vervlakt is, de pees eruit schiet. In beide gevallen spreekt men van „slipped tendon”. Daar het hierbij gebeurt, dat de knie naar binnen wordt gedraaid, spreken Herner en Robinson (1932) van „knock-knees”.

Het chemisch onderzoek bij deze beenafwijking heeft aangetoond, dat het aschgehalte in de beenderen niet verschilt van dat bij normale dieren. (Holmes c.s., 1933; Milby, 1934). Integendeel, het komt zelfs voor, dat het aschgehalte verhoogd is (Herner en Robinson, 1932). Eveneens wijken het Ca- en P-gehalte in het bloedserum niet af van de waarden, die men bij normale dieren vindt; dit laatste is ook met het fosphatasegehalte in de beenderen het geval (Hall en King, 1931). Anatomisch vertoonen de beenderen wel enkele afwijkingen in vergelijking tot die van normale dieren, ofschoon histologisch geen noemenswaardige verschillen werden gevonden. Het proximale uiteinde van de diaphyse is hier conisch verdikt, met zijn basis aan de epiphysaire zijde; de meta-tarsi en tibiae zijn van normale lengte; de wanden van de beenschacht zijn goed verkalkt, maar broos (Hall en King, 1931). De ribben zijn geheel normaal en vertoonen geen verbuigingen. Over de oorzaak van deze afwijkingen zijn de meeningen nog verschillend. Een teveel aan mineralen, een te eiwitrijk rantsoen, een teveel aan P of het ontbreken van een factor, die in rijstzemelen en havermout

voorkomt, wordt hier als de oorzaak genoemd. (Hunter c.s., 1931; 1933; Insko, 1934; Milby, 1933; Titus, 1932; Titus en Ginn, 1931).

Voedingsparalyse, (nutritional leg paralysis), is een verlamming, die het eerste door Norris, Heuser en Wilgus (1929/30) werd beschreven en later eveneens door Bethke, Record en Kennard (1931). Ze is volgens deze onderzoekers verschillend van rachitis, perosis en „crazy-chick disease” en treedt bij kuikens tusschen de derde en tiende levensweek op. Evenals bij rachitis en bij perosis, zitten ook hier de dieren op de hakken en kruipen aldus in de kooien rond. De teenen zijn veelal naar binnen gekruld, de spieren zeer slap, terwijl de huid droog en ruw is. De kuikens verliezen plotseling het gebruik van hun pooten; somtijds vindt spontane genezing plaats, maar veelal treedt een algeheele verlamming op, waarbij de dieren met uitgespreide vleugels op hun borst rusten. Het spronggewricht is niet verdikt; gebogen metatarsi en tibiae worden niet waargenomen, terwijl de Achillespees op haar normale plaats ligt. Het onderzoek naar het aschgehalte van de beenderen, alsmede de bepaling van het Ca- en P-gehalte van het bloedserum, gaven geen verschillen te zien in vergelijking tot de waarden bij normale dieren gevonden (Bethke c.s., 1931). Een histologisch onderzoek van de beenderen werd, voor zoover wij konden nagaan, bij deze afwijking niet gedaan. Over de oorzaak van deze afwijking is nog niets met zekerheid bekend. Gedacht wordt aan het ontbreken van een factor uit het vitamine B complex, die verschillend zou zijn van het vitamine B₁ en B₂ en die in geautoclaafde gist en melk voorkomt. In tegenstelling met Norris c.s. vonden Bethke c.s., dat waterige lever-extracten werkzaam zijn ter voorkoming van dit verschijnsel.

Polyneuritis, is het ziekteverschijnsel, waarvan de oorzaak bekend is geworden door de onderzoekingen van Eijkman (1896) en Grijns (1901). Evenals bij het vorige ziekteverschijnsel, treden ook hier de verlamningsverschijnselen op den voorgrond en beperken zich niet alleen tot de pooten, maar tasten eveneens de vleugels aan. Anatomische beenveranderingen werden hierbij niet waargenomen; evenmin werden histologische veranderingen aan de beenderen geconstateerd; het aschgehalte was ook normaal. Wel werden degeneratieverschijnselen aan de zenuwen gevonden. Als oorzaak van dit verschijnsel moet

het ontbreken van het vitamine B₁ in het rantsoen worden beschouwd.

Of de „crazy-chick disease”, waarvan volgens Bethke (1933) de oorzaak niet bekend is, een afzonderlijke ziekte is, of tot een der genoemde groepen kan worden teruggebracht is ons niet bekend. Dit geldt eveneens voor de door Buckner c.s., (1932) beschreven verlamming, die werd verkregen door het toevoegen van magnesiumcarbonaat aan een normaal rantsoen.

Rachitis. Ons eigen onderzoek handelt uitsluitend over die vorm van beenzwakte, die veroorzaakt wordt door een tekort aan het vitamine D en die door het toedienen van levertraan of door het bestralen met ultraviolet licht kan worden voorkomen of genezen.

Dit verschijnsel is door tal van onderzoekers waargenomen. Aanvankelijk meenden Hart, Halpin en Steenbock (1920), dat de door hen waargenomen vorm van beenzwakte op een gebrek aan ruwvezel in het rantsoen berustte. Het verschijnsel kon echter door groenvoeder worden genezen, terwijl zuivere cellulose geen effect had. In een latere publicatie (1922) vermelden zij dan ook, dat de beenzwakte alleen dan optreedt, indien géén levertraan in het rantsoen werd gegeven. De dieren stierven binnen den tijd van vier tot zes weken, terwijl kon worden vastgesteld, dat het gehalte aan anorganische P in het bloedserum der zieke dieren sterk verlaagd was, in vergelijking tot dat van normale dieren. Collier (1924) kon deze waarneming niet bevestigen en is van meening, dat ook zonder levertraan en direct zonlicht geen kuikenrachitis optreedt, indien het rantsoen voldoende grit bevat. Alle latere onderzoekers hebben de waarneming van Hart c.s. daarentegen wel bevestigd. Zoo vonden Hughes, Payne en Latshaw (1925), dat zoowel een bestraling met ultraviolet licht alsook het toedienen van levertraan het optreden van rachitis bij kuikens kon voorkomen. Bethke en Kennard (1925) komen tot dezelfde conclusie; kuikens die totdat ze volwassen waren steeds binnen werden gehouden en geen direct zonlicht ontvingen, kregen geen rachitis indien gezorgd werd voor een kleine hoeveelheid levertraan in het rantsoen. Hughes, Titus en Witham (1925/26) vonden, dat onder hun proefvoorwaarden 1/2 % goede levertraan voldoende was om kuikens tegen rachitis te beschutten; hetzelfde kon worden bereikt, door het bestralen met ultraviolet licht of het

blootstellen aan direct zonlicht.

Ook Bethke, Kennard en Kick (1925) zagen veel succes van het directe zonlicht ter voorkoming van rachitis; een groote hoeveelheid versche roode klaver bleek evenwel geen invloed uit te oefenen. Klein (1927) kon deze waarnemingen eveneens bevestigen.

De klinische verschijnselen, die bij kuikenrachitis optreden zijn veelvuldig beschreven. Als eerste verschijnsel ziet men ook hier wederom stoornissen bij het loopen der dieren. De kuikens loopen wijdbeensch en vertoonen een neiging om gedurende geruimen tijd achtereen op de hakken te rusten. Dit rusten neemt meer en meer toe en na korten tijd ziet men dat de kuikens zich voor het grootste deel van den dag kruipende rondbewegen in hun hokken. De diertjes zien er lusteloos uit; het veerenkleed is ruig, de eetlust sterk verminderd en de groei is vertraagd. Zelfs komt het voor, dat de dieren in het geheel niet meer groeien of zelfs sterk in gewicht achteruit gaan. In dit laatste geval treedt de dood meestal spoedig in. Het chemisch onderzoek van de beenderen toont aan, dat het aschgehalte in het algemeen verlaagd is. Het Ca gehalte van het bloedserum ligt beneden de normale waarde, terwijl het phosphatase gehalte in de beenderen verhoogd is. Doyle (1931) nam ook waar, dat de snavel bij rachitische dieren sterk buigbaar was. Of dit wel een uitsluitend kenmerk voor rachitis is, moet na een persoonlijke mededeeling van Westenbrink worden betwijfeld. Deze onderzoeker vond bij zijn B₁ proeven met duiven, dat bij een te kort aan dit vitamine de duiven eveneens een zeer buigbaren snavel hadden.

Een uitvoerige beschrijving van de kuikenrachitis vinden wij bij Johnson (1924/25), die de aandacht vestigde op het lage Ca-en P-gehalte van het bloedserum, maar dat volgens zijn ervaring ook geheel normaal kan zijn. Als zeer karakteristiek kenmerk voor kuikenrachitis vermeldt hij typische veranderingen aan de ribben, waarbij hij den rozenkrans, verdikkingen van het costovertebrale gedeelte en sterke verbuigingen waarnam. Doyle (1925, a, b.) heeft dezelfde afwijkingen bij volwassen kuikens geconstateerd. De beenderen waren bij rachitische dieren zachter dan bij normale; ze braken gemakkelijk en vaak werden spontane fracturen waargenomen. Aan den binnenkant van de ribben zag hij duidelijke knobbels; eveneens consta-

teerde hij verkrommingen van den wervelkolom en veranderingen aan het bekken en borstkas. De parathyroidea waren volgens zijn waarnemingen vergroot.

Nonidez (1927) bestudeerde de parathyroidea van kuikens, die zonder zonlicht en vitamine D waren groot gebracht en constateerde hier inderdaad een vergroting, waarbij zoowel hypertrophie als hyperplasie werden waargenomen. Ook Oberling en Guerin (1931; 1933; 1934) constateerden bij volwassen dieren die in het donker waren gehouden beenafwijkingen en een vergroting van de parathyroidea. Later konden Nonidez (1928), evenals Davis en Beach (1928) en Heuser en Norris (1928/29) de waarnemingen van Johnson inzake de skeletveranderingen bij rachitische kuikens bevestigen. Sheehy en Sheil (1932) wijzen in hun proeven op de beteekenis die het vitamine D heeft voor een goede ontwikkeling van het skelet en de interne organen. Bij gebrek aan vitamine D werden groote veranderingen waargenomen. In een recent onderzoek van McGowan en Emslie (1934) betwisten deze onderzoekers, dat de veranderingen aan ribben en wervelkolom een kenmerk zouden zijn voor rachitis. Zij namen deze skeletveranderingen ook bij osteoporose waar.

De vraag of histo-pathologisch gezien de kuikenrachitis identiek is met de zoogdierenrachitis heeft eveneens het onderwerp uitgemaakt van verschillende publicaties, zonder dat hierbij nochtans de onderzoekers tot overeenstemming zijn gekomen. Pappenheimer en Dunn (1925), die — voor zoover ons bekend — dit vraagstuk het eerste bestudeerden, kwamen hierbij tot de conclusie, dat de kuikenrachitis en de zoogdierenrachitis geen identieke ziekten zijn. De waargenomen beenafwijkingen bij kuikens zouden nl. veroorzaakt worden door een onvoldoende osteogenese, door osteoporose en door een bindweefselwoekering in het beenmerg. Het lage aschgehalte achten zij geen bewijs voor rachitis, daar ook bij osteoporose het aschgehalte sterk verlaagd is. Doyle (1925 a, b.) nam bij het histologisch onderzoek van de beenderen van rachitische kuikens waar, dat de mergholte gevuld was met bindweefsel, in plaats van met normaal beenmerg. Daarnaast vond hij evenwel bij deze kuikens een zeer geringe kalkafzetting in de beenderen en een duidelijke overmaat van osteoid weefsel. Hughes en Titus (1926) zijn het niet eens met de opvatting van Pappenheimer

en Dunn. Zij zijn van meening, dat wanneer men de rachitis beschouwt volgens Park (1923), als een ziekte van het groeiende organisme, die gekenmerkt is door een verkeerde kalk- en phosphorstofwisseling en veroorzaakt wordt door gebrek aan vitamine D of ultraviolet licht, men beide ziekten als volkomen identiek moet beschouwen. Zij achten het onjuist, de verschillen in beenveranderingen bij experimenteele rattenrachitis op een phosphorarm dieet, te vergelijken met de beenveranderingen bij kuikens; volgens hun meening moeten de waargenomen verschillen in beenveranderingen aan het verschil in diersoort worden toegeschreven. Ook Klein (1927) is deze meening toegedaan.

Nonidez (1928) heeft dit vraagstuk nog eens uitvoerig onderzocht. Op grond hiervan komt hij tot dezelfde conclusie als Pappenheimer en Dunn, dat nl. histologisch bezien de beenafwijkingen bij kuikens, die gedurende de eerste levensweken geen vitamine D of ultraviolet licht hebben gehad, niet identiek zijn met die bij zoogdierenrachitis. Toch meent hij, dat het op grond hiervan niet geoorloofd is te besluiten, dat derhalve de kuiken- en zoogdierenrachitis geen identieke ziekten zouden zijn. Zoo kon hij nl. aantonen, dat wanneer de kuikens gedurende de vijf eerste levensweken een normaal rantsoen ontvingen en daarna op een rachitogeen dieet werden gezet, de nu optredende beenveranderingen, zoowel histologisch als anatomisch geheel in overeenstemming waren met de bij zoogdierenrachitis waargenomen veranderingen. Voet (1934) die ook bij enkele rachitische dieren de histologische beenveranderingen naging, wijst erop, dat het belangrijkste symptoom van zoogdierenrachitis, nl. de sterk vermeerderde osteoid-vorming, bij kuikens minder duidelijk naar voren komt, maar dat de overige veranderingen zeer groote overeenkomst vertoonen bij beide diersoorten.

Het laatste ons bekende onderzoek over dit probleem is van McGowan en Emslie (1934), die van meening zijn, dat beide verschijnselen niet volkomen identiek zijn. In hun onderzoekingen met het door Hart (1924) beschreven mengsel, namen zij uitsluitend osteoporose waar en geen rachitis. Wel bleek, dat bij een te veel aan Ca en afwezigheid van vitamine D rachitis optrad, terwijl bij een tekort aan Ca eerder osteoporose ontstond.

Vermeldenswaard zijn o.i. hier ook de onderzoekingen van

Hou (1928; 1929; 1930), die een verband meent te hebben aangetoond tusschen de glandula uropigialis en het optreden van rachitis; Knowles, Hart en Halpin (1935) konden dit resultaat evenwel niet bevestigen. Op een mogelijke samenhang van rachitis en stoornissen in de interne secretie werd nog voor kort, in een uitvoerige publicatie, door Glanzmann (1934) gewezen.

3. *De Ca en P verhouding en de hoeveelheden Ca en P in het kuikenrantsoen, noodig voor een normale beenontwikkeling.*

Een zeer belangrijke kwestie in het vraagstuk van de kuikenrachitis is ongetwijfeld het probleem van de meest gunstige Ca/P verhouding in het rantsoen voor het kuiken, alsmede de vraag naar de hoeveelheid Ca en P, die in het voedsel noodig zijn om een normale beenontwikkeling te waarborgen.

Indien men dit vraagstuk aan de hand van de gegevens in de literatuur bestudeert, dan blijkt aanstonds, dat hierover tusschen de verschillende onderzoekers in het geheel geen overeenstemming bestaat.

Volgens een mededeeling van Hart, Steenbock, Kletzien, Halpin en Johnson (1927) kan de Ca/P verhouding in het rantsoen voor kuikens tusschen zeer wijde grenzen schommelen en wel van 1 : 1 tot 7 : 1, zonder dat rachitische verschijnselen optreden, indien slechts wordt zorggedragen, dat voldoende vitamine D in het rantsoen aanwezig is. Mussehl, Blish en Ackerson (1927) stelden in hun proeven vast, dat bij een Ca/P verhouding 1.5 : 1 en een hoeveelheid Ca in het grondrantsoen van 3 % en een hoeveelheid levertraan van 2 % geen rachitis optrad. Door het toevoegen van 8 % beendermeel aan het grondrantsoen, waarbij alleen de absolute hoeveelheden Ca en P werden gewijzigd, maar waarbij de Ca/P verhouding onveranderd bleef, kregen zij een rantsoen, waarop niettegenstaande de 2 % levertraan, 19 van de 21 kuikens aan het einde van de proef rachitis vertoonden. Uit deze waarneming blijkt, dat behalve de levertraan en de Ca/P verhouding ook nog andere factoren een rol spelen bij het voorkomen van rachitis.

Een uitvoerige studie over de optimale Ca/P verhouding in het rantsoen voor kuikens is van Bethke c.s., (1929). Zij onderzochten den invloed van levertraan bij kuikens, die een verschillende hoeveelheid Ca en P in het rantsoen hadden alsmede

een verschillende Ca/P verhouding. Hierbij kwamen zij tot de conclusie, dat de optimale Ca/P verhouding in het rantsoen voor het groeiende kuiken gelegen is tusschen de waarden 3:1 en 4:1; bij deze verhoudingen is de behoefte aan het vitamine D het geringste. Verder bleek uit dit onderzoek, dat het toedienen van levertraan aan het rantsoen een grootere schommeling in de Ca/P verhouding mogelijk maakt, zonder dat nadeelige gevolgen optreden.

Van groot belang zijn hier de proeven van Massengale (1929), die kon aantonen, dat kuikens op een rachitogeen dieet met een laag Ca, maar hoog P gehalte in het rantsoen eerder beenzwakte vertoonden, dan wanneer het rachitogene dieet een laag P en hoog Ca gehalte had. Voegde hij levertraan aan het rachitogene dieet toe, dan steeg bij rachitische kuikens ook het Ca gehalte van het bloedserum, onverschillig welke de Ca/P verhouding in het voedsel was. Het toedienen van levertraan aan een rachitogeen dieet, waarvan het P gehalte ongeveer driemaal zoo groot was als het Ca gehalte, veroorzaakte een daling van het anorganische P gehalte in het bloedserum, daarentegen werd door het toedienen van levertraan aan kuikens op een rachitogeen rantsoen, waarvan het Ca gehalte grooter was dan het P gehalte, het gehalte aan anorganische P in het bloedserum verhoogd. In een later onderzoek zijn deze onderzoekingen voortgezet (Massengale en Nussmeier, 1930) en werden de veranderingen bestudeerd, die in het Ca en P gehalte van het bloedserum optraden bij een rachitogeen dieet, waarvan de Ca en P verhouding varieerde van 8:1 tot 1.6:1. Hierbij kwamen zij tot de conclusie, dat bij een Ca/P verhouding van 8:1 en in mindere mate bij een Ca/P verhouding van 5:1, het Ca gehalte van het bloedserum boven de normale waarde blijft, terwijl het anorganische P gehalte sterk gedaald is. Gaven zij nu bestraald ergosterol in een zeer groote overdoseering, dan namen zij in de groep met de Ca/P verhouding van 8:1 een duidelijke stijging van het Ca gehalte, maar een slechts geringe stijging van het P gehalte waar; bij de groep met een Ca/P verhouding 5:1 bleek na het toedienen van dezelfde hoeveelheid bestraald ergosterol de Ca- en P-waarden in het rantsoen bijna normaal te zijn. Bij het toedienen van bestraald ergosterol aan een rachitogeen dieet met een hoog Ca gehalte, waren de veranderingen in het

bloedserum binnen 48 uur waarneembaar. De Ca- en P-waarden van het bloedserum bij kuikens, die een rachitogeen dieet kregen met een Ca/P verhouding 1.6 : 1, bleven normaal, terwijl het toedienen van bestraald ergosterol geen effect had, totdat eindelijk na 15 tot 35 dagen een stijging van het Ca gehalte in het bloedserum werd geconstateerd. Betrof het proefdieet een rachitogeen rantsoen met een laag Ca en laag P gehalte, dan daalde zoowel het Ca als P gehalte in het bloedserum, terwijl na toedienen van bestraald ergosterol een duidelijke stijging van het Ca in het bloedserum waarneembaar was, maar slechts een geringe stijging van het P gehalte. Na 35 dagen was het Ca gehalte in het bloedserum bijna normaal, terwijl het anorganische P gehalte nog steeds beneden de normale waarde gebleven was.

Hart, Scott, Kline en Halpin (1930), die zich vroeger (1927) ook reeds met dit vraagstuk hadden bezig gehouden, bestudeerden nog eens de optimale Ca/P verhouding in het rantsoen voor groeiende kuikens en vonden, dat zij de onderzoekingen van Bethke c.s. (1929) konden bevestigen. De optimale Ca/P verhouding, zoowel voor den groei van de kuikens, alsook voor een normale verbeening van het skelet ligt tusschen de waarden 2:1 en 4:1 en wel bij een absolute hoeveelheid Ca variërende van 0.61 % tot 1.13 % en een absolute hoeveelheid P van 0.35 % bij aanwezigheid van voldoende vitamine D in het rantsoen. De kleinste hoeveelheid vitamine D was noodig in een rantsoen met een Ca/P verhouding van 4:1 tot 3:1 en een absolute hoeveelheid Ca van 2.49 % tot 1.71% en een hoeveelheid P van 0.66 % tot 0.83 %. Wilgus (1931), die soortgelijke proeven nam kwam tot een geheel ander resultaat; hij vond, dat de optimale Ca/P verhouding, waarbij de dieren zich goed ontwikkelden en geen rachitis kregen indien vitamine D werd gegeven lag tusschen 2.2:1 en 1:1; een verhouding van 2.5:1 was reeds twijfelachtig in de resultaten, terwijl een verhouding van 3.3:1 door hem fataal genoemd wordt. Wanneer de optimale hoeveelheid vitamine D werd gegeven, kon zooals onderzoeker vond met een minimum hoeveelheid Ca van 0.66 % worden volstaan, terwijl het P gehalte zelfs beneden 0.5 % kon dalen. De gehalten aan Ca en P in de praktijkrantsoenen zijn over het algemeen veel grooter. In een tweetal publicaties hebben Tully, Hauge, Carrick en Roberts (1931 a, b.) proeven weergegeven, waarbij

eveneens de hoeveelheid Ca werd bepaald, die noodig was voor groeiende kuikens. De mineralen werden toegediend in den vorm van zoutmengsels, waarvan de Ca/P verhouding varieerde. De resultaten die aldus werden bereikt waren niet gunstig, zoodat in plaats van in den vorm van zoutmengsels de mineralen nu in een natuurlijke vorm werden toegediend. Thans bleek, dat oesterschelpen en beendermeel de beste resultaten gaven en de meest gunstige Ca/P verhouding bij 3.3 : 1 gelegen was.

De minimum hoeveelheid P, waar beneden een merkbare groeivermindering werd waargenomen, bedroeg in deze proeven 0.66 %. Holmes en Pigott (1931) bestudeerden den invloed van levertraan op de kalkhuishouding bij jonge kuikens en stelden vast, dat de maximum Ca/P verhouding bij 1.5 : 1 gelegen was. Bij lage Ca/P verhoudingen werden de beste resultaten verkregen. De hoeveelheid Ca, die in het rantsoen noodig was, varieerde van 1 % tot 4 %. Andere rantsoenen met een Ca/P verhouding van 5 : 1 gaven slechten groei, slechte beveering en een slecht algemeen voorkomen van de dieren onverschillig of al dan geen levertraan werd gegeven. Parkhurst en McMurray (1932) bestudeerden den invloed van twee mengsels op den groei van kuikens alsook op het voorkomen van rachitis. In het eene mengsel was de Ca/P verhouding 4 : 1, met een Ca gehalte van 3 %, in het andere rantsoen was de Ca/P verhouding 0.44 : 1, met een Ca gehalte van 0.26 %. De resultaten van dit onderzoek waren in overeenstemming met die van Mussehl c.s., Massengale en Nussmeier, Wilgus en van Holmes en Pigott, die hadden waargenomen, dat te veel Ca in een rantsoen, dat voldoende vitamine D bevat, den groei remt en slechte ontwikkeling van het beenderstelsel ten gevolge heeft. De resultaten zijn dus niet in overeenstemming met die van Bethke c.s. (1929) en van Hart c.s., (1930) die voor de optimale Ca/P verhouding de waarde 4 : 1 aangeven. Zoowel bij een Ca/P verhouding van 4 : 1, als bij een Ca/P verhouding van 0.44 : 1 zagen onderzoekers ook bij de aanwezigheid van levertraan slechten groei en slechte ontwikkeling van de beenderen.

Mussehl en Ackerson (1932) werkten in hun proeven met eenige verschillende rantsoenen, waarvan de Ca/P verhoudingen waren als 2 : 1, 1 : 1 en 1 : 2. Uit hun proeven kregen zij echter duidelijke aanwijzingen, dat naast de Ca/P verhouding en voldoende levertraan nog een andere factor van beteekenis is voor

een goeden groei van de kuikens. Sherwood (1932) vond voor de optimale Ca/P verhouding van kuikens tot een leeftijd van 8 weken, wanneer gezorgd werd voor voldoende vitamine D in het rantsoen een waarde van 2.2 : 1. Het Ca gehalte schommelde hier van 1.13 % tot 2.2 % en het P gehalte van 0.64 % tot 0.88 %. De groei was bij deze verhouding goed, terwijl geen beenafwijkingen werden waargenomen.

Van groot belang zijn ook de proeven van Titus, McNally en Hilberg (1933), die het effect van CaCO_3 en CaSO_4 op de beenontwikkeling bij kuikens bestudeerden. Zij werkten met een Ca/P verhouding van 3.5 : 1 en 5.7 : 1, terwijl in de eene groep het calciumcarbonaat, in de andere groep het calciumsulfaat werd gebruikt. De hoeveelheid Ca in de rantsoenen varieerde tusschen 2.7 % en 3 %. Uit de resultaten van deze onderzoekers bleek nu, dat als de Ca/P verhouding groter werd het gemiddelde aschgehalte van de femora en tibiae der kuikens die het calciumcarbonaat in het rantsoen kregen daalde, terwijl het bij de dieren die het calciumsulfaat ontvingen iets toenam. Schrijvers meenen dit als volgt te kunnen verklaren: het calciumcarbonaat in het rantsoen van de eene groep zou in staat zijn het zuur in de kliermaag te neutraliseeren, terwijl dit natuurlijk niet het geval is met het calciumsulfaat. Daarbij komt, dat de zuur-basen balans in het eerste geval meer basisch is, in het tweede geval meer zuur. Dit heeft tot gevolg, dat bij de bevrijding van een overmaat van de geresorbeerde Ca in de eerste serie een grootere hoeveelheid van de zuurbestanddeelen, hier phosphorzuur, gevraagd wordt, waardoor derhalve in dit geval minder P ter beschikking komt. De conclusie, waartoe zij komen is ten slotte deze, dat zij van meening zijn, dat van één optimale Ca/P verhouding niet kan worden gesproken, maar dat deze voor alle rantsoenen verschillend is, terwijl verder ook de zuurbasen-balans een factor van groote beteekenis is voor een goede beenontwikkeling. Vermeldenswaard zijn in dit verband ook nog enkele onderzoekingen, waarbij de beteekenis van verschillende kalkbronnen bestudeerd werd. Buckner en Martin (1929) vonden, dat zoowel het CaCO_3 als het CaSO_4 goede kalkbronnen waren; in latere publicaties deelen Buckner, Martin en Insko (1929; 1930) mede, dat bij het gebruik van kalksteen, beendermeel, mineraalphosphaat, dicalciumphosphaat geen groeiverschillen konden worden waargenomen. Ook

Bethke, Kennard en Kick (1929) zagen geen verschil in het nuttig effect van de calciumzouten, te weten het carbonaat, sulfaat, lactaat en fosphaat, alsook van de natuurlijke kalkbronnen, nl. kalksteen, beendermeel, mineraalfosphaat of oesterschelpen. De werking van al deze kalkverbindingen op den groei en de beenvorming bij kuikens was volkomen gelijk, mits de toegediende hoeveelheden Ca equivalent waren.

Tot eenzelfde conclusie komen Hunter, Dutcher en Knandel (1933) ten aanzien van calciumcarbonaat, alsmede het calciumgluconaat.

Vatten wij de hiervoor genoemde onderzoeken samen, dan zien wij, dat de minimumhoeveelheid P, die geacht wordt noodig te zijn, bij omstreeks 0.5 % gelegen is, terwijl over de meest gewenschte Ca/P verhoudingen twee stroomingen vallen waar te nemen. De eene groep onderzoekers vonden de meest gunstige verhouding tusschen Ca en P bij een waarde van 4 : 1 of 3 : 1, terwijl de andere groep de beste resultaten bij een Ca/P verhouding 1.5 : 1 vermelden. Zeer terecht hebben Titus c.s. (1933) aangetoond, dat de optimale verhouding niet voor alle rantsoenen dezelfde is. Dit is geheel en al in overeenstemming met de resultaten van Shohl c.s. (1932), die in proeven met ratten konden vaststellen, dat voor ieder absolute hoeveelheid Ca in het rantsoen aanwezig, een verschillende Ca/P verhouding noodig is om rachitis op te wekken. Ook Querido heeft aan het Physiologisch-Chemisch Laboratorium te Amsterdam dit vraagstuk bestudeerd, waarvan evenwel tot nu toe geen mededeeling is gepubliceerd. Hierbij kon hij aantoonen, dat de optimale Ca/P verhouding in het rantsoen voor ratten, d.w.z. die Ca/P verhouding, waarbij de behoefte aan het antirachitische vitamine het kleinste is, afhangt van de absolute hoeveelheden Ca en P in het toegediende rantsoen. In onze eigen proeven besloten wij, op grond van de hiervoor genoemde gegevens, een rantsoen samen te stellen met een P gehalte van ongeveer 0.4 % tot 0.5 % en een Ca/P verhouding van 4 : 1. De kans was hierbij o.i. het grootste, dat op dit rantsoen, zowel de rat als het kuiken binnen korten tijd rachitis zouden vertoonen.

4. *Critische beschouwingen over enkele oudere onderzoeken.*

Zoals hiervoor reeds werd besproken, hebben verschillende onderzoekers aangetoond, dat in den vorm van bestraald er-

gosterol veel meer ratteneenheden noodig zijn om rachitis bij kuikens te voorkomen dan in den vorm van levertraan. In onze eigen onderzoekingen, waarvan de bespreking in het tweede hoofdstuk wordt gegeven, konden wij deze waarneming bevestigen. Dat neemt niet weg dat wij enkele bezwaren hebben tegen de in deze oudere onderzoekingen gevolgde methode, waarop wij hier met een enkel woord willen wijzen. In de eerste plaats komt het ons onjuist voor, dat men bij vergelijking van twee verschillende vitamine D bronnen bij twee verschillende diersoorten, geheel onnoodig, ook nog gaat werken met twee verschillende dieeten, waarvan de absolute hoeveelheden Ca en P, alsook de Ca/P verhouding sterk verschillen. In verband met hetgeen wij hiervoor reeds over de beteekenis van de absolute hoeveelheden Ca en P, alsook over deze verhouding mededeelden lijkt ons dit zeer ongewenscht. Bovendien is het geheel overbodig, daar het ons mogelijk bleek een dieet samen te stellen, waarop zowel de rat als het kuiken groeien, in leven blijven en in betrekkelijk korten tijd rachitis krijgen. Geen der oudere onderzoekers die zich met dit vraagstuk bezig hield, heeft hiermede rekening gehouden, zoodat wij meenen hierop de aandacht te moeten vestigen. Een tweede zeer belangrijke kwestie is de vraag of het geoorloofd is bestraalde ergosterol preparaten met levertraan te vergelijken, zonder dat zorg is gedragen, dat in de groepen die het bestraalde ergosterol als vitamine D bron ontvingen, het vitamine A op een of andere wijze wordt aangevuld. Wel is waar beweerden Emmet en Paacock (1923) en Hart, Steenbock, Lepkovsky en Halpin (1924), dat kuikens geen vitamine A in het rantsoen noodig hebben, de latere onderzoekingen van Hauge, Carrick en Prange (1927) en die van Elvehjem en Neu (1932) hebben daarentegen duidelijk aangetoond, dat kuikens wel degelijk gevoelig zijn voor een tekort aan vitamine A in het rantsoen. Holmes en Pigott (1930), alsook Poulsson (1931) gaan zelfs zover, dat zij het verschil in werking tusschen levertraan en bestraald ergosterol aan het vitamine A toeschrijven. Ook dit is evenwel onjuist zooals uit de proeven van Russel en Klein (1931), Rohmer en Dubois (1931), Steenbock, Kletzien en Halpin (1932), Hunter, Dutcher en Kandel (1932), alsook uit die van Bethke, Record en Kennard (1933) bleek. Dit neemt niet weg, dat het o.i. beter ware geweest, indien men gezorgd

had, dat ook ten opzichte van de voorziening in het vitamine A alle groepen onder volkomen dezelfde omstandigheden verkeerden. Vooral indien men in aanmerking neemt, dat het vitamine A het weerstandsvermogen van het dier verhoogt en den groei bevordert en men voorts bedenkt, dat juist een snelle groei het optreden van rachitis bevordert, lijkt ons voorzichtigheid in deze geboden en komt men niet uit met de bewering, dat het grondrantsoen voldoende vitamine A bevatte, getuige het feit, dat geen A-deficientie-verschijnselen optraden. Een derde bezwaar, dat uitsluitend de Amerikaansche onderzoekingen betreft, is het criterium dat gebruikt werd voor het vaststellen van rachitis bij kuikens, waarvoor in deze onderzoekingen gebruik werd gemaakt van het aschgehalte in de beenderen. Reeds uit zuiver theoretische overwegingen zijn wij van meening, dat het aschgehalte als criterium voor rachitis niet juist kan zijn. Immers het rachitische proces speelt zich af in een nauwe zône rond de epiphyse en het wil ons voorkomen, dat veranderingen in het Ca gehalte in deze zône, onvoldoende tot uitdrukking komen in het aschgehalte van het heele been. Adams en McCollum (1928) vestigden er reeds de aandacht op, dat het niet mogelijk is de antirachitische waarde van levertraan vast te stellen door middel van de aschbepaling in de tibiae bij ratten. Zeer leerzaam zijn in dit verband ook de onderzoekingen van John, Kempf en Bond (1933), die aantoonde, dat het aschgehalte in de tibiae bij kuikens op verschillende plaatsen geheel verschillende waarden te zien gaf. Daarnaast wees hij op de verschillen in methode bij de bepaling van het aschgehalte, die een vergelijking van de resultaten van verschillende onderzoekers onmogelijk maakt. Van beteekenis in dit verband zijn ook de onderzoekingen van Holmes, Pigott en Moore (1932) en van Schroeder (1933), die wijzen op den invloed die het geslacht op het aschgehalte bij kuikens uitoefent. Uit hun proeven bleek, dat de tibiae van mannelijke kuikens langer waren en een grootere diameter hadden, dan de tibiae van even oude vrouwelijke dieren. Op een leeftijd van drie weken was het aschgehalte van de tibiae der hanen iets hooger dan van de hennen; op een leeftijd van zes weken was daarentegen het omgekeerde het geval, hetgeen op een leeftijd van negen weken nog duidelijker uitkwam.

Lachat (1934) is op grond van zijn onderzoekingen van

meening, dat het seizoen van invloed is op het aschgehalte van de beenderen. Dit is geheel in overeenstemming met de oudere waarnemingen van Hart c.s. (1925) en van Hughes c.s. (1925), dat zonlicht van invloed is op het aschgehalte van de tibiae bij kuikens. Ook Heuser en Norris (1926) vestigen hierop nog eens de aandacht. Miller, Dutcher en Knandel (1929) vergeleken de resultaten van de line-test met de cijfers van het aschgehalte in de beenderen en vonden dat deze niet met elkaar in overeenstemming waren. Tevens wezen zij erop, dat in de groepen met zware rachitis op het critieke moment een groeistilstand intreedt, waardoor het aschgehalte van 28 tot 33 % kan stijgen. Heuser en Norris (1928/29) konden eveneens aantonen, dat de verschillende methoden voor het vaststellen van rachitis niet met elkaar in overeenstemming waren. De verschillen in aschpercentage tusschen de normale en afwijkende groepen bleken lang niet altijd significant te zijn.

Dat tenslotte een laag aschgehalte van de beenderen geen absoluut bewijs is, dat men met rachitis te doen heeft, is duidelijk wanneer wij bedenken, dat ook bij osteoporose het aschgehalte van de beenderen sterk verlaagd is, waarop voor kuikens o.a. door Pappenheimer en Dunn (1925) en door McGowan en Emslie (1934) wordt gewezen.

Uit bovenstaande overwegingen leek het ons derhalve zeer gewaagd het aschgehalte als criterium voor rachitis te gebruiken. Ofschoon niet in alle Amerikaansche publicaties die zich met dit vraagstuk bezig hielden kon worden nagegaan in hoever de aschgehalten in de verschillende proefgroepen werkelijk ook verschillend waren, vooral door gebrek aan gedetailleerde cijfers, waren wij hiertoe wel in staat bij de publicatie van King, Hull en Hall (1933). Onze berekeningen, die wij met behulp van de waarschijnlijkheidsrekening uitvoerden toonden aan, dat ofschoon oogenschijnlijk de aschgehalten van de groepen met 2 % levertraan en 2 % bestraald ergosterol duidelijk verschilden, tengevolge van de sterke strooing, de verschillen bij berekening niet significant bleken te zijn, zoodat de hieruit getrokken conclusie o.i. niet verantwoord was.

Alleen in de publicaties van Ubbels (1933; 1934) en Voet (1934) werd als criterium de röntgenfoto gebruikt. Daar tot nu toe de gedetailleerde cijfers door Ubbels niet werden gepubliceerd moeten wij volstaan met de mededeeling, dat ook hij op

grond van zijn bevindingen in praktijkproeven de waarneming van de Amerikaansche onderzoekers in zake het verschil in werking tusschen levertraan en bestraald ergosterol kon bevestigen. Voet daarentegen komt tot de conclusie, dat mits beide producten, dus het bestraalde ergosterol en levertraan, in een gelijk aantal internationale eenheden worden toegediend, de werking op rachitische kuikenprocessen overeenkomt. Deze conclusie achten wij, in verband met ons eigen werk, in haar algemeenheid onjuist, al kunnen wij niet nagaan welke factoren hier tot deze uitkomst hebben geleid.

Wat nu, de in het volgend hoofdstuk nader te bespreken eigen onderzoekingen betreft, volstaan wij hier met de mededeeling, dat wij met de hiervoor genoemde bezwaren rekening hebben gehouden en steeds hebben getracht alle omstandigheden voor alle diergroepen, zoo volkomen mogelijk, gelijk te maken.

TWEEDE HOOFDSTUK.

EIGEN ONDERZOEK.

1. *Proeftechniek.*

a. De proefdieren. Zoals in het vorige hoofdstuk reeds is medegedeeld, werd in dit onderzoek gebruik gemaakt van een tweetal soorten proefdieren, nl. de rat en het kuiken. De rat werd gekozen om, naar internationaal gebruik, de vitamine D preparaten te ijken en hun antirachitische werking onderling te kunnen vergelijken. Het eigenlijke proefdier was derhalve het kuiken, waarbij de werking van de kunstmatige en natuurlijke vitamine D preparaten bestudeerd werd. De in deze ijkproeven gebruikte albinoratten waren gekweekt in het Physiologisch Chemisch Laboratorium te Amsterdam uit een stam via de Glaxo Co. te Londen afkomstig van het Wistar Institute, waarbij bovendien in vrij sterke mate inteelt was toegepast. Voor onze ijkproeven werden zooveel mogelijk gelijksoortige dieren gekozen, die allen ongeveer 3 weken oud waren en bovendien van ongeveer hetzelfde gewicht nl. 35 tot 45 g.; somtijds werden ook enkele zwaardere en lichtere dieren erbij gebruikt. In de kuikenproeven werd steeds met eendagskuikens gewerkt, die terstond na de ontvangst over de verschillende groepen werden verdeeld. Hiertoe zijn voor de eerste proevenreeks Noord-Hollandsche Blauwen aangekocht, die ons minder goed voldeden en bovendien zeer ongelijksoortig waren. In de volgende proevenreeksen werden witte Leghorn kuikens gebruikt, die steeds van hetzelfde bedrijf werden betrokken. Ze waren zooveel mogelijk van denzelfden toom kippen afkomstig, die steeds op dezelfde wijze waren gevoed en gehuisvest. Daar deze kippen geen levertraan in hun rantsoen ontvingen, maar in de plaats hiervan een bestraald ergosterol preparaat, mag

worden aangenomen op grond van de onderzoeken van Klein en Russel (1931) en van Branion en Smith (1932), dat de reserve aan vitamine D bij deze eendagskuikens niet groot geweest kan zijn. Met uitzondering van de laatste twee groepen, wogen deze witte Leghornkuikens bij ontvangst 45 tot 50 g.; de kuikens in de laatste twee groepen, die in een minder gunstigen tijd werden gebroed van jongere hennen wogen slechts 25 tot 30 g. en bleken veel minder levensvatbaar te zijn.

b. De huisvesting. De in de ijkproeven gebruikte ratten waren allen afzonderlijk gehuisvest in zinken kooien, waarin een van metaaldraad gevlochten open bodem, ten einde coprophagie zooveel mogelijk te voorkomen. Gedurende den geheelen proefduur hadden de dieren steeds voedsel en stroomend leidingwater onder hun bereik. De eendagskuikens waren ondergebracht in zelf ontworpen houten kooien van ruim 1 m² groot, waarin een uitneembare gaasbodem was aangebracht. De kooien waren ondergebracht in een vertrek, dat door verwarming op de vereischte temperatuur werd gebracht. Bovendien was in iedere kooi nog een klein gedeelte, door een flanelen gordijn afgeschut, dat met behulp van een tweetal zwarte kooldraadlampen extra kon worden verwarmd. De temperatuur in het lokaal en in de hokken werd nu geregeld al naar gelang van den leeftijd van de kuikens. Als regel werden in iedere kooi twintig kuikens gehuisvest, welk aantal bij het grooter worden somtijds tot 10 werd verminderd. Het lokaal zelf had een tweetal vensters, die voorzien waren van dik glas, — gedeeltelijk z.g. ijsglas — en die nimmer werden geopend, zoodat de kuikens nooit direct zonlicht ontvingen. Ten overvloede waren deze vensters nog oranje geverfd om de ultraviolette stralen zooveel mogelijk te weren. Het voedsel en drinkwater werd aan de kuikens in metalen bakken verstrekt.

c. De voeding. Zooals reeds terloops is opgemerkt lag het in de bedoeling om de ratten en kuikens hetzelfde rachitogene dieet te geven, natuurlijk zoodanig samengesteld, dat binnen den kortst mogelijken tijd beide diersoorten ook inderdaad rachitis vertoonen. Nu waren uit de literatuur weliswaar een tweetal dieeten voor ratten bekend nl. het Steenbock dieet 2965 en het McCollum dieet 3143, die meestal bij de ijking van vitamine D preparaten met ratten worden gebruikt. Het was zeer twijfelachtig of op een van deze dieeten de kuikens in leven zouden

kunnen blijven. Beter kon worden uitgegaan van uit de literatuur bekende rachitogene kuikendieeten, mits slechts werd zorg gedragen, dat het P gehalte niet al te veel van 0.35 % verschilde en de Ca/P verhouding niet kleiner dan 4 bedroeg. Op de beteekenis van deze waarden is o.m. door Shohl c.s. (1932) duidelijk gewezen. Uitgaande van de gegevens die werden gevonden in de door Hart, Kline en Keenan (1931); Griem (1932); Lachat, Halvorson en Palmer (1932); Steenbock, Kletzien en Halpin (1932) en door King, Hull en Hall (1933) beschreven rachitogene kuikenrantsoenen is toen het volgende mengsel samengesteld, dat in de oriënterende proeven met ratten en kuikens goed bleek te voldoen. In tegenstelling met de hiervoor genoemde rachitogene kuikenrantsoenen, bevat dit mengsel geen phosphorzure kalk, maar uitsluitend calciumcarbonaat. Hierdoor is het P gehalte van dit rantsoen lager dan bij andere onderzoekers en de Ca/P verhouding 4 spoediger bereikt. De samenstelling van het proefrantsoen is dan als volgt: 144 deelen gele mais; 60 deelen tarwegries; 30 deelen ruwe caseïne; $3\frac{1}{2}$ deelen gedroogde biergist, 10 deelen calciumcarbonaat en $2\frac{1}{2}$ deelen keukenzout. De chemische analyse gaf aan, dat het P gehalte van dit voedsel varieerde van 0.42 % tot 0.45 % en het Ca gehalte van 1.80 % tot 1.85 %; de Ca/P verhouding was dus ruim 4.

Bijzondere aandacht werd besteed aan de in dit voeder gebruikte grondstoffen en zorg werd gedragen, dat van alle producten voldoende in voorraad gehouden werd om al de projecteerde proeven te kunnen nemen, zonder dat een nieuwe partij grondstoffen behoefde te worden aangekocht. Hierin zijn wij vrijwel geslaagd; alleen met de caseïne kwamen wij niet uit en zoo moest voor de laatste reeks caseïne worden bijgekocht. Wij bestelden toen van dezelfde fabriek dezelfde soort caseïne, hetgeen zooals de analyse aantoonde geen verschil in het Ca en P gehalte van het rantsoen uitmaakte. Dat deze voorzorgsmaatregel evenwel vooral voor producten als mais van belang is volgt duidelijk uit de onderzoekingen van Holmes en Tripp (1932), die de aandacht vestigden op de groote schommelingen van het P gehalte in mais, waardoor de Ca/P verhouding in kunstmatige dieeten sterk kan variëren. Deze waarneming kon ook door Davies (1934) worden bevestigd, terwijl Schieblich (1933) aantoonde tot welke resultaten men bij het ijken van

vitamine D preparaten komt, indien men het P gehalte van het rantsoen verlaagt.

d. Chemische analyses. De chemische analyses, die door ons werden uitgevoerd, waren voornamelijk de Ca en P bepaling in het voederrantsoen en de aschbepaling in de tibiae van de kuikens.

Bij de Ca en P bepaling in het voeder, werd dit eerst langs den natten weg, volgens Neumann, verascht. Dit geschiedt door een sterk oxydeerend mengsel van gelijke deelen sterk zwavelzuur en sterk salpeterzuur, waarbij door het voortdurend langzaam toevoegen van kleine hoeveelheden sterk salpeterzuur verkoling wordt voorkomen.

De bepaling van het Ca geschiedde nu in deze heldere zwavelzure oplossing volgens een titrimetrische methode, die op het volgende principe berust. Het Ca wordt in de zwavelzure oplossing door toevoeging van 96 % alcohol neergeslagen, totdat de alcohol concentratie 75 % bedraagt. Ter verwijdering van eventueel kiezelzuur, wordt het neerslag in zoutzuur opgelost en het Ca hieruit als oxalaat neergeslagen en vervolgens op een filter gebracht. Nadat het neerslag goed is uitgewasschen wordt het vervolgens opgelost in verdund zwavelzuur. Het hierbij vrijkomende oxaalzuur wordt nu door titratie met kaliumpermanganaat van bekende sterkte bepaald en hieruit de hoeveelheid Ca die aan het oxaalzuur gebonden was berekend.

De P bepaling, die werd gebruikt, sloot eveneens aan bij de verassing langs natten weg volgens Neumann. De P werd uit de zwavelzure oplossing neergeslagen met ammoniummolybdaat onder aanwezigheid van ammoniumnitraat. Dit neerslag wordt vervolgens opgelost in een nauwkeurig afgemeten hoeveelheid $n/2$ natronloog en door koken de hierbij gevormde ammoniak verwijderd. De niet verbruikte natronloog wordt nu vervolgens met $n/2$ zoutzuur teruggetitreerd, waarbij als indicator phenolphthaleïne werd gebruikt. Uit de gevonden cijfers kan nu worden berekend, hoeveel ammoniumphosphormolybdaat door de natronloog was opgelost en hieruit de hoeveelheid P.

De aschbepaling in de tibiae werd als volgt uitgevoerd. Nadat de tibiae waren vrijgeprepareerd en geheel ontdaan van het spierweefsel, werden ze met een groven handdoek afgewreven om de laatste aanklevende vleesch- en vetresten te verwijderen. Vervolgens werden de hotjes gedurende 24 uur gedroogd bij

een temperatuur van 105° C; daarna gedurende 2 × 24 uur met absolute alcohol geëxtraheerd, vervolgens wederom gedroogd en daarna in een oven bij 800° C verascht. Het aschpercentage wordt nu omgerekend op de vetvrije droge stof van de tibiae.

Dat het gewenscht is ook hier een uniforme methode toe te passen, maar dat men hieraan nog lang niet toe is, daar tal van variaties op de hiervoor genoemde methode in gebruik zijn, blijkt uit een publicatie van John, Kempf en Bond (1933).

e. Röntgenfoto. Bij de beoordeeling van de röntgenfoto's van het kniegewricht van de ratten en van het spronggewricht van de kuikens, werden door ons in de tabellen de volgende teekens gebruikt, waarvan de beteekenis is als volgt: — geen rachitis; ? twijfelachtige rachitis; ± zeer lichte rachitis; + duidelijke rachitis.

2. Dierproeven.

Zoals uit de bespreking van de elders genomen proeven blijkt, is het voor een goede vergelijking van de antirachitische werking van levertraan en bestraald ergosterol bij kuikens noodzakelijk, dat bij de ijking van deze twee te vergelijken producten met ratten gebruik wordt gemaakt van hetzelfde dieet, dat later ook in de kuikenproeven zal worden gebruikt. Alvorens evenwel tot de ijkproeven met ratten en de proeven met kuikens over te gaan diende echter eerst te worden vastgesteld of zowel de ratten als ook de kuikens op dit dieet kunnen leven en daarbij rachitis krijgen. Tot dit doel werden een tweetal oriënterende proeven gedaan.

Oriënterende rattenproef. Hiertoe werd in de rattenproef gebruik gemaakt van een 12-tal witte ratten, te weten 6 mannetjes en 6 wijfjes die allen gedurende 14 dagen het hiervoor beschreven rachitogene grondrantsoen ontvingen. De groei en de gezondheidstoestand der dieren was op dit dieet uitstekend. Na 14 dagen werden de dieren voor het eerst geröntgend en daarna gedurende nog een week op het genoemde grondrantsoen gehouden. Daarna werden ze opnieuw geröntgend. Gedurende de hier genoemde drie weken ontvingen de dieren naast het grondrantsoen driemaal per week met behulp van een pipet 0.1 cc van een carotine oplossing in grond-

notenolie, waarvan het vitamine A gehalte overeenkwam met dat van goede levertraan. Ter controleering van den groei werden de ratten driemaal per week gewogen. Van den 21sten dag af werden de dieren in twee groepen verdeeld; de eene groep bestond uit de ratten nos. 6228 t/m 6230 en 6234 t/m 6236, de andere groep uit de ratten nos. 6231 t/m 6233 en 6237 t/m 6239. De eersten ontvingen nu in plaats van de carotine oplossing in grondnotenolie driemaal per week een hoeveelheid onverzeeppaar deel van levertraan, waarvan het aantal vitamine D eenheden overeenkwam met 2.5 maal de prophylactische dosis zooals deze later in de ijkproeven voor de betreffende levertraan werd gevonden; de tweede groep ontving een hoeveelheid onverzeeppaar deel van levertraan waarvan het aantal vitamine D eenheden overeenkwam met 5 maal de prophylactische dosis. Het gebruikte onverzeeppare deel van levertraan was bereid volgens de door Burr en Burr (1929) beschreven methode.

Na een week werden de ratten nu voor de derde maal geröntgend; nagegaan werd of na het toedienen van het onverzeeppare deel van de levertraan een verandering in het röntgenbeeld viel waar te nemen. De resultaten van deze oriënteringsproef zijn in tabel nr. 1 samengevat.

TABEL 1.

Nr. Geslacht	6228 ♀	6229 ♀	6230 ♀	6231 ♀	6232 ♀	6233 ♀	6234 ♂	6235 ♂	6236 ♂	6237 ♂	6238 ♂	6239 ♂
Begingewicht . .	g. 35	g. 35	g. 32	g. 45	g. 44	g. 45	g. 48	g. 45	g. 44	g. 48	g. 41	g. 46
na 14 dagen . .	65	52	67	92	75	78	95	88	81	106	79	80
" 21 " . .	90	72	80	106	100	104	124	117	104	138	100	97
" 28 " . .	112	88	91	119	117	125	152	146	128	165	107	120
Röntgendiagnose. na 14 dagen . .	†	†	†	†	?	†	†	†	†	†	†	†
" 21 " . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
" 28 " . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Toen de ratten voor de eerste maal werden geröntgend, vertoonden van de 12 er 11 duidelijk rachitis, waarbij viel waar te nemen, dat de verschijnselen bij de mannetjes sterker waren dan bij de wijfjes. Bij een der wijfjes was geen verschijnsel van rachitis waarneembaar. De resultaten bij de tweede maal röntgenen lieten slechts weinig verschil zien en ook ditmaal

was bij het hiervoor genoemde wijfje geen duidelijke rachitis aanwezig. Bij de derde röntgenopname konden wij vaststellen, dat alle dieren ten naaste bij genezen waren zoodat hiermede ook de antirachitische werkzaamheid van het door ons gemaakte onverzeepbare deel uit de levertraan was aangetoond.

De resultaten kunnen in de volgende conclusies worden samengevat:

a. Het door ons samengestelde en beschreven rantsoen is bij ratten bruikbaar om vitamine D preparaten te ijken.

b. het onverzeepbare deel van levertraan is in staat bij ratten rachitis te genezen en bevat derhalve de antirachitische factor.

Oriënteerende Kuikenproef. Het doel van deze proef was na te gaan of bij kuikens, op het beschreven grondrantsoen gehouden, rachitis optreedt. Hiertoe werden 12 eendagskuikens in de proef gezet; de diertjes ontvingen het grondrantsoen waaraan 2% grondnotenolie met carotine werd toegevoegd. Evenals de ratten werden ook de kuikens driemaal per week gewogen, terwijl met behulp van de röntgenfoto de verbeening werd gevolgd. Op een leeftijd van 22 dagen waren alle kuikens kennelijk ziek en lijdende aan rachitis. De kuikens liepen heel weinig maar zaten ineengesloten in de hokken. Het veerenkleed was ruig en bij een drietal diertjes was reeds een gewichtsvaling waar te nemen. Ook de röntgenfoto gaf een beeld te zien, dat aan de diagnose rachitis geen twijfel liet. Toen deze feiten waren vastgesteld, werden de kuikens in drie groepen verdeeld en vervolgens de curatieve werking van het vitamine D uit levertraan nagegaan.

De eerste groep ontving nu van dezen dag af het grondrantsoen, waaraan 4% grondnotenolie met carotine was toegevoegd; de tweede groep kreeg het grondrantsoen met 4% levertraan, terwijl de derde groep het grondrantsoen ontving, waaraan zoveel onverzeepbaar deel uit levertraan, opgelost in 4% grondnotenolie met carotine was toegevoegd, als overeenkwam met 4% levertraan.

Tot en met de zevende week werd de proef voortgezet, waarbij de invloed van het toedienen van het vitamine D wekelijks aan de hand van de röntgenfoto werd gevolgd.

Van de vier kuikens uit de eerste groep stierven er twee vóór het einde van de proef, o.a. kuiken nr. 12. Dit kuiken vertoonde duidelijke kenteekenen van totale uitputting. De groei stond

reeds gedurende drie weken geheel stil; dit was trouwens eveneens het geval met de twee overblijvende dieren, waarbij de groei ongeveer 10 gram per week bedroeg. Het eerste kuiken, nr. 5, was twee dagen na de indeeling zonder bijzondere verschijnselen gestorven; het betrof een diertje dat bij de indeeling reeds een gewichtsdaling vertoonde. Het geheele voorkomen van de twee overlevende dieren, het loopen alsook de röntgenfoto wees op rachitis. Dit werd aan het einde van de zevende week ook bij de sectie bevestigd. Bij alle vier de kuikens leerde de sectie, dat het hier echte rachitis betrof; bij deze kuikens was een duidelijke rachitische rozenkrans waarneembaar; daarnaast vertoonde het beenmerg bloedingen en was slijmerig. Aschbepalingen werden ditmaal niet gedaan daar zooals reeds betoogd naar onze meening het aschgehalte een zeer gevaarlijk criterium is, maar daar bovendien het aantal dieren te klein was om hieruit iets te kunnen besluiten.

De kuikens uit de tweede groep brachten het er iets beter af; hiervan stierf één diertje, nl. nr. 2, vòòr het einde van de proef. Ook dit was wederom een kuiken, dat bij de indeeling reeds een gewichtsdaling vertoonde. De verschijnselen waaronder dit diertje stierf waren zeer eigenaardig. Daags na de indeeling in de tweede groep werd het gewogen, waarbij bleek, dat het reeds een derde van zijn gewicht had verloren. Voorts vertoonde het dier sterke krampen, die aan tetanie deden denken. Het toedienen van een hoeveelheid vitamine D oplossing per pipet, veroorzaakte zulk een hevige aanval, dat het kuiken hierin dood bleef. Een poging om het Ca-gehalte in het bloed te bepalen, ten einde een definitieve diagnose „tetanie” te kunnen stellen, mislukte. De plotselinge dood bij het toedienen van levertraan komt meer voor en werd reeds vroeger door Hall en King (1931) beschreven, die het eveneens waarnamen bij rachitische kuikens. Zij meenden met een vergiftiging door levertraan te doen te hebben. Dat het diertje inderdaad rachitis had bleek uit de sectie, waarbij een duidelijke rozenkrans, sterk verbogen ribben en bloedingen in het beenmerg werden waargenomen.

De andere drie kuikens uit deze groep werden aan het einde van de zevende week gedood. Zoowel het uitwendig voorkomen der diertjes, het loopen, het veerenkleed alsook de röntgenfoto hadden reeds geleerd, dat de toestand van de kuikens aan-

zienlijk vooruit was gegaan in vergelijking met dien op den dag van indeeling. Deze opvatting vond bevestiging bij de sectie. Geen der drie kuikens vertoonde een rozenkrans, wel viel nog een lichte verbuiging van de ribben te onderkennen.

Het verloop in de derde groep kwam veel overeen met dat in de tweede; ook hier stierf kuiken, nr. 10, dat bij de indeeling reeds een gewichtsdaling vertoonde, na twee dagen. Evenals het kuiken uit de tweede groep vertoonde dit diertje ook verschijnselen, die op tetanie wezen, maar die ook wel even aan polyneuritis deden denken. Derhalve werd dit kuiken een B₁ oplossing, waarin 60 γ , ingespoten; verbetering viel in de eerste uren niet waar te nemen. Den volgenden morgen werd het kuiken dood gevonden. De sectie toonde ook hier een duidelijken rozenkrans, sterk verbogen ribben en bloedingen in het beenmerg aan.

De overige drie dieren uit deze groep werden aan het einde van de zevende week gedood. Het uitwendig voorkomen had een groote verbetering ondergaan; zoowel het loopen alsook het veerenkleed waren veel beter, hetgeen in overeenstemming was met het resultaat van de röntgenfoto, die ook een groote vooruitgang te zien gaf. De sectie gaf dezelfde uitkomst; weliswaar was het resultaat niet zoo fraai als in de levertraan-groep, maar toch was van een duidelijken rozenkrans, zooals in de contrôle-groep werd gevonden geen sprake. Alleen bleken de ribben wat verbogen te zijn. Wij voor ons zijn derhalve van meening, dat het onverzeepbare deel van de levertraan niet alleen den factor bevat, die in staat is ratten-rachitis te genezen, maar dat dit deel van de traan eveneens in staat is, kuiken-rachitis te genezen. Dit resultaat is evenwel niet in overeenstemming met de conclusies uit de reeds besproken publicatie van Pappenheimer en Dunn (1925), die vaststelden, dat het toedienen van de actieve anti-rachitische fractie uit het onverzeepbare deel van levertraan „legweakness” niet voorkomt. In een volgende proevenreeks werd ook dit feit nog nader aan onze eigen proefresultaten getoetst.

Wat de groei van de kuikens betreft, deze was niet geheel en al bevredigend, al moet natuurlijk niet worden vergeten, dat het hier een curatieve proef betreft waarbij de kuikens ziek werden en de groei gedurende geruimen tijd stil stond. Daar het voor een goede beoordeeling van de werking van vitamine D

preparaten noodzakelijk is, dat de dieren goed groeien, hebben wij bij de verdeling van de kuikens in drie groepen op den 22sten dag de zwaarste en best groeiende dieren in die groepen geplaatst, die een toelage van vitamine D naast hun grondrantsoen ontvingen. De resultaten van de hiervoor besproken proef zijn in tabel 2 samengevat.

TABEL 2.

	Groep 1. Grondrantsoen met 4% grondnotenolie met carotine.				Groep 2. Grondrantsoen met 4% levertraan.				Groep 3. Grondrantsoen met 4% grond- notenolie met carotine, waarin onverzeepbaar deel levertraan.			
	nr. 5	nr. 7	nr. 9	nr. 12	nr. 2	nr. 3	nr. 6	nr. 8	nr. 1	nr. 4	nr. 10	nr. 11
Begingewicht . . .	g. 33	g. 38	g. 34	g. 40	g. 33	g. 36	g. 37	g. 39	g. 33	g. 33	g. 34	g. 31
Gewicht 22 dagen	85	87	85	91	120	132	138	141	96	99	105	114
Gewicht einde van de proef		116	170	125		290	395	350	200	201		202
Röntgendiagnose . den 22sten dag . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Einde van de proef	dood	+	+	dood	dood	-	-	-	-	?	dood	-
Sectie	rzk.	rzk.	rzk.	rzk.	norm.	norm.	norm.	norm.	geen duidelijke rzk. ribben iets verbogen.			

rzk. = rozenkrans. norm. = normaal.

De conclusies die uit deze proef kunnen worden getrokken zijn de volgende:

a. Het door ons samengestelde en hiervoor beschreven grondrantsoen is ook in staat om bij kuikens, gedurende eenigen tijd op dit dieet gehouden, rachitis te veroorzaken.

b. In tegenstelling met de waarneming van Pappenheim en Dunn kon hier worden vastgesteld, dat het onverzeepbare deel van levertraan ook in staat is om rachitis bij kuikens te genezen.

Eerste Proevenreeks. Nadat in de oriënterende proeven was vastgesteld, dat het beschreven grondrantsoen, zowel bij ratten als bij kuikens bruikbaar was om rachitis te verwekken, kon met de eigenlijke proevenreeksen worden begonnen. Deze bestonden steeds uit inleidende rattenproeven met als slotproef de kuikenproef.

Het doel van de eerste reeks was de vraag te beantwoorden, of bij de hier gevolgde methode, waarbij de ratten en kuikens hetzelfde grondrantsoen ontvingen en waarbij ter beoor-

deeling van rachitis bij kuikens als criterium niet uitsluitend werd vastgehouden aan het aschgehalte in de beenderen, de resultaten van de in het eerste hoofdstuk besproken onderzoeken konden worden bevestigd, waarbij was gevonden, dat ter voorkoming van rachitis bij kuikens veel meer ratten-eenheden vitamine D noodig waren in den vorm van bestraald ergosterol, dan in den vorm van levertraan.

1. De eerste taak was nu de later in de kuikenproef te gebruiken vitamine D bronnen op ratten biologisch te ijken. Onderzoekingen aan het Physiologisch Chemisch laboratorium te Amsterdam hadden aangetoond, dat van de hier te gebruiken levertraan per dag 4 mg. voldoende was om ratten op het Steenbock-dieet tegen rachitis te beschutten, terwijl met $\frac{1}{40}$ γ calciferol per dag kon worden volstaan. Uitgaande van dit feit werd onze eerste ijkproef met slechts drie groepen ratten, elk bestaande uit 4 mannetjes en 4 wijfjes, genomen; ze was meer bedoeld als contrôle op de reeds aan genoemd laboratorium verrichte ijking. De indeeling van deze proef was als volgt: de eerste groep, of wel de contrôle-groep, ontving het rachitogene grondrantsoen, waarnaast te beginnen op den derden dag, driemaal per week een hoeveelheid grondnotenolie met carotine per pipet werd gegeven en wel 2 maal 0.1 cc en de derde maal (Vrijdag) 0.15 cc.

De tweede, of wel de levertraan-groep, ontving hetzelfde grondrantsoen en eveneens dezelfde hoeveelheid grondnotenolie, waarin een hoeveelheid levertraan was opgelost overeenkomende met 4 mg. levertraan per rat per dag.

De derde, of wel de calciferol-groep, ontving hetzelfde grondrantsoen en dezelfde hoeveelheid grondnotenolie met carotine, waarin ditmaal een hoeveelheid calciferol was opgelost, overeenkomende met $\frac{1}{40}$ γ per rat per dag. Gedurende 14 dagen werd de proef nu voortgezet, waarbij viel op te merken, dat de groei uitstekend was, terwijl sterfgevallen niet voorkwamen. Den 16den dag nadat de dieren in de proef waren gezet, werden ze geröntgend om na te gaan of de verstrekte hoeveelheden vitamine D inderdaad voldoende bleken te zijn om ratten op ons rachitogene dieet tegen rachitis te beschutten. Tot onze verbazing moest evenwel worden geconstateerd, dat dit niet het geval was; alle groepen vertoonden een duidelijke rachitis.

Was dus op het Steenbock-dieet 4 mg. levertraan of wel

1/40 γ Calciferol voldoende gebleken om per rat per dag toegediend, de dieren tegen rachitis te beschutten, op het hier beschreven dieet was dit beslist onvoldoende. Een vergelijking van de verschillende cijfers leerde, dat de dieren in onze proeven veel sterker waren gegroeid, zoodat misschien hieraan de grootere behoefte aan vitamine D moet worden toegeschreven. In hoeverre dit vermoeden juist is of in hoeverre hier andere factoren een rol hebben gespeeld valt zonder meer niet te zeggen; een nader onderzoek in dit probleem ligt echter buiten het bestek van ons onderzoek. In dit verband wordt gedacht aan de in ons literatuur overzicht besproken proeven van Schieblich (1933) en van Bruce en Callow (1934). De gegevens over den groei en de röntgendiagnose van deze proef zijn in tabel nr. 3 opgenomen.

TABEL 3.
Contrôle-groep.

Nr. Geslacht	6342 ♀	6343 ♀	6344 ♀	6345 ♀	6346 ♂	6347 ♂	6348 ♂	6349 ♂
Begingewicht.	g. 44	g. 37	g. 44	g. 45	g. 37	g. 38	g. 36	g. 39
Eindgewicht (na 16 dg.)	85	74	88	82	77	84	75	78
Röntgendiagnose . . .	+	+	+	+	+	+	+	+

Levertraan-groep.
(4 mg. levertraan per rat per dag).

Nr. Geslacht	6350 ♀	6351 ♀	6352 ♀	6353 ♀	6354 ♂	6355 ♂	6356 ♂	6357 ♂
Begingewicht.	g. 36	g. 36	g. 43	g. 44	g. 35	g. 42	g. 49	g. 35
Eindgewicht (na 16 dg.)	76	85	89	88	83	75	109	82
Röntgendiagnose . . .	+	+	+	+	+	+	+	+

Calciferol-groep.
(1/40 γ calciferol per rat per dag).

Nr. Geslacht	6358 ♀	6359 ♀	6360 ♀	6361 ♀	6362 ♂	6363 ♂	6364 ♂	6365 ♂
Begingewicht.	g. 40	g. 34	g. 35	g. 33	g. 31	g. 30	g. 39	g. 42
Eindgewicht (na 16 dg.)	86	54	66	59	65	70	90	77
Röntgendiagnose . . .	+	-	+	+	+	+	+	+

2. Bij beschouwing van het resultaat van deze eerste ijkproef zal het duidelijk zijn, dat de uitslag hiervan van dien aard was, dat een nieuwe ijking noodzakelijk was. Hiertoe werden ditmaal meerdere groepen met verschillende doseeringen ingezet. Helaas bleek het op dat oogenblik niet mogelijk de beschikking te hebben over zooveel ratten, dat elke groep met 10 dieren kon worden bezet. Daar uitstel niet mogelijk was werd volstaan met het vormen van groepen elk uit 6 ratten, nl. 3 mannetjes en 3 wijfjes.

De groepen indeeling in deze ijkproef was de volgende:

De eerste groep, of wel de contrôle-groep, ontving het rachitogene dieet, waarnaast driemaal per week per pipet een hoeveelheid grondnotenolie met carotine, nl. twee maal 0.1 cc en de derde maal (Vrijdag) 0.15 cc. De tweede groep, of wel de levertraan-groep A. ontving eveneens het grondrantsoen en daarnaast dezelfde hoeveelheid grondnotenolie, waarin thans levertraan opgelost en wel overeenkomende met een hoeveelheid traan van 6 mg. per rat per dag.

De derde groep, of wel de levertraan-groep B. ontving als toefgift wederom dezelfde hoeveelheid grondnotenolie met levertraan, met dien verstande, dat de doseering levertraan overeenkwam met een hoeveelheid van 8 mg. per rat per dag. De vierde en de vijfde groep waren de twee calciferol-groepen. De dieren uit deze groepen ontvingen naast het rachitogene grondrantsoen evenals in de vorige drie groepen per pipet dezelfde hoeveelheid grondnotenolie met carotine, waarin opgelost een hoeveelheid calciferol en wel in zoodanige concentraties, dat de hoeveelheid vitamine D die de dieren uit de vierde groep ontvingen overeenkwam met $1/30 \gamma$ per rat per dag en de doseering uit de vijfde groep met $1/20 \gamma$ per rat per dag.

Gedurende 14 dagen werd deze toelage verstrekt; den 16den dag werden de dieren geröntgend en het resultaat beoordeeld. Hierbij bleek, dat de ratten uit de contrôle-groep allen rachitis vertoonden. Ook in de levertraan-groep A. en de calciferol-groep A. kwamen nog dieren met rachitis voor. Daarentegen bleken de ratten uit de derde en vijfde groep beschut te zijn. Ten einde absolute zekerheid te hebben, dat de doseering voldoende was en dat geen spontane genezing optrad werden de ratten gedurende nog veertien dagen op hetzelfde grondrantsoen gehouden met dezelfde vitamine D toelage en vervolgens op-

nieuw geröntgend. Evenals bij de eerste röntgenopname bleek ook hier, dat de ratten uit de eerste groep allen rachitis hadden terwijl in de tweede en vierde groep verscheidene dieren duidelijk ziek waren; de derde en de vijfde groep bleken met uitzondering van een dier volkomen normaal te zijn.

De groei was in alle groepen goed; in de derde en vierde groep kwam een sterfgeval voor.

De resultaten van deze ijkproef zijn in onderstaande tabel nr. 4 samengevat.

TABEL 4.

1. Contrôle-groep.

Nr. Geslacht	6565 ♀	6566 ♀	6567 ♀	6568 ♂	6569 ♂	6570 ♂
Begingewicht	g. 35	g. 33	g. 33	g. 30	g. 36	g. 35
Gewicht na 16 dagen	66	69	73	63	81	78
Eindgewicht na 28 dagen	95	96	98	106	126	124
Röntgendiagnose na 16 dagen	+	+	+	+	+	+
" " 28 "	+	+	+	+	+	+

2. Levertraan-groep A.

(6 mg. levertraan per rat per dag).

Nr. Geslacht	6571 ♀	6572 ♀	6573 ♀	6574 ♂	6575 ♂	6576 ♂
Begingewicht	g. 31	g. 35	g. 34	g. 35	g. 26	g. 33
Gewicht na 16 dagen	72	72	59	80	53	90
Eindgewicht na 28 dagen	110	107	86	120	96	160
Röntgendiagnose na 16 dagen	+	?	?	—	+	+
" " 28 "	+	?	—	—	+	+

3. Levertraan-groep B.

(8 mg. levertraan per rat per dag).

Nr. Geslacht	6577 ♀	6578 ♀	6579 ♀	6580 ♂	6581 ♂	6582 ♂
Begingewicht	g. 33	g. 33	g. 45	g. 31	g. 33	g. 26
Gewicht na 16 dagen	76	70	95	52	55	27
Eindgewicht na 28 dagen	112	112	129	88	108	dood
Röntgendiagnose na 16 dagen	—	—	—	—	—	—
" " 28 "	—	—	—	—	?	dood

4. Calciferol-groep A.

(1/30 γ calciferol per rat per dag).

Nr. Geslacht	6583 ♀	6584 ♀	6585 ♀	6586 ♂	6587 ♂	6588 ♂
Begingewicht	g. 45	g. 32	g. 46	g. 32	g. 25	g. 26
Gewicht na 16 dagen	90	68	87	58	55	dood
Eindgewicht na 28 dagen	124	106	121	101	95	"
Röntgendiagnose na 16 dagen	—	—	—	?	?	"
" " 28 "	—	—	—	?	?	"

5. Calciferol-groep B.

(1/20 γ calciferol per rat per dag).

Nr. Geslacht	6589 ♀	6590 ♀	6591 ♀	6592 ♂	6593 ♂	6594 ♂
Begingewicht	g. 33	g. 26	g. 49	g. 27	g. 28	g. 32
Gewicht na 16 dagen	70	49	98	52	75	53
Eindgewicht na 28 dagen	110	78	130	78	116	99
Röntgendiagnose na 16 dagen	—	—	—	—	—	—
" " 28 "	—	—	—	—	—	—

Uit de verkregen resultaten kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

a. De minimum dosis van de voor deze proeven bestemde levertraan noodig om ratten op het beschreven grondrantsoen tegen rachitis te beschutten bedraagt 8 mg. per rat per dag.

b. De minimum dosis calciferol noodig om ratten op het beschreven rantsoen tegen rachitis te beschutten bedraagt 1/20 γ calciferol per rat per dag.

3. In de voorgaande proef was dus komen vast te staan, dat de minimum hoeveelheid vitamine D noodig om ratten op het grondrantsoen tegen rachitis te beschutten in den vorm van levertraan 8 mg. per rat per dag bedroeg en in den vorm van calciferol 1/20 γ per rat per dag. Deze waarden gelden echter alleen dan, wanneer het betreffende preparaat per pipet in den mond werd toegediend. De mogelijkheid bestond evenwel, dat wanneer de preparaten door het voeder werden verwerkt veel meer noodig zou zijn. Daar in de kuikenproeven de preparaten door het voeder zouden worden vermengd was het van groot belang te weten hoe het met deze kwestie gesteld was. Zoo

hadden King, Hull en Hall (1933) bij kuikens gevonden, dat het bestraalde ergosterol, toegediend in den mond, meer effect had dan wanneer door het voeder verwerkt. Ook in het onderzoek van Voet (1934), dat verscheen nadat onze tweede proevenreeks reeds was beëindigd, werden de preparaten in den mond toegediend. Het leek ons dus van belang dit bij de rat eens nader te bestudeeren. Hierbij werd aangenomen, dat de vitamine D oplossingen wekelijks door het voeder konden worden verwerkt, zoodat de eventueele oxydatie tot een minimum zou worden beperkt. Voorts werd onze doseering gebaseerd op de waarneming, dat het gemiddelde voederverbruik gedurende de eerste 16 dagen bedraagt 8 tot 10 g. per rat per dag en voor de volgende 14 dagen erbij gemiddeld 10 tot 12 g.

De groepenindeeling, die in deze proef werd gebruikt was de volgende:

De eerste, of wel de contrôle-groep, kreeg het grondrantsoen, waarin per kg. voeder 2 g. grondnotenolie met carotine was gemengd. De tweede groep, of wel de levertraan-groep A. ontving het grondrantsoen, waarin per kg. voeder 1 g. levertraan en 1 g. grondnotenolie met carotine; de derde groep, of wel de levertraan-groep B. ontving het grondrantsoen, waarin per kg. voeder 2 g. levertraan; de vierde, of calciferol-groep A. kreeg door het grondrantsoen 2 g. grondnotenolie met carotine, waarin per kg. voeder 6 γ calciferol, terwijl de vijfde, of calciferol-groep B. door het grondrantsoen per kg. voeder 2 g. grondnotenolie met carotine ontving waarin opgelost 12 γ calciferol. De doseeringen waren, zooals bij berekening blijkt, zoo gekozen, dat bij een voedergebruik van 8 g. per rat per dag, die hoeveelheid vitamine D werd opgenomen, die overeenkomt met de gevonden minimum dosis die bij het toedienen per pipet in den mond noodig was.

Ook ditmaal kon de ijkproef slechts met groepen van 6 dieren worden uigevoerd.

In tabel nr. 5 zijn de resultaten van deze proef overzichtelijk samengevat waaruit blijkt, dat over het algemeen gesproken de groei van de ratten zeer bevredigend was. Het voederverbruik bedroeg in de eerste 16 dagen zooals verwacht omstreeks 8 g., slechts in een enkel geval werd een iets lager gemiddelde gevonden. Het was zeer nauwkeurig be-

paald, waarbij met de verliezen door morsen rekening was gehouden. Toen de dieren op den 16den dag waren geröntgend, werd besloten, om de proef gedurende nog 14 dagen voort te zetten om na te gaan of soms in deze periode nog rachitische verschijnselen optraden. Zooals was te verwachten maakte het geen verschil uit, of de vitaminepreparaten per pipet, dan wel door het voeder gemengd werden toegediend. Dit blijkt duidelijk uit de gevonden cijfers.

De eerste of wel de contrôle-groep werd niettegenstaande een grooter gemiddeld voederverbruik ziek en had duidelijke rachitis; de voortzetting van de proef gedurende nog veertien dagen bracht hierin geen verandering. Bij de levertraan-groep A zien wij, dat de röntgenfoto na 16 dagen slechts één twijfelachtig geval van rachitis aanwijst; het betrof hier een dier dat betrekkelijk weinig gegeten had en daardoor misschien niet de vereischte hoeveelheid vitamine D had binnen gekregen. Bij het röntgenen na 30 dagen bleek geen rachitis aanwezig te zijn. Ditzelfde deed zich voor in de calciferol-groep A en wel eveneens met één rat die een zeer laag gemiddeld voederverbruik had. De levertraan-groep B, alsmede de calciferol-groep B gaven geen aanleiding tot bemerkingen. Wat betreft deze laatste groep moet alleen worden medegedeeld, dat het verloop in zooverre ongunstig was, dat nl. één dier stierf, terwijl één der ratten op onverklaarbare wijze wist te ontsnappen.

TABEL 5.

1. Contrôle-groep.

(per kg. voeder 2 g. grondnotenolie met carotine).

Nr. Geslacht	6740	6741	6742	6743	6744	6745
	♀	♀	♀	♂	♂	♂
Begingewicht	g. 42	g. 45	g. 46	g. 48	g. 45	g. 32
Gewicht na 16 dagen	83	82	91	96	78	63
Eindgewicht na 30 dagen	122	113	120	143	106	97
Gemiddeld dagelijksch voederverbruik in g.						
over 16 dagen	10.0	9.0	10.5	10.1	8.7	9.3
" 30 "	11.5	10.5	12.0	12.0	10.0	10.5
Röntgendiagnose na 16 dagen	†	†	†	†	†	†
" " 30 "	†	†	†	†	†	†

2. Levertraan-groep A.

(per kg. voeder 1 g. levertraan en 1 g. grondnotenolie met carotine).

Nr. Geslacht	6746 ♀	6747 ♀	6748 ♀	6749 ♂	6750 ♂	6751 ♂
Begingewicht.	g. 36	g. 37	g. 35	g. 39	g. 31	g. 29
Gewicht na 16 dagen.	68	64	66	74	60	66
Eindgewicht na 30 dagen	104	90	108	108	92	114
Gemiddeld dagelijksch voederverbruik in g.						
over 16 dagen	8.0	9.5	8.0	7.7	10.0	7.8
" 30 "	10.0	11.0	9.5	9.0	12.0	9.0
Röntgendiagnose na 16 dagen	—	—	—	—	—	?
" " 30 "	—	—	—	—	—	—

3. Levertraan-groep B.

(per kg. voeder 2 g. levertraan).

Nr. Geslacht	6752 ♀	6753 ♂	6754 ♀	6755 ♂	6756 ♀	6757 ♂
Begingewicht	g. 40	g. 36	g. 40	g. 28	g. 28	g. 36
Gewicht na 16 dagen	74	76	87	55	51	68
Eindgewicht na 30 dagen	107	102	125	83	88	115
Gemiddeld dagelijksch voederverbruik in g.						
over 16 dagen	8.0	8.5	10.1	7.0	8.2	8.0
" 30 "	10.0	9.0	13.0	8.0	9.5	10.5
Röntgendiagnose na 16 dagen.	—	—	—	—	—	—
" " 30 "	—	—	—	—	—	—

4. Calciferol-groep A.

(per kg. voeder 2 g. grondnotenolie met carotine en 6 γ calciferol).

Nr. Geslacht	6758 ♀	6759 ♀	6760 ♀	6761 ♂	6762 ♂	6763 ♂
Begingewicht	g. 43	g. 31	g. 38	g. 31	g. 35	g. 31
Gewicht na 16 dagen	83	63	87	61	70	53
Eindgewicht na 30 dagen	117	100	118	102	118	83
Gemiddeld dagelijksch voederverbruik in g.						
over 16 dagen	10.5	8.0	8.2	7.7	10.1	6.0
" 30 "	12.0	9.0	10.0	9.5	11.5	8.0
Röntgendiagnose na 16 dagen	—	—	—	—	—	?
" " 30 "	—	—	—	—	—	?

5. Calciferol-groep B.

(per kg. voeder 2 g. grondnotenolie met carotine en 12 γ calciferol).

Nr. Geslacht	6764 ♀	6765 ♀	6766 ♀	6767 ♂	6768 ♂	6769 ♂
Begingewicht	g. 41	g. 29	g. 29	g. 33	g. 30	g. 30
Gewicht na 16 dagen	77	44	49	ont- snapt	46	54
Eindgewicht na 30 dagen	112	dood	88		85	46
Gemiddeld dagelijksch voederverbruik in g.						
over 16 dagen	10.0	10.0	11.2		8.0	7.2
" 30 "	11.5		12.0		9.0	8.0
Röntgendiagnose na 16 dagen	—	—	—		—	—
" " 30 "	—	dood	—		—	—

Uit deze gegevens kan worden geconcludeerd, dat onder de omstandigheden, zooals deze bij de bereiding van het voeder plaats vonden en mits hiervan ongeveer 8 g. per dag per rat werd verbruikt, de minimum doseering ongeveer bedroeg 8 mg. levertraan of wel 1/20 γ calciferol per rat per dag, hetgeen geheel in overeenstemming is met de waarden, die bij de hiervoor beschreven ijkproef waren gevonden.

4. Nadat nu uit de ijkproeven met ratten was komen vast te staan, dat wat betreft de antirachitische werking, 8 mg. levertraan equivalent zijn met 1/20 γ calciferol, kon met de kuikenproef een aanvang worden gemaakt. Hiertoe werden 102 eendagskuikens gebruikt, die terstond na ontvangst in zes groepen werden verdeeld en het beschreven grondrantsoen met de nog te noemen vitamine D toelage ontvingen. Het doel van deze eerste kuikenproef was na te gaan, of de in het eerste hoofdstuk besproken onderzoeken inzake de antirachitische werking van bestraald ergosterol kon worden bevestigd. De aldaar genoemde onderzoekers hadden immers gevonden, dat bij kuikens ter voorkoming van rachitis veel meer ratteneenheden vitamine D in den vorm van bestraald ergosterol noodig waren, dan in den vorm van levertraan. Zooals wij evenwel hebben uiteengezet, konden wij ons met de door die onderzoekers gebruikte proefmethode niet geheel en al vereenigen, daar hieraan o.i. verschillende fouten kleefden, die mogelijk van invloed op de uitkomsten konden zijn. Vandaar, dat in onze kuikenproef met al deze feiten rekening werd gehouden. Zoo ont-

vingen in onze kuikenproef de diertjes hetzelfde grondrantsoen als de ratten in de ijkproeven hadden gekregen. Daarnaast werd gezorgd, dat die groepen welke de calciferol opgelost in grondnotenolie ontvingen hierin tevens ter aanvulling van het vitamine A, carotine kregen toegediend. Ook het vetgehalte was in alle groepen gelijk. Zooals terloops reeds is medegedeeld, werden de vitamine D oplossingen door het voeder gemengd; de bereiding van deze mengsels geschiedde wekelijks, zoodat — indien oxydatie van het vitamine D zou plaats vinden — dit tot een minimum beperkt bleef. Iedere groep bestond uit 17 kuikens, die allen het beschreven grondrantsoen ontvingen. De verdere indeeling was de volgende: De eerste, of wel de contrôle-groep, ontving door het rantsoen vermengd 2 % grondnotenolie, waarin carotine was opgelost en waarvan het aantal vitamine A eenheden overeenkwam met dat van goede traan. De tweede, of wel de levertraan-groep A, kreeg in het grondrantsoen 1 % levertraan en 1 % grondnotenolie met carotine. De derde, of wel de levertraan-groep B, ontving in het grondrantsoen 2 % levertraan. De volgende drie groepen waren calciferol-groepen. Groep vier, of wel calciferol-groep A, kreeg door het grondrantsoen 2 % grondnotenolie met carotine, waarin opgelost een hoeveelheid calciferol, waarvan de antirachitische werking, bij ratten bepaald, overeenkwam met 2 % levertraan; dit kwam neer op een hoeveelheid van 100 γ calciferol per kg. voeder. De vijfde groep, of wel de calciferol-groep B, ontving het grondrantsoen met 2 % grondnotenolie met carotine, waarin een hoeveelheid calciferol was opgelost overeenkomende met 1 mg. per kg. voeder, hetgeen in vitamine D eenheden volgens de ratten ijkproef overeenkwam met 20 % levertraan. De zesde groep, of wel de calciferol-groep C, ontving in het grondrantsoen 2 % grondnotenolie met carotine, waarin bovendien opgelost calciferol in een hoeveelheid van 10 mg. per kg. voeder, hetgeen dus in ratten-eenheden vitamine D volgens de ijkproeven overeenkwam met 200 % levertraan. Het lag in de bedoeling de verschillende groepen gedurende 10 weken op het betreffende dieet aan te houden; daarna zou aan de hand van verschillende methoden worden nagegaan of de kuikens al dan niet aan rachitis leden. Zoo zou het resultaat van de beoordeling van eventueele veranderingen aan ribben en wervelkolom worden vergeleken met de resultaten op de röntgenfoto, terwijl eveneens een bepaling

van het aschgehalte in de tibiae zou plaats vinden. Door toevallige omstandigheden was het evenwel in deze proef onmogelijk de hiervoor genoemde gegevens met elkander te vergelijken; er kon nog slechts alleen een beoordeeling worden uitgesproken op grond van de macroscopisch waarneembare veranderingen aan ribben en wervelkolom. Dit was nl. het gevolg van het ongunstig verloop van de proef. Al verliep deze in de eerste weken nog niet verontrustend, toch was toen reeds het sterftecijfer vrij hoog. Zoo stierven in de eerste week in groep één niet minder dan 6 kuikens; in de vierde groep bedroeg dit aantal 2, in de vijfde groep 1 kuiken. De dood trad in zonder voorafgaande verschijnselen; sectie bracht enkele aanwijzingen aan het licht die deden vermoeden, dat wij hier met witte kuikendiarrhoe (*salmonella pullora*) te doen hadden. Met zekerheid werd dit evenwel niet vastgesteld. In de daaropvolgende week stierven in de eerste, vierde, vijfde en zesde groep nog een slachtoffer, zoodat aan het begin van de derde week in totaal nog 89 kuikens in leven waren. Eerst nu begon evenwel de groote tegenslag, waarbij als eerste slachtoffers een tweetal kuikens uit de vierde groep vielen. De dieren vertoonden zeer sterke paralyse verschijnselen, die somtijds aan polyneuritis deden denken. Reeds den volgenden morgen waren de dieren dood. Tot onze groote onsteltenis leerde de sectie, dat het hier naar alle waarschijnlijkheid *coccidiosis* betrof; het microscopisch onderzoek bevestigde inderdaad dit vermoeden. De oöcysten van de *Eimaria avium* konden in de uitwerpselen, alsook in den darminhoud worden aangetoond. Niettegenstaande alle mogelijke maatregelen, zooals ontsmetting van het drinkwater met methyleenblauw, het geregeld grondig reinigen van de voederbakken, mocht het niet gelukken uitbreiding te voorkomen, ofschoon de kuikens op gaasbodems liepen en besmettingsgevaar derhalve zeer gering was. Steeds meer slachtoffers vielen in alle groepen, waarbij altijd weer opnieuw *coccidiosis* als diagnose kon worden gesteld. Opvallend was, dat naast de macroscopisch waarneembare verschijnselen als sterk verdikte blinde darmen met bloederigen of slijmerigen inhoud, bij de dieren die in de vijfde en volgende weken stierven ook oedeemen en ascites werden waargenomen, gepaard met een sterk vergroot hart en opgezwollen en vergroote nieren. Ook in deze gevallen kon steeds *coccidiosis* worden gediagnoseerd. Het

gevolg van dezen tegenslag was, dat aan het einde van de proef die 10 weken duurde nog slechts in totaal 27 dieren over waren, waarvan in de eerste groep géén; in de tweede groep 5; in de derde groep 8; in de vierde groep 1; in de vijfde groep 9 en in de zesde groep 4 kuikens.

Het behoeft geen betoog, dat van het oorspronkelijke voornemen om bij de kuikens aan het einde van de proef drie verschillende criteria voor rachitis met elkaar te vergelijken niets kon komen. Het aschgehalte is zooals bekend sterk afhankelijk van den leeftijd, zoodat hier alle gestorven kuikens uitgeschakeld; bovendien was het aantal overlevende dieren in de verschillende groepen te klein om met eenige waarschijnlijkheid hieruit een conclusie te kunnen trekken. Ook een vergelijking van de röntgenfoto's van de spronggewrichten bij kuikens op geheel verschillende leeftijden gestorven kwam ons ongewenscht voor. De eenige mogelijkheid die ons dus restte was na te gaan of met behulp van de post-mortem beoordeeling van ribben en wervelkolom, kenmerken zouden kunnen worden gevonden voor de diagnose van rachitis. Dit bleek bij de eerste secties reeds het geval te zijn. Na het vrij prepareren van de borstkas, waarbij het borstbeen in tact werd gelaten en het verwijderen van de organen uit de borstholte, werd een goed overzicht van de ribben en wervelkolom verkregen. Daarnaast bleken de resultaten eveneens bevredigend; bij kuikens die in de derde levensweek stierven konden toen reeds duidelijke veranderingen aan de ribben, de overgang van ribben naar de wervelkolom worden waargenomen. Ditzelfde gold voor kuikens die op lateren leeftijd stierven, alsook voor die kuikens die aan het einde van de proef werden gedood. De waargenomen veranderingen waren sterke verbuigingen van de ribben, rozenkrans, verdikkingen van den rib-overgang naar de wervelkolom, terwijl de ribben nu en dan zelfs golvend waren. Dat deze verschijnselen inderdaad veranderingen aan het skelet zijn, die op rachitis wijzen, werd reeds door Johnson (1925) vastgesteld. Ook Sheehy en Sheil (1932) wezen nog voor kort op skeletveranderingen, die bij kuikens op een dieet met een te kort aan vitamine D kunnen optreden. Door deze waarneming bleek het dus mogelijk om ook de dieren die vóór het einde van de proef stierven in onze conclusie te verwerken. Immers de leeftijd kan hier buiten beschouwing blijven, daar

de afwijking al dan niet aanwezig is en bij oudere dieren met zwaardere ribben en grootere afmetingen alleen duidelijker te voorschijn komt. Dit laatste doet aan de beoordeeling rachitis evenwel niets af. Het feit ook, dat het verschijnsel reeds bij kuikens, die in de derde levensweek stierven — dus dieren van omstreeks 17 dagen — waarneembaar was, wijst er ook op dat het een vrij gevoelig en vroeg optredend verschijnsel is, hetgeen de bruikbaarheid juist in dit geval verhoogde. Om de post-mortem beoordeeling van het skelet zoo objectief mogelijk te verrichten, werd zorg gedragen, dat het nummer, alsook de groep waartoe het skelet behoorde, eerst bekend was nadat de definitieve beoordeeling had plaats gevonden. Een bezwaar dat men tegen deze proef zou kunnen aanvoeren, is wel dit, dat men zou kunnen veronderstellen, dat deze rachitische verschijnselen het gevolg zouden zijn van coccidiosis. Het is nl. bekend, dat zware vormen van diarrhoe bij kinderen tot rachitis kunnen leiden, door het groote verlies aan calcium. In deze proef komt ons een dergelijke verklaring evenwel zeer onwaarschijnlijk voor. In de eerste plaats kon bij de kuikens, die in de derde levensweek, zonder voorafgaande verschijnselen stierven, van een groot verlies aan calcium nog geen sprake zijn, daar het hier zeker een per-acute vorm van coccidiosis betrof. Niettemin waren hier duidelijke veranderingen aan ribben en wervelkolom aanwezig, die de conclusie rachitis rechtvaardigden. Daarnaast komt dat b.v. in de levertraan-groep, bij kuikens, die in de negende levensweek aan een meer chronischen vorm van coccidiosis stierven en waarbij zeker calciumverlies had plaats gevonden, geen enkele afwijking viel te bespeuren, die de conclusie „rachitis” zou kunnen wettigen. Wij zijn derhalve van meening, dat — niettegenstaande het ongunstige proefverloop — de resultaten die bij onze post-mortem beoordeeling van het skelet werden verkregen bruikbaar zijn om een inzicht te krijgen in de werking van levertraan in vergelijking met calciferoloplossingen bij kuikens. Zooals te begrijpen, was de groei der kuikens minder gunstig; daar het meerendeel der dieren vóór het einde van de proef stierf heeft het o.i. geen zin om groepsgegevens te vermelden. Volstaan wordt derhalve met de mededeeling, dat de zwaarste dieren, die de proef overleefden, ongeveer 500 g. wogen.

Tenslotte moet in dit verband de aandacht worden gevestigd op het feit, dat de indruk bestond, dat het weerstandsvermogen van de kuikens in de contrôle-groep en in de groepen met een te geringe doseering vitamine D minder was, dan in de groepen, die een behoorlijke vitamine D toelage ontvingen. Dit kwam o.a. tot uiting in het feit, dat in de groepen 1, 4 en 5 de coccidiosis meer acuut verliep, terwijl in de groepen 2, 3 en 6 een meer chronisch ziektebeeld werd waargenomen. Het aantal waarnemingen is echter onvoldoende voor een definitieve conclusie.

Zoals hiervoor reeds is medegedeeld, werd als criterium voor rachitis bij kuikens gebruik gemaakt van veranderingen aan ribben en wervelkolom die reeds vroegtijdig zijn waar te nemen. Weliswaar werd ook van de kuikens, die op den 21sten proefdag nog in leven waren een röntgenfoto van het spronggewricht genomen, de resultaten hiervan bleken echter met uitzondering van enkele groepen b.v. 1, 3 en 6, onbruikbaar, daar men bij te veel foto's voor twijfelachtige gevallen kwam te staan. Daar het aantal dieren aan het einde der proef te klein was en daar bovendien enkele groepen totaal waren uitgestorven werd geen nieuwe poging meer gedaan om het beeld op dien tijd te beoordeelen.

De veranderingen aan de ribben en wervelkolom waren bij de post-mortem beoordeeling van het skelet reeds in de derde levensweek duidelijk waarneembaar, zooals in tabel 6 tot uiting komt.

TABEL 6.

1. Contrôle-groep.

Grondrantsoen, waarin 2% grondnotenolie met carotine.

Kuiken-nummer.	Leeftijd.	Omschrijving post mortem onderzoek van ribben en wervelkolom van de kuikens.
14	18 dagen	niet nagezien.
13	20 "	ribben verbogen; rozenkrans aan beide zijden.
4	26 "	" " ;
5	26 "	" sterk verbogen; rozenkrans aan beide zijden.
6	26 "	" " ; zwakke rozenkrans.
7	28 "	rozenkrans aan beide zijden.
15	30 "	
1	31 "	sterke rozenkrans aan beide zijden.
11	32 "	ribben sterk verbogen; geen duidelijke rozenkrans.
12	35 "	sterke rozenkrans aan beide zijden.
3	41 "	ribben sterk verbogen; rozenkrans aan beide zijden.

2. Levertraan-groep A.

Grondrantsoen, waarin 1% levertraan en 1% grondnotenolie met carotine.

Kuiken-nummer.	Leeftijd.	Omschrijving post mortem onderzoek van ribben en wervelkolom van de kuikens.
33	17 dagen	ribben normaal.
26	19 "	" "
30	19 "	twijfelachtige rozenkrans.
19	28 "	ribben normaal.
25	30 "	" links normaal; rechts verbogen.
28	32 "	" normaal.
22	37 "	" "
31	39 "	" "
23	48 "	" zwakke rozenkrans.
32	49 "	ribben rechts sterk verbogen; links normaal.
29	50 "	" normaal.
18	57 "	" "
20*	66 "	" "
21*	66 "	" "
24*	66 "	" ; wervelkolom iets scheef.
27*	66 "	" ; overgang wervelkolom verdikt.
34*	66 "	" ; wervelkolom iets scheef.
		" ; " " " "

3. Levertraan-groep B.

Grondrantsoen, waarin 2% levertraan.

Kuiken-nummer.	Leeftijd.	Omschrijving post mortem onderzoek van ribben en wervelkolom van de kuikens.
46	15 dagen	niet nagezien.
49	18 "	ribben normaal.
38	25 "	" "
51	25 "	" "
44	30 "	" "
50	34 "	" "
47	43 "	" "
39	46 "	" "
43	51 "	" rechts iets verbogen; links normaal.
35*	66 "	" normaal.
36*	66 "	" "
37*	66 "	" "
40*	66 "	" "
41*	66 "	" "
42*	66 "	" "
45*	66 "	" "
48*	66 "	" "

4. Calciferol-groep A.

Grondrantsoen, waarin 2% grondnotenolie met carotine en calciferol.
Aantal ratteneenheden vitamine D equivalent met 2% levertraan.

Kuiken-nummer.	Leeftijd.	Omschrijving post mortem onderzoek van ribben en wervelkolom van de kuikens.
68	16 dagen	ribben verbogen.
53	17 "	"
54	17 "	niet nagezien.
62	19 "	rozenkrans aan beide zijden.
63	19 "	"
59	20 "	ribben sterk "verbogen. "
56	24 "	sterke rozenkrans aan beide zijden.
65	27 "	rozenkrans aan beide zijden.
60	29 "	" " " "
61	29 "	" " " "
55	32 "	sterke "rozenkrans" aan beide zijden.
67	35 "	ribben sterk verbogen; geen duidelijke rozenkrans.
64	35 "	sterke rozenkrans aan beide zijden.
58	39 "	rozenkrans aan beide zijden.
52*	66 "	" beide zijden; overgang wervelkolom verdikt; sterke bekkenverandering.

5. Calciferol-groep B.

Grondrantsoen, waarin 2% grondnotenolie met carotine en calciferol.
Aantal ratteneenheden vitamine D equivalent met 20% levertraan.

Kuiken-nummer.	Leeftijd.	Omschrijving post mortem onderzoek van ribben en wervelkolom van de kuikens.
71	22 dagen	ribben sterk verbogen; geen rozenkrans.
73	27 "	sterke rozenkrans aan beide zijden.
81	37 "	ribben sterk verbogen; overgang wervelkolom verdikt.
74	52 "	" " " " ; borstkas geheel misvormd.
72	56 "	" normaal.
69	64 "	" verbogen; overgang wervelkolom verdikt; sterke rozenkrans aan beide zijden.
81*	66 "	sterke werving van de ribben; rozenkrans aan beide zijden; kyphose.
75*	66 "	ribben normaal.
76*	66 "	"
77*	66 "	" verbogen; kyphose.
80*	66 "	" normaal.
82*	66 "	" verbogen; overgang wervelkolom verdikt; rozenkrans.
83*	66 "	" normaal.
84*	66 "	" verbogen; overgang wervelkolom verdikt; rozenkrans.
85*	66 "	" verbogen; kyphose.

6. Calciferol-groep C.

Grondrantsoen, waarin 2% grondnotenolie met carotine en calciferol.
Aantal ratteneenheden vitamine D equivalent met 200% levertraan.

Kuiken-nummer.	Leeftijd.	Omschrijving post mortem onderzoek van ribben en wervelkolom van de kuikens.
94	16 dagen	niet nagezien.
92	21 "	ribben normaal.
95	21 "	" "
96	22 "	" "
101	23 "	" "
86	25 "	" "
88	27 "	" "
90	27 "	" "
102	31 "	" "
93	32 "	" "
97	41 "	" "
98	41 "	" "
87	41 "	" "
91*	66 "	" "
99*	66 "	" "
89*	66 "	" "
100*	66 "	" " ; borstkas eenzijdig iets misvormd.

* De aldus gemerkte dieren werden aan het einde van de proef gedood; de andere dieren zijn tijdens de proef gestorven.

Uit de in tabel 6 samengevatte gegevens blijkt, dat alle dieren uit de contrôle-groep, die na 18 of meer dagen stierven werden onderzocht. Het resultaat van deze beoordeling toont ontegenzeggelijk aan, dat geen der dieren normaal was; allen zonder uitzondering vertoonden hetzij alleen verbogen ribben, hetzij een rozenkrans, hetzij een combinatie van deze twee beelden. Daar dit alles ongetwijfeld op rachitis wijst, staat hiermede vast, dat het beschreven rachitogene dieet reeds in korten tijd bij kuikens rachitis veroorzaakt.

Werden in de vorige groep slechts 10 dieren onderzocht, in de tweede, of wel de levertraan-groep A, kon bij alle 17 dieren worden nagegaan of hier veranderingen aan ribben of wervelkolom waren opgetreden. Het resultaat toonde aan, dat een negental der kuikens geheel normaal was; de overige dieren vertoonden weliswaar rachitische veranderingen aan ribben en wervelkolom, maar toch in veel mindere mate en veel geringeren graad, dan zulks in de contrôle-groep het geval was. Dat neemt niet weg, dat aan kuikens op het door ons gebruikte grondrantsoen bij het toevoegen van 1% goede levertraan een onvol-

doende vitamine D toelage werd gegeven om de dieren tegen rachitis te beschutten.

Beter waren de verkregen resultaten in de derde, of wel levertraan-groep B; evenals in de vorige groep werden hier alle dieren onderzocht. Met uitzondering van het kuiken nr. 46, dat eenzijdig iets verbogen ribben had, waren allen normaal. Of-schoon dit eene geval als rachitis dient te worden bestempeld, volgt toch uit deze proefgroep, dat 2 % levertraan voldoende is om kuikens op ons proefrantsoen tegen rachitis te beschutten.

Geheel anders is het gesteld met de vierde, of wel de calciferol-groep A, waarvan het aantal ratteneenheden vitamine D in het grondrantsoen equivalent was met dat van 2 % levertraan. A priori zou men derhalve ook hier mogen verwachten, dat alle kuikens of ten minste het grootste deel tegen rachitis bleek te zijn beschut. Het tegendeel was evenwel het geval; de 14 onderzochte kuikens vertoonden alle duidelijke verschijnselen van rachitis. In het meerendeel der gevallen was zelfs zulk een zware vorm aanwezig, als slechts werd waargenomen in de contrôle-groep. Uit dit resultaat volgt o.i. wel voldoende duidelijk, dat de werking van een aantal ratteneenheden vitamine D in den vorm van calciferol niet gelijk te stellen is aan de werking van een equivalente hoeveelheid vitamine D uit levertraan. Dit kwam ook in de vijfde, of wel de calciferol-groep B, tot uiting. Hier bleek, dat zelfs een aantal ratteneenheden vitamine D in den vorm van calciferol overeenkomende met 20 % levertraan onvoldoende was om kuikens tegen rachitis te beschutten. Van de 15 dieren, die in deze groep werden onderzocht bleken er slechts vijf als normaal te kunnen worden betiteld. De overige tien vertoonden alle zeer sterke rachitische afwijkingen, zooals in tabel 6 duidelijk is omschreven.

De 100-voudige doseering overeenkomende met 200 % levertraan, zooals in de calciferol-groep C werd gegeven, had beter resultaat. Van de 16 dieren uit deze groep vertoonde slechts één der kuikens afwijkingen aan ribben die als rachitis moesten worden betiteld. Hiermede staat vast, dat deze doseering calciferol voldoende was. Samenvattend de resultaten van deze eerste proevenreeks kan worden besloten, dat calciferol-oplossingen bij kuikens niet dezelfde werking vertoonen als een in ratteneenheden vitamine D equivalente hoeveelheid levertraan. De uitkomsten der in het vorige hoofdstuk besproken

onderzoekingen konden dus worden bevestigd.

De conclusie uit deze proevenreeks moet derhalve luiden:

Om kuikens op het door ons beschreven proefrantsoen tegen rachitis te beschutten, zijn in den vorm van bestraald ergosterol veel meer ratteneenheden vitamine D noodig, dan in den vorm van levertraan.

Tweede Proevenreeks. Zooals in de eerste proevenreeks werd aangetoond, zijn in den vorm van bestraald ergosterol veel meer ratteneenheden vitamine D noodig ter voorkoming van rachitis bij kuikens, dan in den vorm van levertraan.

In deze tweede proevenreeks werd nu nagegaan, of in levertraan misschien nog een andere factor voorkomt, die bij kuikens hetzij zelfstandig antirachitisch werkt, of noodzakelijk is voor de werking van het vitamine D bij kuikens. Dit was ook daarom van belang, omdat Pappenheimer en Dunn (1925) in hun publicatie tot de conclusie kwamen, dat het onverzeepbare deel uit levertraan bij kuikens — in tegenstelling met de ervaringen bij ratten — niet in staat zou zijn rachitis te voorkomen of te genezen; de levertraan zelf zou hiertoe echter wel in staat zijn. Zooals reeds in het literatuuroverzicht werd opgemerkt, hebben verschillende onderzoekers getracht na te gaan of in levertraan soms een factor voorkomt, die de werking van bestraald ergosterol verbetert. Hiertoe stelden zij zich evenwel tevreden met het oplossen van bestraald ergosterol in levertraan, in plaats van in een indifferente olie. Toen dit echter geen gunstigen invloed bleek te hebben, beschouwden zij deze kwestie voor afgedaan. In deze proevenreeks werd evenwel anders te werk gegaan en is getracht vast te stellen, hoe de twee fracties uit levertraan, te weten het verzeepbare en het onverzeepbare deel, zoowel zelfstandig, als in onderlinge combinatie alsook in combinatie met bestraald ergosterol, zich gedragen.

De bereiding van deze twee fracties uit levertraan geschiedde door ons uit de in voorraad gehouden levertraan volgens de door Burr en Burr (1929) beschreven methode, met dien verstande, dat in plaats van het uitschudden met æther in een scheidtrechter, met het oog op de groote hoeveelheden vloeistof, de met water verdunde, verzeepde levertraanmassa met

æther werd geperforeerd. Deze perforatie werd naar gelang de hoeveelheid levertraan, waarvan bij de verzeeping was uitgegaan, gedurende 48 tot 60 uren voortgezet. Zooals uit de onderstaande ijkproef zal blijken werd zoo een behoorlijk resultaat verkregen. Evenals in de vorige proevenreeks ging ook hier wederom een ratten ijkproef aan de eigenlijke kuikenproef vooraf. Het doel van deze ijkproef was de antirachitische werkzaamheid vast te stellen van het volgens bovengenoemde methode verkregen verzeepbare en onverzeepbare deel van levertraan, om later in de slotproef met kuikens te kunnen zorgdragen, dat het aantal ratteneenheden aan antirachitisch werkzame stoffen in alle groepen even groot was.

1. In deze ijkproef werden in alle groepen 10 ratten gebruikt en wel 5 mannetjes en 5 wijfjes. De dieren ontvingen allen het reeds vroeger beschreven rachitogene dieet, terwijl de te onderzoeken preparaten driemaal per week per pipet werden toegediend. Evenals vroeger werden de ratten ter contrôleering van den groei drie maal per week gewogen. De toe te dienen preparaten werden voor zoover mogelijk opgelost in grondnotenolie — eventueel aangevuld met carotine — aan de ratten gegeven.

De groepenindeeling in deze ijkproef was de volgende:

De eerste groep, of wel de contrôle-groep, ontving het rachitogene dieet, waarnaast drie maal per week de hoeveelheid grondnotenolie met carotine, nl. twee maal per week 0.1 cc en de derde maal (Vrijdag) 0.15 cc.

De tweede groep, ontving eveneens het rachitogene dieet, met daarnaast dezelfde hoeveelheid grondnotenolie met carotine als de contrôle-groep, met dien verstande, dat hierin thans een hoeveelheid onverzeepbaar deel van levertraan = 0.2 mg. was opgelost, overeenkomende met ± 10 mg. levertraan per rat per dag. De derde groep alsook de vierde groep, ontvingen wederom het rachitogene dieet met dezelfde hoeveelheid grondnotenolie met carotine als de contrôle-groep. Voor de derde groep was hierin evenwel een hoeveelheid onverzeepbaar deel van levertraan opgelost overeenkomende met 15 mg. levertraan per rat per dag, terwijl deze hoeveelheid voor de vierde groep overeenkwam met 20 mg. levertraan per rat per dag. De vijfde groep was de groep, die het verzeepbare deel van levertraan ontving. Om na te gaan of dit deel soms nog eenige antirachitische werkzaamheid bezat kregen de ratten uit groep 5 naast het rachi-

togene dieet zes maal per week 0.12 cc verzeepbaar deel van levertraan. Deze hoeveelheid verzeepbaar deel van levertraan komt overeen met die hoeveelheid welke voorkomt in 105 mg. levertraan. De laatste, of wel de calciferol-groep, ontving naast het rachitogene dieet dezelfde hoeveelheid grondnotenolie als de contrôle-groep, maar thans met een hoeveelheid calciferol, welke overeenkomt met $\frac{1}{20}$ γ calciferol per dier per dag. Nadat de proefdieren op het rachitogene dieet waren gezet, werd den derden dag met het toedienen van de preparaten begonnen. Dit werd tot den 16den dag voortgezet, waarna de dieren werden geröntgend. Hierbij bleek, dat de ratten uit de contrôle-groep allen rachitis hadden; in de groepen, die het verzeepbare deel van levertraan hadden ontvangen, bleken alle dieren op één enkele uitzondering na beschut te zijn. De ratten daarentegen uit groep 5, die een groote hoeveelheid verzeepbaar deel uit levertraan hadden ontvangen, om na te gaan, of soms een deel van het antirachitische vitamine hierin was achtergebleven, bleken slechts voor de helft beschut, terwijl de andere helft rachitische verschijnselen vertoonde. De zesde of calciferol-groep leerde, dat de minimum dosis voor ratten op het grondrantsoen bij $\frac{1}{20}$ γ gelegen was, zooals ook reeds eerder was gevonden. Wat den groei betreft, deze was over het algemeen zeer bevredigend; alleen kwam dit maal in enkele groepen sterfte voor. Zoo bedroeg dit zelfs in groep 4 een drietal dieren; daar bij de sectie geen afwijkingen werden gevonden dient hieraan geen al te groote waarde te worden toegekend.

De resultaten van deze ijkproef zijn in tabel 7 samengevat.

TABEL 7.

1. Contrôle-groep.

Nr. Geslacht	7500 ♀	7501 ♀	7502 ♀	7503 ♀	7504 ♀	7505 ♂	7506 ♂	7507 ♂	7508 ♂	7509 ♂
Begingewicht	g. 35	g. 37	g. 35	g. 45	g. 41	g. 44	g. 45	g. 45	g. 34	g. 34
Eindgewicht na 16 dagen . . .	77	90	83	84	84	109	97	94	75	78
Röntgendiagnose na 16 dagen .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

2. Groep onverzeepbaar deel levertraan A.

(per rat per dag 0.2 mg. onverzeepbaar deel van levertraan in grondnotenolie).

Nr. Geslacht	7520 ♀	7521 ♀	7522 ♀	7523 ♀	7524 ♀	7525 ♂	7526 ♂	7527 ♂	7528 ♂	7529 ♂
Begingewicht	g. 47	g. 46	g. 40	g. 47	g. 36	g. 46	g. 47	g. 46	g. 47	g. 45
Eindgewicht na 16 dagen . . .	81	89	69	74	64	90	91	82	98	91
Röntgendiagnose na 16 dagen .	—	—	—	?	—	—	—	—	—	—

3. Groep onverzeepbaar deel levertraan B.

(per rat per dag 0.3 mg. onverzeepbaar deel van levertraan in grondnotenolie).

Nr. Geslacht	7196 ♀	7197 ♀	7198 ♀	7199 ♀	7200 ♀	7201 ♂	7202 ♂	7203 ♂	7204 ♂	7205 ♂
Begingewicht	g. 32	g. 31	g. 35	g. 32	g. 35	g. 35	g. 34	g. 35	g. 37	g. 36
Eindgewicht na 16 dagen . . .	52	65	68	59	65	dood	55	64	70	65
Röntgendiagnose na 16 dagen .	—	—	—	—	—	"	—	—	—	—

4. Groep onverzeepbaar deel levertraan C.

(per rat per dag 0.4 mg. onverzeepbaar deel van levertraan in grondnotenolie).

Nr. Geslacht	7206 ♀	7207 ♀	7208 ♀	7209 ♀	7210 ♀	7211 ♂	7212 ♂	7213 ♂	7214 ♂	7215 ♂
Begingewicht	g. 34	g. 33	g. 32	g. 34	g. 33	g. 35	g. 38	g. 31	g. 40	g. 31
Eindgewicht na 16 dagen . . .	58	54	61	59	dood	61	60	dood	88	dood
Röntgendiagnose na 16 dagen .	—	—	—	—	"	—	—	"	—	"

5. Groep verzeepbaar deel levertraan.

(per rat per dag 100 mg. verzeepbaar deel van levertraan).

Nr. Geslacht	7510 ♀	7511 ♀	7512 ♀	7513 ♀	7514 ♀	7515 ♂	7516 ♂	7517 ♂	7518 ♂	7519 ♂
Begingewicht	g. 47	g. 46	g. 45	g. 46	g. 39	g. 45	g. 39	g. 48	g. 46	g. 40
Eindgewicht na 16 dagen . . .	88	93	87	87	63	86	72	100	95	dood
Röntgendiagnose na 16 dagen .	—	—	+	—	—	+	+	+	+	"

6. Calciferol-groep.

(per rat per dag $\frac{1}{20}$ γ calciferol in grondnotenolie met carotine).

Nr.	7530	7531	7532	7533	7534	7535	7536	7537	7538	7539
Geslacht	♀	♀	♀	♀	♀	♂	♂	♂	♂	♂
Begingewicht	g. 37	g. 40	g. 37	g. 36	g. 36	g. 39	g. 47	g. 43	g. 37	g. 45
Eindgewicht na 16 dagen . .	63	80	72	dood	66	89	98	dood	58	115
Röntgendiagnose na 16 dagen .	—	—	?	"	—	—	—	"	—	—

Een beschouwing van deze proefresultaten leidt tot de volgende conclusie:

a. Het uit levertraan vervaardigde onverzeepbare deel is in staat bij een doseering van 0.2 mg., overeenkomende met 10 mg. levertraan per rat per dag, ratten op het beschreven rachitogene dieet gehouden, tegen rachitis te beschutten.

b. Het verzeepbare deel van 105 mg. levertraan per rat per dag, was niet in staat, om ratten op het beschreven rachitogene dieet gehouden, volledig tegen rachitis te beschutten, terwijl 8 mg. levertraan hiervoor voldoende was gebleken.

Wanneer in aanmerking wordt genomen, dat bij het bereiden van het onverzeepbare deel, nog een klein gedeelte van de anti-rachitische factor in het verzeepbare deel van levertraan is achtergebleven, dan is dit hoogstens 7.5 % van de antirachitische werkzaamheid van de levertraan, waarvan werd uitgegaan.

c. Evenals in vorige ijkproeven bleek hier opnieuw, dat de minimale dosis calciferol, noodig om ratten op het beschreven rachitogene dieet tegen rachitis te beschutten, bij $\frac{1}{20}$ γ gelegen is.

2. Nu de antirachitische werkzaamheid van de in de kuikenproef te gebruiken preparaten was bepaald, kon met deze proef een aanvang worden gemaakt. Hiertoe werd wederom gebruik gemaakt van een honderdtal witte Leghorn-eendagskuikens, die terstond na ontvangst in zes groepen werden verdeeld. Zij ontvingen allen het reeds herhaalde malen genoemde grondrantsoen, waardoor de nog te noemen preparaten waren gemengd. Zoals reeds terloops werd medegedeeld was het doel van deze proef na te gaan, hoe de twee fracties uit levertraan, met name het verzeepbare en het onverzeepbare deel afzonderlijk, in onderlinge combinatie en in combinatie met calciferol werkten ter voorkoming van rachitis bij kuikens.

Speciaal werd in deze proef wederom zorg gedragen, dat alle groepen als vitamine A bron carotine in het voeder kregen toegediend, die daartoe hetzij in de grondnotenolie, hetzij in het verzeepbare deel van levertraan werd opgelost. De in-deeling van de kuikenproef was als volgt: De eerste, of wel de contrôle-groep, bestond uit 16 kuikens, die het grondrantsoen ontvingen, waardoor 2% grondnotenolie met carotine was vermengd. De tweede groep was de levertraan-groep; deze telde eveneens 16 kuikens, die door het grondrantsoen 2% levertraan gemengd ontvingen. Alle verdere groepen telden 17 dieren. De derde groep, of wel de calciferol-groep, was slechts bedoeld om eens na te gaan waar ongeveer de doseering aan calciferol die even goed werkt als 2% levertraan gelegen is. Uit de eerste proevenreeks was komen vast te staan, dat deze waarde tusschen de 10- en 100-voudige doseering calciferol gelegen was. Ter benadering van deze waarde werd nu aan deze groep het grondrantsoen toegediend waardoor was vermengd 2% grondnotenolie met carotine en een hoeveelheid calciferol, overeenkomende met 80% levertraan, m.a.w. de 40-voudige doseering. De vierde groep ontving eveneens 2% grondnotenolie door het grondrantsoen gemengd, maar waarin thans een hoeveelheid onverzeepbaar deel van levertraan was opgelost, overeenkomende in ratteneenheden vitamine D met 2% levertraan. De bedoeling van deze groep was na te gaan of bij deze preventieve wijze van werken de ervaringen uit de oriënterende proef met kuikens konden worden bevestigd, waarbij was gevonden, dat het onverzeepbare deel van levertraan wel degelijk in staat is kuikenrachitis te voorkomen, zulks in tegenspraak met de mededeeling van Pappenheimer en Dunn (1925). De vijfde groep deed dienst om eens te zien, of het verzeepbare deel van levertraan soms een factor bevat, die de werking van het calciferol verbetert. Daartoe werd in deze groep door het grondrantsoen 2% verzeepbaar deel van levertraan gemengd waarin een hoeveelheid calciferol was opgelost, waarvan het aantal ratteneenheden antirachitische vitamine overeenkwam met 2% levertraan. In de laatste, of zesde groep, werd door het grondrantsoen eveneens 2% verzeepbaar deel van levertraan vermengd, maar waarin thans een hoeveelheid onverzeepbaar deel was opgelost met een antirachitische werking bij ratten equivalent met 2% levertraan. Op deze

wijze werd getracht na te gaan of door het verzeepen van de levertraan en het daarop bereiden van het verzeepbare en het onverzeepbare deel soms ook een of andere verandering optreedt, die de werking van het vitamine D beïnvloedt.

De duur van deze proef met kuikens was bepaald op 8 weken. Aan het einde van deze periode zou worden nagegaan, of de kuikens al dan geen verschijnselen van rachitis vertoonden. Voor de beoordeling hiervan werd besloten, gezien de resultaten uit de eerste proevenreeks, gebruik te maken van de veranderingen, die aan het skelet optreden, terwijl daarnaast de röntgenfoto van het spronggewricht in de achtste week als criterium werd gebruikt. Ofschoon wij van de toepassing van het aschgehalte in de tibiae, zooals reeds eerder gezegd, weinig verwachtten, werd niettemin besloten ook deze bepaling bij de, aan het einde van de proef nog in leven zijnde dieren, uit te voeren.

Over het algemeen kan worden gezegd, dat de proef een gunstig verloop had. Weliswaar kwamen in de eerste week in alle groepen eenige sterfgevallen voor, doch dit was niets bijzonders en hierbij bleef het dan ook. Wat het uitwendig voorkomen der kuikens betreft, hierbij viel te bemerken, dat reeds op den 17den dag in de contrôle-groep kuikens voorkwamen, die aan rachitis leden. De gang bij deze dieren was waggelend; ze vertoonden neiging om geruimen tijd achtereen op de hakken te blijven zitten, terwijl ook het veerenkleed ruig was, d.w.z. dat de veeren niet aangesloten tegen het lichaam lagen. Dit aantal nam langzaam toe en op den 24sten dag waren alle dieren in dezelfde conditie. Sterfte bleef toen ook niet uit, zoodat aan het einde van de proef op den 57sten dag van de 13 kuikens uit deze groep nog slechts 6 in leven waren. Ook in de vijfde groep kwamen een aantal verdachte dieren voor, al moet worden erkend, dat de verschijnselen in deze groep niet zoo fraai waren als in de contrôle-groep; sterfte kwam in deze groep dan ook niet voor. Bij de andere vier groepen viel uiterlijk niets bijzonders waar te nemen. Zooals gezegd kwamen hier na de sterfte in de eerste levensweek der kuikens geen verdere gevallen meer voor. Wat den groei der groepen betreft, deze werd zeer nauwkeurig nagegaan; de kuikens werden hier toe drie maal per week gewogen, hetgeen in de volgende series tot éénmaal per week werd teruggebracht.

De gewichten vertoonden weliswaar schommelingen, maar liepen met uitzondering van de eerste groep, tusschen andere groepen onderling niet bijzonder veel uiteen, al zijn de gewichten aan het einde van de achtste week bij praktijkkuikens, die onder normale omstandigheden zijn gehouden, ongetwijfeld een kleine 100 g. hooger. De groei is, gezien de ongunstige omstandigheden, waaronder de dieren van den eersten dag na hun geboorte af, werden gehouden, evenwel niet slecht te noemen. De gewichten bedroegen in de verschillende groepen gemiddeld: Groep I: 288 ± 77 g.; groep II: 381 ± 55 g.; groep III: 382 ± 53 g.; groep IV: 368 ± 45 g.; groep V: 374 ± 54 g.; groep VI: 366 ± 63 g.

Anders was het met de resultaten die werden verkregen bij de post-mortem beoordeeling van het skelet en met de röntgen-diagnose. Van de post-mortem beoordeeling kan hier worden bemerkt, dat deze plaats vond bij alle dieren die na den 17den dag stierven, zoodat in de eerste groep hiervoor nog 13 kuikens in aanmerking kwamen; in de andere groepen kwam dit praktisch hierop neer, dat op den 57sten dag de kuikens ter beoordeeling werden gedood. De röntgendiagnose vond alléén plaats bij die dieren, die op den 57sten dag nog in leven waren en toen werden gedood. Dit zelfde gold voor de aschbepaling in de tibiae. Zooals o.a. uit tabel 8 blijkt, komen de verkregen cijfers van de aschanalysen niet overeen met de bevindingen van de post-mortem beoordeeling van het skelet en van de röntgenopnamen, waardoor een bevestiging werd verkregen van de opvatting ten aanzien van de toelaatbaarheid van het gebruik van het aschgehalte als eenig criterium voor het aantoonen van rachitis. De resultaten van deze verschillende wijzen van beoordeeling zijn in tabel 8 opgenomen.

TABEL 8.

1. Contrôle-groep.

(Grondrantsoen, waarin 2% grondnotenolie met carotine).

Kuiken-nummer	Geslacht	Leeftijd dg.	Post-mortem onderzoek skelet	Röntgen-diagnose	Aschgehalte tibiae %
990		27	rozenkrans beide zijden		
914		38	" " "		
995		38	" " "		
953		48	" " "		
920		48	" " "		
968		48	" " "		
997		52	" " "		
916	♂	57	" " "	+	28.1
958	♀	57	" " "	++	27.8
961	♀	57	" " "	+++	23.1
971	♀	57	" " "	++++	27.1
973	♀	57	" " "	++++	27.4
996	♀	57	" " "	++++	29.0

2. Levertraan-groep.

(Grondrantsoen, waarin 2% levertraan).

Kuiken-nummer	Geslacht	Leeftijd dg.	Post-mortem onderzoek skelet	Röntgen-diagnose	Aschgehalte tibiae %
908		57	normaal	—	39.5
907	♂	57	"	—	40.4
912	♀	57	"	—	38.0
913	♀	57	"	—	39.1
921	♀	57	"	—	39.9
923	♀	57	"	—	36.4
926	♀	57	"	—	42.4
929	♀	57	"	—	37.2
933	♀	57	"	—	43.4
936	♀	57	"	—	43.1
938	♀	57	"	—	35.0
946	♀	57	"	—	40.4
981	♀	57	"	—	42.1
991	♀	57	ribben bij den overgang wervelkolom verdikt	—	42.5

3. Calciferol-groep A.

(Grondrantsoen, waarin 2% grondnotenolie met carotine en calciferol).
Aantal ratteneenheden vitamine D equivalent met 80% levertraan.

Kuiken- nummer	Geslacht	Leeftijd dg.	Post-mortem onderzoek skelet	Röntgen- diagnose	Aschgehalte tibiae %
909	♂	57	normaal	—	41.0
911	♀	57	ribovergang bij wervelkolom verdikt	—	42.3
948	♀	57	normaal	—	41.1
950	♀	57	"	—	39.6
956	♀	57	"	—	38.5
964	♀	57	"	—	42.3
967	♀	57	"	—	43.3
970	♀	57	"	—	43.4
980	♀	57	"	—	33.3
988	♀	57	"	—	41.5
A 3	♀	57	"	—	39.5
C 3	♀	57	"	—	

4. Groep onverzeepbaar deel levertraan A.

(Grondrantsoen, waarin 2% grondnotenolie met carotine en het onverzeepbaar deel van levertraan in ratteneenheden vitamine D equivalent met 2% levertraan).

Kuiken- nummer	Geslacht	Leeftijd dg.	Post-mortem onderzoek skelet	Röntgen- diagnose	Aschgehalte tibiae %
902	♀	57	normaal	—	39.2
905	♀	57	"	—	39.7
928	♀	57	ribben normaal; sterke kyphose	—	40.8
935	♀	57	normaal	?	37.4
939	♀	57	"	—	42.6
944	♀	57	"	—	45.2
949	♀	57	"	—	41.9
954	♀	57	"	—	43.5
955	♀	57	"	—	45.9
957	♀	57	"	—	42.1
960	♀	57	"	—	44.7
977	♀	57	"	—	45.8
985	♀	57	"	—	39.1
994	♀	57	"	—	41.8
A 4	♀	57	"	—	41.2

5. Calciferol-groep B.

(Grondrantsoen, waarin 2% verzeepbaar deel van levertraan met carotine en calciferol in ratteneenheden vitamine D equivalent met 2% levertraan).

Kuiken-nummer	Geslacht	Leeftijd dg.	Post-mortem onderzoek skelet	Röntgen-diagnose	Aschgehalte tibiae%
915	♂ ♀ ♂ ♀ ♂ ♀ ♂ ♀ ♂ ♀ ♂ ♀ ♂ ♀ ♂	57	normaal	—	38.6
919		57	kypho-scoliose	+	39.8
925		57	normaal	+	36.0
931		57	"	—	38.9
941		57	"	—	39.8
943		57	kypho-scoliose	+	37.4
945		57	scoliose	+	34.5
966		57	"	+	39.3
974		57	normaal	+	36.1
982		57	zeer sterke scoliose	+	37.3
984		57	kyphose	—	38.4
986		57	normaal	—	42.3
992		57	scoliose	+	37.6
993		57	kypho-scoliose	+	39.3
A 5		57	sterke kypho-scoliose	+	39.1

6. Groep onverzeepbaar deel levertraan B.

(Grondrantsoen, waarin 2% verzeepbaar deel van levertraan met carotine en het onverzeepbaar deel van levertraan, in ratteneenheden vitamine D equivalent met 2% levertraan).

Kuiken-nummer	Geslacht	Leeftijd dg.	Post-mortem onderzoek skelet	Röntgen-diagnose	Aschgehalte tibiae%
901	♂ ♀ ♂ ♀ ♂ ♀ ♂ ♀ ♂ ♀ ♂ ♀ ♂ ♀ ♂	57	normaal	—	42.8
903		57	"	—	42.6
910		57	"	—	43.9
930		57	"	—	41.1
934		57	"	—	41.5
947		57	kypho-scoliose	—	42.7
965		57	normaal	—	41.8
975		57	"	—	45.0
976		57	"	—	42.4
978		57	"	—	43.0
983		57	"	—	44.5
989		57	"	—	45.0
B 6		57	"	—	42.5

De uitkomsten in de eerste of wel de contrôle-groep blijken geheel aan de verwachtingen te beantwoorden. Het post-mortem onderzoek van het skelet toonde aan, dat alle dieren een rozenkrans aan beide zijden hadden, waarmee de diagnose rachitis als zeker aanvaard kan worden. Deze waarneming was ook,

althans wat de laatste zes daartoe gebruikte dieren betreft, in overeenstemming met de conclusies die uit de röntgenfoto's van de spronggewrichten van de kuikens konden worden getrokken; ook hier stond met absolute zekerheid vast, dat deze kuikens lijdende waren aan rachitis. Zooals reeds gezegd werd in deze proefserie eveneens het aschgehalte in de tibiae bepaald; zooals uit de tabel blijkt waren de hier gevonden waarden laag; het gemiddelde aschgehalte van de zes daartoe onderzochte dieren bedroeg $27.1 \pm 2\%$.

Met dit proefresultaat is derhalve de uitkomst in de eerste proevenreeks bevestigd; immers ook hier bleek, dat het grondrantsoen aangevuld met 2% grondnotenolie met carotine binnen korten tijd tot rachitis bij kuikens voert. Wat de resultaten uit de tweede of levertraan-groep betreft, ook deze beantwoordden geheel aan de verwachtingen. Met uitzondering van kuiken nr. 991 bleken bij het post-mortem onderzoek der skeletten alle dieren volkomen normaal te zijn, zoodat ook dit resultaat in overeenstemming is met de uitkomst in de eerste proevenreeks, waarbij gevonden was, dat het beschreven grondrantsoen aangevuld met 2% levertraan in staat was de kuikens tegen rachitis te beschutten. Opmerkelijk is in deze groep, dat ook de röntgenfoto tot precies dezelfde uitkomst voert, met dat verschil, dat hier bij kuiken nr. 938 een rachitische afwijking wordt gevonden. Daar een verwisseling van dieren zeer onwaarschijnlijk is, moet de verklaring voor dit feit achterwege blijven. Wel valt te bemerken, dat de röntgenfoto het aschgehalte volgt, dat bij dit dier in vergelijking met de andere kuikens in deze groep laag was. Het gemiddelde aschgehalte bedroeg hier $40.0 \pm 2.6\%$; dit is ontegenzeggelijk belangrijk hooger dan in de contrôle-groep.

Was dus gebleken, dat 2% levertraan in het grondrantsoen in staat is de kuikens tegen rachitis te beschutten, dit zelfde was het geval met een doseering calciferol, overeenkomende in ratteneenheden vitamine D met 80% levertraan. Het post-mortem onderzoek van de skeletten toonde hier aan, dat met uitzondering van kuiken nr. 911, alle dieren volkomen normaal waren. Ofschoon de afwijkingen bij kuiken nr. 911 uitsluitend bestonden in een verdikking van het costo-vertebrale gedeelte van de ribben, moet deze afwijking toch als rachitis worden aangeduid, al was het slechts om in twijfelachtige gevallen

den voorzichtigen weg te bewandelen. Ook het röntgenbeeld voerde tot de reeds medegedeelde conclusie. Alle dieren bleken volkomen normaal te zijn, zoodat hiermede o.i. vast staat, dat een doseering van calciferol in ratteneenheden vitamine D equivalent met 80 % levertraan in staat is de kuikens tegen rachitis te beschutten. Daar in de eerste proevenreeks was gevonden, dat een doseering calciferol in ratteneenheden vitamine D equivalent met 20 % levertraan onvoldoende was om kuikens tegen rachitis te beschutten, volgt nu dat de minimale doseering calciferol tusschen die hoeveelheden gelegen is, welke equivalent is met 20 % à 80 % levertraan. Wat het gemiddelde aschgehalte in deze groep betreft kan worden medegedeeld, dat dit niet verschilt van de waarde in de levertraan-groep gevonden en gemiddeld 40.5 ± 2.9 % bedraagt.

Geheel aan de verwachtingen beantwoordt ook de uitkomst van de vierde groep, die het onverzeepbare deel van levertraan, opgelost in grondnotenolie kreeg toegediend en waarvan het aantal ratteneenheden vitamine D equivalent was met 2 % levertraan. Het post-mortem onderzoek van de skeletten leerde hier duidelijk, dat het onverzeepbare deel uit levertraan in staat was kuikens, op het rachitogene grondrantsoen gehouden, tegen rachitis te beschutten. Slechts één kuiken en wel nr. 928 vertoonde een sterke kyphose, die naar onze meening als wijzende op rachitis moet worden opgevat, waarop nog nader wordt teruggekomen. Opmerkelijk is, dat ook hier de röntgenfoto tot dezelfde uitkomst voert en eveneens één dier als vertoonende rachitis bestempelt; evenals in de tweede groep is het ditmaal ook weer niet hetzelfde kuiken als bij de post-mortem beoordeeling werd gevonden, maar kuiken nr. 935 dat een zeer lichte rachitis vertoont. Ook ditmaal is het resultaat in overeenstemming met het, voor deze groep, lage aschgehalte van de tibiae van dit kuiken, zooals uit de tabel voldoende blijkt. Het gemiddelde aschgehalte in deze groep was iets hooger dan in de tweede en derde groep en bedroeg 42.1 ± 2.7 %.

Zeer interessant, vooral in verband met het doel van deze proevenreeks, waren de resultaten uit de vijfde of wel de calciferol-groep B., waarbij het calciferol opgelost in het verzeepbare deel van de levertraan aan de kuikens werd toegediend. Het na den dood van de kuikens uitgevoerde onderzoek van het skelet voerde hier tot het verrassende resultaat, dat bij geen

van de dieren een rachitische rozenkrans aanwezig was, maar dat bij 9 van de 15 dieren een kyphose, een scoliose of een kypho-scoliose kon worden vastgesteld. De vraag of dit verschijnsel hier als een rachitisch kenmerk moet worden aangemerkt dient om verschillende redenen volmondig bevestigend te worden beantwoord. Al valt niet te ontkennen, dat ook andere oorzaken tot deze afwijkingen van de wervelkolom kunnen leiden, uit de medische literatuur blijkt toch wel, dat indien er andere aanwijzingen zijn, die op rachitis wijzen, men wel met zekerheid een rachitische kyphose of scoliose kan aannemen. Deze aanwijzingen zijn er nu inderdaad en wel in de eerste plaats in het feit, dat dezelfde dieren met hetzelfde grondrantsoen, maar nu geheel vitamine D vrij, duidelijke rachitische rozenkransen vertoonden en in de tweede plaats, dat ook de röntgenfoto van het spronggewricht in dit geval duidelijk aanwijst, dat het hier rachitis betreft. Zelfs werden hier een tweetal dieren met rachitis aangewezen, die bij de post-mortem beoordeeling van het skelet géén afwijkingen vertoonden.

Zoals dus wel uit dit resultaat blijkt valt van een gunstigen invloed van het verzeepbare deel van levertraan niet veel te bespeuren, of men zou moeten aannemen, dat de verandering van het klinische beeld, dat eerst als rachitische rozenkrans tot uiting kwam en dit maal als kyphose of scoliose, een aanwijzing is voor een lichter graad van rachitis. Voor het aannemen van een in het verzeepbare deel van levertraan voorkomende factor, die de werking van het antirachitische vitamine gunstig zou beïnvloeden is uit de resultaten van deze proef derhalve niets gebleken. Indien er van eenige gunstige werking kan worden gesproken, zoo moet deze, zooals later zal blijken in de derde proevenreeks, worden teruggebracht op de kleine hoeveelheden vitamine D uit levertraan die bij het verzeepen in het verzeepbare deel zijn achtergebleven. Een nader onderzoek in deze kwestie komt ons echter gewenscht voor, hetgeen in de volgende proevenreeks zal worden uitgevoerd. Ten aanzien van het gemiddelde aschgehalte van deze groep kan hier nog worden medegedeeld, dat dit $38.3 \pm 1.9\%$ bedroeg en dus niet noemenswaard verschilde van de waarde in de tweede groep of wel de levertraan-groep gevonden.

Geheel aan de verwachtingen beantwoordde ook de zesde

groep; zowel de resultaten van de skelet-beoordeeling, alsook de röntgenfoto toonden aan, dat alle dieren volkomen normaal waren. Dit was dus ook geheel en al in overeenstemming met de uitkomst uit de vierde groep, waarbij het onverzeepbare deel van levertraan opgelost in grondnotenolie met carotine was toegediend. Bij de beoordeeling van dit resultaat moet vooral niet uit het oog worden verloren, dat het werkelijk toegediende percentage vitamine D in deze groep iets hooger was, dan in de andere groepen, daar de hoeveelheid onverzeepbaar deel van levertraan die werd gegeven in ratteneenheden vitamine D equivalent was met 2 % levertraan; maar dat ook het verzeepbare deel van de traan nog wat vitamine D bevatte. Het gemiddelde aschgehalte in deze groep was 43.0 ± 1.3 %; een significant verschil met de andere groepen bestond niet.

Wanneer na deze korte beschouwing over de groepen afzonderlijk, de resultaten in onderling verband worden gezien, dan blijken zij deels een bevestiging van onze vorige proevenreeks, deels ook nieuwe feiten te brengen. Zoo kon ten aanzien van de werking van grondnotenolie met carotine, alsook van levertraan worden bevestigd, wat reeds was vastgesteld. Het vroeger in de oriënterende proef geuite vermoeden, dat het onverzeepbare deel van levertraan wel degelijk in staat zou zijn, om kuikens, gehouden op het rachitogene dieet, tegen rachitis te beschutten, kon worden bewezen. Vervolgens was het in deze proevenreeks mogelijk, de werking van het calciferol ten opzichte van levertraan nader aan te geven, doordat werd gevonden, dat de hoeveelheid ratteneenheden vitamine D, nodig in den vorm van calciferol ter voorkoming van rachitis bij kuikens, onder onze proefvoorwaarden tusschen 10 tot 40 maal zoo groot is als de doseering in den vorm van levertraan. Ten aanzien van de werking van het verzeepbare deel van levertraan was het uit de resultaten, die werden verkregen onwaarschijnlijk, dat in het verzeepbare deel van levertraan een factor zou voorkomen, die de antirachitische werking van het calciferol voor kuikens zou bevorderen. De eenvoudigste verklaring is o.i. aan te nemen, dat de ongetwijfeld betere werking van calciferol opgelost in het verzeepbare deel van levertraan berust op kleine hoeveelheden vitamine D, die bij de bereiding van het onverzeepbare deel van levertraan in het verzeepbare deel zijn achtergebleven. Dit vraagstuk zal in een volgende proevenreeks

nog nader worden bestudeerd.

Wanneer vervolgens de uitkomsten van deze proevenreeks worden vergeleken in verband met het criterium röntgenfoto en post-mortem beoordeeling van het skelet, dan blijkt, dat deze uitkomsten over het algemeen vrij goed met elkander overeenkomen. Dat neemt niet weg, dat af en toe enkele uitzonderingen werden waargenomen, waarvoor geen verklaring kon worden gegeven. Het is mogelijk, dat de röntgenfoto een somtijds selectiever criterium is dan de post-mortem beoordeeling van het skelet. Anders was het met het aschgehalte van de tibiae, dat eveneens werd bepaald. Met uitzondering van de gemiddelde waarde uit de contrôle-groep liepen de gemiddelden niet bijzonder veel uiteen, zoodat van significante verschillen hier geen sprake is. Tot wat voor een conclusie dit aanleiding kan geven blijkt b.v. uit de vergelijking van de aschgehalten van groep 2 en groep 5, die practisch gelijk zijn. De conclusie zou o.i. hier dus gerechtigd zijn, dat het calciferol even goed gewerkt heeft als 2% levertraan. Zoowel het post-mortem onderzoek van het skelet alsook de röntgenfoto waren hiermede in tegenspraak.

Wanneer tenslotte de resultaten in enkele conclusies worden samengevat, dan kan worden gezegd:

a. De conclusie uit de vorige proevenreeks, waarbij was gevonden, dat kuikens op ons rachitogene proefrantsoen ter voorkoming van rachitis veel meer ratteneenheden vitamine D nodig hebben in den vorm van bestraald ergosterol, dan in den vorm van levertraan, kon worden bevestigd. Het aantal ratteneenheden vitamine D nodig ter voorkoming van rachitis was in den vorm van bestraald ergosterol tusschen 10 tot 40 maal zoo groot als het aantal ratteneenheden vitamine D in den vorm van levertraan.

b. Het onverzeepbare deel van levertraan bleek volkomen in staat te zijn om kuikens, op ons rachitogene proefrantsoen gehouden, tegen rachitis te beschutten en wel in een doseering die overeenkwam met 2% levertraan.

c. Het verzeepbare deel van de levertraan heeft geen invloed op het effect van bestraald ergosterol. Het iets betere resultaat, dat werd waargenomen bij het toedienen van calciferol opgelost in het verzeepbare deel van levertraan, moet waarschijnlijk worden toegeschreven aan de antirachitische werking van sporen vitamine D, die na de verzeeping van de levertraan in het verzeepbare deel zijn achtergebleven.

Derde Proevenreeks. Had de tweede proevenreeks ons derhalve weer een stap verder gebracht, toch leek het gewenscht eens nader te onderzoeken, of het in conclusie c. van de tweede proevenreeks uitgesproken vermoeden wel juist was, dat de geringe werking van het verzeepbare deel van de levertraan aan sporen vitamine D moet worden toegeschreven, die na de verzeeping in het verzeepbare deel zijn achtergebleven. Getracht werd het eventueele vitamine D uit het verzeepbare deel te verwijderen. Hiertoe werd gebruik gemaakt van een mededeeling van Rygh (1934, a.), dat noriet in staat zou zijn vitamine D te adsorberen. Het verzeepbare deel van de levertraan werd daartoe met 5% noriet gedurende 30 minuten bij een temperatuur van 50° tot 60° C flink geroerd en vervolgens gecentrifugeerd, waardoor het noriet van de vetzuren kon worden gescheiden. Vervolgens werd het noriet geëxtraheerd met een mengsel van æther-aceton 1:1 en wel in de koude gedurende 3 maal 24 uur. Met behulp van de biologische ijking met ratten werd nu het effect van deze behandeling bestudeerd, waarbij bleek dat het verlangde resultaat in geen deele was bereikt. Daarna werd in plaats van met noriet getracht of met Vollersaarde een beter effect kon worden verkregen waarbij op precies dezelfde wijze werd gewerkt als met het noriet. Ook hier toonde de rattenproef wederom aan, dat op deze wijze geen verzeepbaar deel van levertraan werd verkregen, dat geheel geen antirachitische werkzaamheid vertoonde. Toch bleek, dat de Vollersaarde wel wat had vastgelegd, daar het extract van Vollersaarde in een hoeveelheid overeenkomende met 300 mg. verzeepbaar deel per rat per dag wel eenig effect vertoonde.

Of het soms mogelijk is met behulp van de chromatografische analyse en een geschikt adsorbens den antirachitisch-werkzamen factor uit het verzeepbare deel van de levertraan te verwijderen werd niet beproefd. Wel werd nog nagegaan of door verhitting in vacuum bij een temperatuur van 160° tot 170° C de antirachitisch werkzame stof werd vernietigd. Hiertoe werd een hoeveelheid verzeepbaar deel van levertraan gedurende 3 uren in een geëvacueerde buis tot de genoemde temperatuur verhit. De biologische ijkproef toonde hier aan, dat de antirachitische werkzaamheid weliswaar iets was verminderd, maar niet geheel was verdwenen.

De resultaten van de laatste serie ijkproeven met ratten, ten einde de werkzaamheid der verschillende preparaten uit het verzeepbare deel van levertraan gemaakt te bestudeeren, zijn in tabel 9 weergegeven.

TABEL 9.

Groepen-indeeling	Aantal Ratten	Röntgendiagnose	
		Rachitis	Beschut
1. Grondrantsoen met dagelijksch 0.1 cc grondnotenolie met carotine	8	7	1
2. Grondrantsoen met dagelijksch 0.1 cc grondnotenolie met carotine, waarin 0.05 cc verzeepbaar deel van levertraan	8	6	2
3. Grondrantsoen met dagelijksch 0.1 cc grondnotenolie met carotine, waarin 0.05 cc verzeepbaar deel van levertraan behandeld met Vollersaarde	6	5	1
4. Grondrantsoen met dagelijksch 0.1 cc grondnotenolie met carotine, waarin 0.05 cc verzeepbaar deel van levertraan „verhit”	8	5	3
5. Grondrantsoen met dagelijksch 0.1 cc verzeepbaar deel van levertraan, waarin carotine	8	3	5
6. Grondrantsoen met dagelijksch 0.1 cc verzeepbaar deel van levertraan, waarin carotine en behandeld met Vollersaarde	8	3	5
7. Grondrantsoen met dagelijksch 0.1 cc verzeepbaar deel van levertraan „verhit”, waarin carotine	8	5	3
8. Grondrantsoen met dagelijksch 0.1 cc grondnotenolie met carotine, waarin Vollersaarde extract, overeenkomende met 100 mg. verzeepbaar deel van levertraan	8	8	0
9. Grondrantsoen met dagelijksch 0.1 cc grondnotenolie met carotine, waarin Vollersaarde extract, overeenkomende met 200 mg. verzeepbaar deel van levertraan	8	6	2
10. Grondrantsoen met dagelijksch 0.1 cc grondnotenolie met carotine, waarin Vollersaarde extract, overeenkomende met 300 mg. verzeepbaar deel van levertraan	8	2	6

2. Toen het niet gelukte op deze wijze ons doel te bereiken, werd getracht langs anderen weg aan te toonen, dat het vermoeden in conclusie c. van de vorige proevenreeks uitgesproken waarschijnlijk juist is. Hierbij werd uitgegaan van de volgende redeneering. Indien de geringe antirachitische werking van het verzeepbare deel van levertraan bij kuikens

inderdaad moet worden toegeschreven aan sporen vitamine D, die na verzeeping in het verzeepbare deel van de levertraan waren achtergebleven, dan moeten de resultaten bij het gebruik van een grootere hoeveelheid van het verzeepbare deel in het kuikenrantsoen gunstiger worden, terwijl het verder mogelijk moet zijn een zelfde effect te verkrijgen, indien het verzeepbare deel van de levertraan nu vervangen wordt door een hoeveelheid levertraan zelf, die in ratteneenheden vitamine D equivalent is aan de toegediende hoeveelheid verzeepbaar deel van levertraan.

Uitgaande van deze redeneering is nu getracht in deze derde kuikenproef dit vermoeden te bevestigen. Als proefdieren werden wederom witte Leghorn-eendagskuikens gebruikt en wel van denzelfden stam als in onze vorige proeven. De kuikens werden zooals gewoonlijk reeds den eersten dag in groepen ingedeeld, die allen hetzelfde en reeds herhaalde malen genoemd grondrantsoen ontvingen, waardoor het voor elke groep bestemde preparaat was vermengd. De duur van de proef was gesteld op 8 weken; daarna zouden de spronggewrichten worden geröntgend, de dieren worden gedood en de skeletten vrijgeprepareerd, terwijl het aschgehalte in de tibiae zou worden bepaald. Eenmaal per week werden de kuikens gewogen, terwijl eveneens eenmaal per week het rantsoen voor de verschillende groepen werd bereid, door vermenging van de verschillende preparaten onder het grondrantsoen. Daar van de te gebruiken preparaten nog een voldoende hoeveelheid in voorraad was uit de vorige proevenreeks en toen reeds een ijking met ratten had plaats gevonden, werd deze thans achterwege gelaten. De in deze proevenreeks gebruikte indeeling der verschillende groepen was als volgt. Alle groepen ontvingen wederom het reeds genoemde grondrantsoen waardoor de verschillende preparaten werden gemengd.

Dit was voor: Groep I: 4 % grondnotenolie met carotine.

Groep II: 4 % grondnotenolie met carotine en een hoeveelheid calciferol, waarvan het aantal ratteneenheden vitamine D overeenkomt met 2 % levertraan.

Groep III: 0.25 % levertraan en 3.75 % grondnotenolie met carotine en een hoeveelheid calciferol, waarvan het aantal ratteneenheden vitamine D overeenkomt met 2 % levertraan;

Groep IV: 4 % van het verzeepbare deel van levertraan;

Groep V: 4 % van het verzeepbare deel van levertraan en een hoeveelheid calciferol waarvan het aantal ratteneenheden vitamine D overeenkomt met 2 % levertraan;

Groep VI: 2 % van het verzeepbare deel van levertraan en 2 % grondnotenolie met carotine, waarin een hoeveelheid calciferol, waarvan het aantal ratteneenheden vitamine D overeenkomt met 4 % levertraan.

Zooals uit dit overzicht duidelijk blijkt, werd in groep III een hoeveelheid vitamine D in den vorm van levertraan gegeven, welke volgens de ratten-ijkproef overeenkwam met 4 % van het verzeepbare deel van levertraan. Door een vergelijking van de groepen III, IV en V kon nu worden nagegaan of deze geringe hoeveelheid vitamine D een werking uitoefent en zoo ja welke.

Indien nu de werking van het verzeepbare deel van levertraan aan de sporen antirachitisch vitamine — die bij het verzeepen achtergebleven zijn — moet worden toegeschreven, dan zal het effect in groep III, IV en V practisch gelijk moeten zijn en beter dan in groep I en II; het effect in groep VI zal dan evenwel weer minder zijn dan in de drie voorafgaande groepen. Alvorens evenwel tot de bespreking van de resultaten over te gaan wordt eerst een en ander medegedeeld over het verloop van deze proevenreeks. Al kwamen in de eerste week in sommige groepen verschillende sterfgevallen voor, over het algemeen is het proefverloop vrij gunstig te noemen. Daar het meerendeel der kuikens aan zware rachitis leed valt het zelfs niet te verwonderen, dat ook in de latere weken nog wel eens een kuiken stierf. Bij de post-mortem beoordeeling van de ribben werd zooals gewoonlijk gebruik gemaakt van alle dieren die na den 17den dag stierven. Voor de röntgenfoto, alsook voor de aschbepaling in de tibiae werden alleen die kuikens gebruikt, die aan het einde van deze proef, dus op den 57sten dag, nog in leven waren.

Over den groei van de dieren kan worden medegedeeld, dat deze in verband met het feit, dat het meerendeel der dieren zware rachitis had, niet onbevredigend was. De gemiddelde gewichten van de groepen, berekend uit de dieren, die aan het einde van de proef nog in leven waren, komen goed met elkaar overeen en zijn ook in vergelijking tot de rachitische groepen uit de vorige reeks niet abnormaal. Opvallend is, dat de controle-groep, die in het geheel geen vitamine D ontving, toch

aanzienlijk lichter is dan de andere groepen, die weliswaar onvoldoende vitamine D ontvingen, getuige het nog te noemen resultaat, maar die toch in ieder geval nog wat van den anti-rachitischen factor met hun voeder naar binnen kregen. De gemiddelde gewichten in de verschillende groepen waren de volgende. Groep I: 210 ± 19 g.; groep II: 293 ± 65 g.; groep III: 290 ± 65 g.; groep IV: 291 ± 58 g.; groep V: 292 ± 45 g.; groep VI: 270 ± 38 g.

De resultaten, die in deze proeven met kuikens werden verkregen, zijn in tabel 10 samengevat.

TABEL 10.

1. Contrôle-groep.

(Grondrantsoen, waarin 4 % grondnotenolie met carotine).

Kuiken-nummer	Geslacht	Leeftijd dg.	Post-mortem onderzoek skelet	Röntgen-diagnose	Aschgehalte tibiae %
11		25	rozenkrans beide zijden		
12		25	" " "		
20		29	" " "		
18		33	" " "		
4		36	" " "		
8		36	" " "		
5		38	" " "		
15		38	" " "		
2		39	" " "		
14		40	" " "		
6		41	" " "		
9		42	" " "		
10		46	" " "		
19		46	" " "		
17		48	" " "		
1	♂ ♀ + ♀ + ♀	57	" " "	+	33.8
3		57	" " "	+	29.5
7		57	" " "	+	33.6
13		57	" " "	+	29.2
16		57	" " "	+	29.1
				" " "	

2. Groep II.

(Grondrantsoen, waarin 4% grondnotenolie met carotine en calciferol. Aantal ratteneenheden vitamine D, in den vorm van calciferol equivalent met 2% levertraan).

Kuiken-nummer	Geslacht	Leeftijd dg.	Post-mortem onderzoek skelet	Röntgen-diagnose	Aschgehalte tibiae %
36		30	rozenkrans beide zijden		
35		30	" " "		
34		42	" " "		
29		47	" " "		
21		52	" " "		
22	♂	57	" " "	+	27.0
23		57	" " "	+	27.6
24		57	" " "	+	27.4
25		57	" " "	+	25.3
26		57	" " "	+	28.0
27		57	" " "	+	30.8
28		57	" " "	+	27.3
30		57	" " "	+	30.6
31		57	" " "	+	28.2
32		57	" " "	+	28.5
33		57	" " "	+	31.0
37		57	" " "	+	25.3
39		57	" " "	+	28.9
40		57	" " "	+	27.9

3. Groep III.

(Grondrantsoen, waarin 0.25% levertraan, alsmede 3.75% grondnotenolie met carotine en calciferol. Aantal ratteneenheden vitamine D in den vorm van calciferol equivalent met 2% levertraan).

Kuiken-nummer	Geslacht	Leeftijd dg.	Post-mortem onderzoek skelet	Röntgen-diagnose	Aschgehalte tibiae %
58		24	normaal		
46		45	twijfelachtige rozenkrans		
41	♂	57	" normaal "	+	30.3
42		57	" normaal "	+	31.3
43		57	rozenkrans beide zijden	+	32.7
44		57	normaal	-	35.0
47		57	rozenkrans beide zijden	+	32.4
48		57	" " "	+	30.5
49		57	" " "	+	29.4
50		57	zeer zwakke rozenkrans	+	31.0
51		57	" " "	+	28.6
52		57	rozenkrans beide zijden	+	30.2
53		57	" " "	+	35.0
54		57	" " "	+	31.4
55		57	" " "	+	31.9
56		57	" " "	+	28.5
57		57	" normaal "	-	29.4
59	57	rozenkrans beide zijden	+	29.7	
60	57	zeer zwakke rozenkrans	+	37.3	

4. Groep IV.

(Grondrantsoen, waarin 4% van het verzeepbare deel van levertraan met carotine).

Kuiken-nummer	Geslacht	Leeftijd dg.	Post-mortem onderzoek skelet	Röntgen-diagnose	Aschgehalte tibiae %
68		17	normaal		
80		17	scoliose		
64		47	rozenkrans beide zijden		
61	♂	57	" " "	+	28.1
62	♀	57	" " "	+	31.7
63	♀	57	" " "	+	26.9
65	♀	57	sterk misvormde ribben	+	28.3
67	♀	57	rozenkrans beide zijden	+	32.0
69	♀	57	" " "	+	32.9
70	♀	57	" " "	+	28.5
71	♀	57	normaal	?	29.7
72	♀	57	rozenkrans beide zijden	+	28.9
73	♀	57	" " "	+	29.1
74	♀	57	" " "	+	27.7
75	♀	57	normaal	-	32.8
76	♀	57	normaal	?	32.4
78	♀	57	rozenkrans beide zijden	+	27.1
79	♀	57	" " "	+	30.1

5. Groep V.

(Grondrantsoen, waarin 4% van het verzeepbare deel van levertraan met carotine en calciferol. Aantal ratteneenheden vitamine D in den vorm van calciferol equivalent met 2% levertraan).

Kuiken-nummer	Geslacht	Leeftijd dg.	Post-mortem onderzoek skelet	Röntgen-diagnose	Aschgehalte tibiae %
94		30	rozenkrans beide zijden		
95		50	" " "		
81	♂	57	" " "	+	31.7
82	♂	57	normaal	+	34.0
83	♂	57	rozenkrans beide zijden	+	30.4
84	♂	57	" " "	+	31.6
86	♂	57	" " "	+	32.1
88	♂	57	" " "	+	32.5
89	♂	57	" " "	+	32.8
91	♂	57	normaal	+	33.6
92	♀	57	" " "	-	40.7
96	♀	57	rozenkrans beide zijden	+	32.7
98	♀	57	" " "	+	29.6
99	♀	57	" " "	+	34.1

6. Groep VI.

(Grondrantsoen, waarin 2% grondnotenolie met carotine en 2% van het verzeepbare deel van levertraan met carotine en calciferol. Aantal ratten-eenheden vitamine D in den vorm van calciferol equivalent met 4% levertraan).

Kuiken-nummer	Geslacht	Leeftijd dg.	Post-mortem onderzoek skelet	Röntgen-diagnose	Aschgehalte tibiae %
101	♂	40	rozenkrans beide zijden	+	32.0
102		57	" " "	+	26.9
103		57	" " "	+	32.7
104		57	" " "	+	29.7
105		57	" " "	+	27.8
106		57	" " "	+	34.5
107		57	" " "	+	31.7
108		57	eenzijdige rozenkrans	+	31.2
109		57	rozenkrans beide zijden	+	28.9
110		57	" " "	+	30.1
111		57	" " "	+	27.5
112		57	" " "	+	28.3
113		57	normaal	+	27.7
117		57	eenzijdige rozenkrans	+	33.5
118		57	rozenkrans beide zijden	+	29.9
119		57	eenzijdige rozenkrans	+	28.4
120		57	rozenkrans beide zijden	+	

Zoals bij het bestudeeren van deze tabel blijkt, beantwoordt de uitkomst van groep I geheel en al aan de verwachtingen en is een bevestiging van de reeds in de vorige groepen verkregen resultaten. Het post-mortem onderzoek, dat voor deze groep bij alle dieren kon worden uitgevoerd, toonde aan, dat alle dieren zonder uitzondering rachitis hadden. Voor de vijf dieren, die aan het einde van de proef nog in leven waren, werd deze waarneming ook door de röntgenfoto bevestigd. Het aschgehalte in de tibiae van deze vijf dieren was zeer laag en bedroeg gemiddeld $31.0 \pm 2.4\%$. Geheel in overeenstemming met de verwachtingen en een bevestiging van een reeds in de vorige reeks gevonden waarneming, waren de uitkomsten in de tweede groep. Hier kwamen 19 dieren voor de post-mortem beoordeling van het skelet in aanmerking, die allen zeer zware rachitis hadden. Bij de 14 dieren, die in deze groep aan het einde van de proef in leven waren, kon dit resultaat door de uitkomst op de röntgenfoto worden bevestigd. De bepaling van het gemiddelde aschgehalte in de tibiae bij deze dieren gaf als uitkomst een waarde van $28.1 \pm 1.8\%$. Van groot belang waren de uitkomsten van de volgende groepen, die in onderling ver-

band en in vergelijking met de waarnemingen uit de tweede reeks moeten worden beschouwd, waarop dadelijk wordt teruggekomen. De post-mortem beoordeeling werd in de derde groep bij 19 kuikens uitgevoerd, waarvan 4 dieren normaal, 2 dieren twijfelachtig waren, terwijl de overige kuikens rachitis hadden, waarbij een drietal met een heel geringen graad. Bij 17 dieren, die aan het einde van de proef nog in leven waren, kon ook de röntgendiagnose worden gesteld. Hierbij bleek, dat een tweetal dieren volkomen normaal was, terwijl een drietal twijfelgevallen werden geconstateerd. Een der dieren, die bij de post-mortem beoordeeling als normaal werd aangemerkt bleek op de röntgenfoto toch rachitis te hebben. Het aschgehalte in de tibiae, dat bij de 17 kuikens die aan het einde van de proef nog in leven waren werd bepaald, bedroeg gemiddeld $31.4 \pm 2.4 \%$.

In de vierde groep vond de post-mortem beoordeeling van het skelet bij 18 dieren plaats, waarbij een viertal dieren als normaal moesten worden aangemerkt, terwijl de overige kuikens meerendeels zware rachitis hadden. De röntgendiagnose die hier bij 15 dieren kon worden gesteld, die aan het einde van de proef nog in leven waren, had het volgende resultaat. Eén der kuikens bleek volkomen normaal te zijn, terwijl de andere twee kuikens, die bij de post-mortem beoordeeling als normaal werden betiteld, een twijfelachtige rachitis volgens de röntgenfoto bleken te bezitten. Het aschgehalte in de tibiae, dat hier ook werd bepaald bedroeg gemiddeld $29.7 \pm 2.0 \%$. Het aantal der kuikens, dat in de vijfde groep binnen 17 dagen stierf, was zoals reeds werd gezegd vrij hoog en bedroeg 6 dieren, zoodat voor de post-mortem beoordeeling van het skelet slechts 14 dieren over bleven. Daar in den loop van de proef nog een tweetal dieren stierven bleven voor de röntgendiagnose aan het einde van de proef slechts een twaalfstal kuikens aanwezig. De post-mortem beoordeeling had tot resultaat, dat drie kuikens als normaal konden worden aangemerkt, terwijl de overige elf rachitis hadden. De röntgenfoto, van het spronggewricht van de 12 kuikens, die aan het einde van de proef in leven waren, gaf aan dat slechts één kuiken normaal was en de overige rachitis hadden. Ook hier week de röntgenfoto af van de post-mortem beoordeeling van het skelet. Het gemiddelde aschgehalte in de tibiae bedroeg in deze groep $33.8 \pm 2.8 \%$; ofschoon dit

gemiddelde oogenschijnlijk hooger is dan het gemiddelde aschgehalte in groep II, is hier toch van een significant verschil geen sprake.

In de zesde groep kwamen voor de post-mortem beoordeeling van het skelet 17 dieren in aanmerking, waarvan er slechts één normaal was; dit resultaat stemde volkomen overeen met de uitkomst van de röntgendiagnose, die aan het einde van de proef bij 16 dieren plaats vond. Het aschgehalte van de tibiae in deze groep bedroeg gemiddeld $30.3 \pm 2.3\%$.

Wanneer nu de resultaten aan een onderlinge beschouwing worden onderworpen, dan kan worden opgemerkt, dat die van de groepen I en II geheel in overeenstemming waren met hetgeen reeds in vorige reeksen was gevonden, zoodat verder commentaar hier overbodig is. Doch ook de uitkomsten van de andere reeksen beantwoorden bij onderlinge vergelijking aan de verwachtingen. Een vergelijking van de resultaten van de groepen III, IV en V doet ons zien, dat het vrijwel onverschillig is of het natuurlijke vitamine D uit levertraan in den vorm van levertraan of in den vorm van een, in ratteneenheden equivalente hoeveelheid van het verzeepbare deel van levertraan wordt gegeven. Ook bleek duidelijk, dat het toevoegen van calciferol in een hoeveelheid, in ratteneenheden vitamine D equivalent met 2% levertraan, het effect van 0.25% levertraan of wat daarmee equivalent is, nl. 4% van het verzeepbare deel van levertraan, niet verbeterde. Zelfs het vervangen in de zesde groep van een hoeveelheid verzeepbaar deel van levertraan, in ratteneenheden equivalent met 0.12% levertraan, door een hoeveelheid calciferol, in ratteneenheden equivalent met 2% levertraan had niet het minste effect. Wel waren de resultaten in de groepen III, IV en V beter dan in de groepen I en II, hetgeen ook in overeenstemming is met de uitkomsten van de voorafgaande reeksen.

Op grond van deze resultaten kan de conclusie c., aan het einde van de vorige reeks getrokken, ten volle worden gehandhaafd. Er bestaat geen enkele reden om in levertraan een of andere factor aan te nemen, die stimulerend op het calciferol zou werken en het antirachitische effect hiervan bij kuikens zou vergrooten; evenmin achten wij het waarschijnlijk, op grond van onze proeven, dat in het verzeepbare deel van levertraan een andere antirachitische factor zou voorkomen,

dan die welke bekend is onder den naam van vitamine D. Er bestaat integendeel alle aanleiding om te besluiten, dat de antirachitische werking, bij het toedienen van een 10- tot 20-voudige doseering van het verzeepbare deel van levertraan, enkel en alleen moet worden toegeschreven aan de kleine hoeveelheden van het vitamine D, die bij de bereiding van de onverzeepbare fractie van levertraan in het verzeepbare deel zijn achtergebleven.

Wanneer hier enkele woorden worden gewijd aan de vergelijking van de resultaten bij de post-mortem beoordeeling van het skelet verkregen en de resultaten zooals deze door de röntgenmethode werden vastgesteld, dan zijn er ook ditmaal weer enkele kleine aanwijzingen, dat de röntgenfoto somtijds selectiever is dan de post-mortem beoordeeling van het skelet, ofschoon over het algemeen genomen de uitkomsten goed met elkander in overeenstemming zijn. Tusschen het gemiddelde aschgehalte in de tibiae van de verschillende groepen bleek geen significant verschil te bestaan.

Wanneer aan het einde van deze proevenreeks het resultaat in een enkele conclusie wordt samengevat, dan kan worden besloten:

Deze proeven leveren geen enkele aanwijzing op, dat levertraan in de verzeepbare fractie een of anderen factor bevat, die activeerend zou werken op het kunstmatige vitamine D. Evenmin bestaat er eenige aanleiding om in het verzeepbare deel van levertraan een anderen antirachitischen factor aan te nemen dan die, welke bekend is onder den naam van vitamine D. De iets betere werking, die wordt waargenomen, wanneer het bestraalde ergosterol wordt toegediend opgelost in het verzeepbare deel van levertraan, in plaats van in grondnotenolie, kan worden verklaard door de werking van het vitamine D zelf, dat bij de bereiding en afscheiding van de onverzeepbare fractie van levertraan in het verzeepbare deel is achtergebleven. Deze verklaring geldt ook voor de antirachitische werkzaamheid van groote hoeveelheden van de verzeepbare fractie van levertraan.

Vierde Proevenreeks. Zooals uit de tweede proevenreeks was gebleken, kon met een hoeveelheid van de onverzeepbare fractie van levertraan in ratteneenheden vitamine D

equivalent met 2% levertraan, ook bij kuikens onder onze proefvoorwaarden, rachitis worden voorkomen. Daar het onverzeeptbare deel van levertraan evenwel, behalve het antirachitische vitamine nog tal van andere stoffen bevat, kwam de vraag op, of ook met een, zoo zuiver mogelijk, antirachitische fractie uit levertraan dit zelfde zou kunnen worden bereikt. Om dit te kunnen probeeren werd besloten, uitgaande van de in deze proeven gebruikte levertraan, volgens de door Ender (1933) beschreven methode een preparaat te maken, waarvan de antirachitische werking bij de rat zoo veel mogelijk gelijk was aan die van bestraald ergosterol. Inderdaad gelukte het op deze wijze een preparaat te maken, dat bij ratten echter in een hoeveelheid van 10 tot 15 γ per dag voldoende was, om de dieren tegen rachitis te beschutten. Dit product was dus nog lang niet zoo actief als de door Ender beschreven preparaten en ook vele malen minder werkzaam bij de rat dan het kristallijne bestraalde ergosterol. Bovendien bracht de bereiding groote moeilijkheden mede. De opbrengst was gering en de hoeveelheden levertraan die moesten worden verwerkt om een voldoende hoeveelheid van dit product te krijgen waren zoo groot dat besloten werd een andere oplossing te zoeken om met een dergelijk preparaat te kunnen werken.

Dit lukte door dat Ender zoo welwillend was om ons een hoeveelheid van het door hem uit tonijntraan vervaardigde preparaat ter beschikking te stellen, waarvoor hier een woord van dank op zijn plaats is. Nu bestond natuurlijk de mogelijkheid, dat het antirachitische vitamine D uit tonijntraan niet identiek was met het vitamine D uit kabeljauwlevertraan; a priori leek ons dit niet waarschijnlijk, zoodat werd besloten met het preparaat uit tonijntraan de proeven te vervolgen, temeer ook daar het zooals gezegd zeer moeilijk was een behoorlijke hoeveelheid van een soortgelijk preparaat uit levertraan te vervaardigen. Nadat het experimenteele gedeelte van dit onderzoek was voltooid, verscheen een voorloopige mededeeling van Bills, Massengale en Imboden (1934), waarin zij tot de conclusie komen, dat het antirachitische vitamine uit tonijntraan niet identiek is met het vitamine D uit kabeljauwlevertraan en uit heilbotlevertraan. Zooals nog nader zal blijken is dit resultaat niet in overeenstemming met onze proefuitkomst. De volledige gegevens van deze onder-

zoekers, dienen, alvorens een conclusie te kunnen trekken, te worden afgewacht.

1. Evenals in de vorige proevenreeksen ging ook hier wederom aan de kuikenproef de rattenproef vooraf, waarbij werd nagegaan hoe groot de minimum hoeveelheid van het preparaat uit tonijentraan bedroeg, dat noodig was om ratten tegen rachitis te beschutten onder deze proefvoorwaarden. Volgens de opgaven van Ender zelf bedroeg de therapeutische dosis voor de rat 0.03 tot 0.04 γ per rat per dag.

Evenals de vorige ijkproeven werd ook dit maal weer van de preventieve methode gebruik gemaakt, waartoe een vijftal groepen ratten werden opgezet, elk uit 10 dieren bestaande, nl. 5 mannetjes en 5 wijfjes. Als grondrantsoen werd gebruikt het reeds verschillende malen genoemde grondrantsoen, waarnaast driemaal per week per pipet de preparaten werden toegediend. De groepenindeeling was in deze ijkproef als volgt. De eerste, of wel de contrôle-groep, ontving het rachitogene dieet, met daarnaast te beginnen op den derden proefdag, driemaal per week per pipet een hoeveelheid grondnotenolie met carotine en wel tweemaal 0.1 cc en de derde maal (Vrijdag) 0.15 cc. De tweede groep ontving hetzelfde grondrantsoen en dezelfde hoeveelheid grondnotenolie met carotine, maar hierin tevens een hoeveelheid van het preparaat uit tonijentraan van Ender, overeenkomende met een hoeveelheid van 0.03 γ per rat per dag; in de derde groep bedroeg de hoeveelheid van het preparaat uit tonijentraan 0.05 γ per rat per dag; in de vierde groep 0.07 γ per rat per dag, terwijl in de vijfde groep een hoeveelheid van het preparaat uit tonijentraan werd gegeven overeenkomende met 0.09 γ per rat per dag.

Den 16den proefdag werd het kniegewricht van den rechterachterpoot bij alle dieren geröntgend en het resultaat beoordeeld. Hierbij bleek, dat op één twijfelachtig geval na, alle dieren uit de eerste groep duidelijk rachitis hadden. In de tweede groep bleken 8 van de 10 dieren duidelijk rachitis te hebben terwijl de uitkomst bij een tweetal dieren twijfelachtig was. Ook de derde groep was nog niet beschut; van de 10 ratten waren er hier slechts 5 beschut, 1 twijfelachtig, terwijl er 4 zeer duidelijk rachitis hadden. In de vierde groep bleken alle dieren beschut te zijn, terwijl in de vijfde groep een zeer sterk gegroeid dier een twijfelachtige rachitis vertoonde, terwijl de anderen

normaal waren; bij een dier uit deze groep was de röntgenfoto mislukt, zoodat geen beoordeeling kon plaats vinden.

De resultaten van deze ijkproef zijn in tabel 11 samengevat.

TABEL 11.
1. Contrôle-groep.

Nr. Geslacht	8417 ♀	8418 ♀	8419 ♀	8420 ♀	8421 ♀	8422 ♂	8423 ♂	8424 ♂	8425 ♂	8426 ♂
Begingewicht	g. 44	g. 43	g. 40	g. 39	g. 45	g. 39	g. 44	g. 39	g. 38	g. 41
Eindgewicht na 16 dagen . . .	86	90	80	76	83	63	84	83	dood	60
Röntgendiagnose na 16 dagen	+	+	+	?	+	+	+	+	"	+

2. Groep met preparaat uit tonijnentraan.
(per rat per dag 0.03 γ preparaat uit tonijnentraan).

Nr. Geslacht	8437 ♀	8438 ♀	8439 ♀	8440 ♀	8441 ♀	8442 ♂	8443 ♂	8444 ♂	8445 ♂	8446 ♂
Begingewicht	g. 36	g. 44	g. 45	g. 35	g. 43	g. 33	g. 36	g. 34	g. 35	g. 38
Eindgewicht na 16 dagen . . .	97	87	70	67	92	74	89	78	69	75
Röntgendiagnose na 16 dagen	+	+	-	?	?	+	+	+	+	+

3. Groep met preparaat uit tonijnentraan.
(per rat per dag 0.05 γ preparaat uit tonijnentraan).

Nr. Geslacht	8427 ♀	8428 ♀	8429 ♀	8430 ♀	8431 ♀	8432 ♂	8433 ♂	8434 ♂	8435 ♂	8436 ♂
Begingewicht	g. 45	g. 40	g. 45	g. 43	g. 40	g. 45	g. 37	g. 36	g. 35	g. 37
Eindgewicht na 16 dagen . . .	77	72	79	83	68	84	72	79	74	65
Röntgendiagnose na 16 dagen	-	-	-	?	-	-	+	+	+	+

4. Groep met preparaat uit tonijnentraan.
(per rat per dag 0.07 γ preparaat uit tonijnentraan).

Nr. Geslacht	8447 ♀	8448 ♀	8449 ♀	8450 ♀	8451 ♀	8452 ♂	8453 ♂	8454 ♂	8455 ♂	8456 ♂
Begingewicht	g. 36	g. 39	g. 37	g. 37	g. 33	g. 38	g. 43	g. 40	g. 46	g. 38
Eindgewicht na 16 dagen . . .	65	63	75	65	60	dood	83	75	95	79
Röntgendiagnose na 16 dagen	-	-	-	-	-	"	-	-	-	-

5. Groep met preparaat uit tonijnentraan.
(per rat per dag 0.09 γ preparaat uit tonijnentraan).

Nr. Geslacht	8457 ♀	8458 ♀	8459 ♀	8460 ♀	8461 ♀	8462 ♂	8463 ♂	8464 ♂	8465 ♂	8466 ♂
Begingewicht	g. 35	g. 40	g. 39	g. 35	g. 38	g. 34	g. 39	g. 43	g. 40	g. 41
Eindgewicht na 16 dagen . .	90	72	79	62	70	61	66	77	82	71
Röntgendiagnose na 16 dagen	?	—	—	mislukt	—	—	—	—	—	—

Zoals bij beschouwing uit bovenstaande tabel blijkt, bedraagt de minimum hoeveelheid van het preparaat van Ender uit tonijnentraan, noodig om onder onze proefomstandigheden de rat tegen rachitis te beschutten, ongeveer 0.07 γ per rat per dag.

2. Nadat nu in de rattenijkproef de sterkte van het preparaat uit tonijnentraan was bepaald konden wij tot de kuikenproef overgaan. Ook dit maal werden eendagskuikens gebruikt van het witte Leghorn ras, afkomstig van hetzelfde bedrijf als de vorige reeksen. Daar de overjarige dieren onvoldoende eieren legden werden dit maal eieren van verwante dieren van den eersten leg, als broedeieren gebruikt. De broedresultaten waren evenwel teleurstellend, terwijl ook de vitaliteit der eendagskuikens veel minder was dan gewoonlijk. Dit kwam reeds tot uiting in het begingewicht der diertjes, dat bij het meerendeel der kuikens tusschen de 25 tot 30 g. gelegen was. Bij gebrek aan betere proefdieren werd besloten het onderzoek met deze dieren voort te zetten. Het doel van deze reeks was na te gaan, of van dit sterk geconcentreerde antirachitische preparaat uit tonijnentraan, een hoeveelheid in ratteneenheden equivalent met 2% levertraan voldoende was om kuikens op het beschreven rachitogene grondrantsoen tegen rachitis te beschutten. Daar de minimumhoeveelheid van dit sterke concentraat uit tonijnentraan, noodig om de rat tegen rachitis te beschutten, niet veel onderdoet voor het kristallijne bestraalde ergosterol, zouden bij een eventueel verschil in werking van deze twee producten bij kuikens, eveneens conclusies kunnen worden getrokken ten aanzien van de identiteit van deze twee antirachitisch werkzame stoffen.

Evenals in de vorige proevenreeksen werden de kuikens direct na ontvangst over de verschillende groepen verdeeld. De proefduur van deze reeks werd wederom vastgesteld op

8 weken; daarna werden de spronggewrichten van de dieren geröntgend, de kuikens gedood, de skeletten vrij geprepareerd en de tibiae verascht. De groepenindeeling was in deze reeks als volgt. Groep I was de contrôle-groep; zij ontving het gebruikelijke grondrantsoen, waar doorheen 2% grondnotenolie met carotine was gemengd; Groep II was de levertraan-groep, die 2% levertraan door het grondrantsoen ontving; Groep III was de groep, die in het grondrantsoen het door Ender uit tonijnentraan bereide preparaat 118 a ontving, opgelost in 2% grondnotenolie met carotine en wel in een zoodanige doseering, dat het aantal ratteneenheden vitamine D dat werd toegediend equivalent was met 2% levertraan; Groep IV kreeg eveneens dit preparaat uit tonijnentraan opgelost in 2% grondnotenolie met carotine, maar thans in een hoeveelheid die in ratteneenheden vitamine D equivalent was met 6% levertraan. Het verloop van de proef was, wat betreft de groepen I en II, zeer ongunstig. Dit moet worden toegeschreven aan de geringe vitaliteit van de dieren, hetgeen, behalve in het lage geboortegewicht, tot uiting kwam in de groote sterfte op den tweeden levensdag. Van de 10 dieren uit groep I stierven er binnen twee dagen 5, terwijl in groep II zelfs 7 van de 10 dieren binnen twee dagen gestorven waren. Deze beide groepen waren hiermede uitgeschakeld, hetgeen aan de resultaten van de derde en vierde groep niets afdoet. Deze groepen verliepen werkelijk fortuinlijk. Zoo stierven in de derde groep van de 18 dieren slechts een tweetal binnen twee dagen, hetgeen in de vierde groep eveneens het geval was. Ook tijdens den verderen proefduur was de sterfte in deze beide groepen gering, zoodat aan het einde van de proevenreeks in beide groepen nog voldoende dieren over waren om een conclusie te kunnen trekken. Voor de post-mortem beoordeeling van het skelet kwamen evenals in de vorige proevenreeksen alle kuikens in aanmerking, die na den 17den dag nog in leven waren; voor de röntgendiagnose, alsook voor de aschbepaling in de tibiae werden alleen die kuikens gebruikt, die aan het einde van de proef, dus op den 57sten dag, nog in leven waren. Wat den groei der kuikens betreft, hierover valt slechts weinig mede te deelen; indien men bedenkt, dat het begingewicht der kuikens aanzienlijk lager was dan in de vorige proevenreeksen, is de procentische toename in deze proevenreeks eerder grooter dan kleiner. Wel

viel ook hier wederom waar te nemen, dat de gewichten in de contrôle-groep lager waren dan in de overige proefgroepen. De berekening van het gemiddelde gewicht aan het einde van de proef gaf aan voor de derde groep 320 ± 45 g. en in de vierde groep 326 ± 57 g., hetgeen volkomen gelijk is. Het aantal dieren in de eerste en de tweede groep, dat aan het einde van de proef nog leefde, was te klein om hiervan het gemiddelde gewicht te berekenen. De resultaten van het post-mortem onderzoek, alsmede van de röntgendiagnose in de tibiae zijn in tabel 12 samengevat.

TABEL 12.

1. Contrôle-groep.

(Grondrantsoen met 2% grondnotenolie met carotine).

Kuiken-nummer	Geslacht	Leeftijd dg.	Post-mortem onderzoek skelet	Röntgen-diagnose	Aschgehalte tibiae %
153	♂	29	rozenkrans beide zijden		
156	♀	31			
154	♀	57	eenzijdige rozenkrans	+	31.0
155	♀	57	rozenkrans beide zijden	+	30.9
158	♀	57	" " "	+	33.1

2. Levertraan-groep.

(Grondrantsoen met 2% levertraan).

Kuiken-nummer	Geslacht	Leeftijd dg.	Post-mortem onderzoek skelet	Röntgen-diagnose	Aschgehalte tibiae %
170	♂	25	normaal	—	
163	♀	57	"	—	38.8
168	♀	57	"	—	43.5

3. Groep met preparaat uit tonijnentraan.

(Grondrantsoen met 2% grondnotenolie met carotine, waarin het preparaat uit tonijnentraan in ratteneenheden vitamine D equivalent met 2% levertraan).

Kuiken-nummer	Geslacht	Leeftijd dg.	Post-mortem onderzoek skelet	Röntgen-diagnose	Aschgehalte tibiae %
173	♂	17	normaal		
175		17	"		
171		57	"	—	36.0
172		57	"	"	40.0
174		57	"	"	37.8
176		57	"	"	41.2
177		57	"	"	39.9
178		57	"	"	40.3
179		57	"	"	36.4
180		57	"	"	36.7
181		57	"	"	33.9
183		57	"	"	44.0
184	57	"	"	37.1	
187	57	"	"	39.8	
188	57	"	"	38.8	

4. Groep met preparaat uit tonijnentraan.

(Grondrantsoen met 2% grondnotenolie met carotine, waarin het preparaat uit tonijnentraan in ratteneenheden vitamine D equivalent met 6% levertraan).

Kuiken-nummer	Geslacht	Leeftijd dg.	Post-mortem onderzoek skelet	Röntgen-diagnose	Aschgehalte tibiae %
191	♂	42	normaal		44.6
189		57	"	—	45.5
190		57	"	"	42.3
192		57	"	"	37.0
194		57	"	"	40.0
196		57	"	"	41.7
197		57	"	"	44.8
198		57	"	"	

Zoals reeds is opgemerkt valt uit deze proevenreeks ten aanzien van de resultaten in de eerste en tweede groep weinig te zeggen, daar het aantal dieren dat hier voor de beoordeling in aanmerking kwam, te klein was om een conclusie te rechtvaardigen. Toch zijn de verkregen resultaten bij de enkele overgebleven dieren volkomen in overeenstemming met die, welke met soortgelijke groepen in vorige proevenreeksen werden verkregen. Van veel meer belang zijn daarentegen de

uitkomsten van de groepen III en IV. Zooals immers uit tabel 12 blijkt, heeft het post-mortem onderzoek in de derde groep met 15 dieren aangetoond, dat het skelet bij allen normaal was; de röntgenfoto leidde tot een goed overeenstemmende conclusie al werd ook hier bij een tweetal dieren rachitis geconstateerd. Op grond van dit resultaat kan worden besloten, dat onder de beschreven proefvoorwaarden het preparaat uit tonijnentraan in een doseering, die in ratteneenheden vitamine D equivalent is met 2 % levertraan, in staat is rachitis bij kuikens te voorkomen. Geheel in overeenstemming met dit resultaat is ook de uitkomst in groep IV, waarbij zoowel het post-mortem onderzoek van het skelet, alsook de röntgenfoto aantoonde, dat alle dieren volkomen normaal waren. Uitdrukkelijk wordt de aandacht nog eens gevestigd op het feit, dat ook in de derde groep wederom bleek, dat de röntgenfoto somtijds een scherper criterium is dan de post-mortem beoordeeling van het skelet. Bij bepaling van de aschgehalten van de derde en de vierde groep werd gevonden respectievelijk $38.6 \pm 2.6 \%$ en $42.3 \pm 3 \%$; voor de eerste en tweede groep werden deze gemiddelden niet bepaald. Niettegenstaande de sterfte in de eerste en tweede groep was het proefverloop vooral voor de zoo belangrijke groepen III en IV gunstig te noemen. Duidelijk is hieruit gebleken, dat een hoeveelheid van het preparaat uit tonijnentraan opgelost in 2 % grondnotenolie en in sterkte overeenkomende met het aantal ratteneenheden van 2 % levertraan, in staat is om kuikens, die onder de beschreven proefvoorwaarden werden gehouden, tegen rachitis te beschutten. Deze uitkomst is vooral van groot belang indien ze wordt vergeleken met die uit vorige proevenreeksen, waarbij kwam vast te staan, dat een hoeveelheid calciferol in ratteneenheden vitamine D equivalent met 20 % levertraan, nog niet in staat was kuikens tegen rachitis te beschutten. In dit verband moet niet uit het oog worden verloren, dat de minimale dosis calciferol en die van het preparaat uit tonijnentraan, noodig om de rat tegen rachitis te beschutten, weinig van elkander verschillen, zoodat het zeer onwaarschijnlijk is om aan te nemen dat in het preparaat uit tonijnentraan nog een andere factor zou voorkomen, die dit betere effect bij kuikens zou veroorzaken.

De resultaten van deze proevenreeks kunnen het beste in de volgende conclusie worden samengevat.

Tusschen kabeljauwlevertraan en het door Ender uit tonijntraan verkregen preparaat kon, in proeven op ratten en kuikens, geen verschil worden aangetoond.

Vijfde Proevenreeks. Nu uit de derde en vierde proevenreeks was komen vast te staan, dat het bestraalde ergosterol niet identiek is met het antirachitische vitamine uit levertraan, kon hiermede het onderzoek als beëindigd worden beschouwd. Het leek evenwel gewenscht ook eens na te gaan in hoeverre de door Waddel (1934) gevonden waarneming, dat namelijk het bestraalde cholesterol wel in staat was kuiken-rachitis te voorkomen, kon worden bevestigd. Indien deze waarneming juist is, is hiermede tevens bewezen dat, het provitamine D, voorkomende in cholesterol dat niet via het dibromide was gezuiverd, in géén geval het ergosterol kon zijn. Ons bezwaar tegen het onderzoek van Waddel was voornamelijk hierin gelegen, dat hij als criterium voor het vergelijken van de antirachitische werkzaamheid van levertraan, bestraald ergosterol en bestraald cholesterol, uitsluitend gebruik maakt van het aschgehalte in de tibiae. Ook leek ons, de door hem gevolgde methode voor het bereiden van het bestraalde cholesterol niet voldoende zekerheid te geven voor een gelijkmatige bestraling. Daarom werd besloten in deze proevenreeks een groep op te nemen, waarbij de werking van het bestraalde cholesterol zou worden bestudeerd. Een schema voor de bereiding van een bestraald cholesterol-preparaat werd daartoe uitgewerkt. Daar de tijd van voorbereiding voor deze proef slechts kort was, bleek het ons persoonlijk onmogelijk tijdig klaar te komen met de bereiding van zulk een bestraald cholesterol-preparaat. De heeren Dr H. G. K. Westenbrink en J. G. Brienne werden evenwel bereid gevonden, het vervaardigen van dit bestraalde cholesterol op zich te nemen, waarvoor wij hen hier nog eens vriendelijk dankzeggen. Bij de bereiding werd uitgegaan van in den handel gekocht cholesterol, dat in een 3% oplossing in ethylacetaat werd bestraald. Als bestralingsbron werd hiervoor gebruikt een Philips ultrasol lamp, die zooals bekend, bijna uitsluitend de stralen van een zeer gunstige golflengte levert. De veranderingen die tijdens deze bestraling met het ultravioletlicht optraden, werden aan de hand van de veranderingen in het spectrum gevolgd. De bestraling werd zoo

lang voortgezet, totdat de absorptieband bij 280 m μ zoo goed als geheel was verdwenen. Daarna werd getracht het onveranderde cholesterol uit de oplossing te verwijderen. Dit geschiedde door indampen, afkoelen en tenslotte door behandeling met digitonine. Van het aldus verkregen bestralingsproduct werd een oplossing in grondnotenolie gemaakt.

1. Alvorens dit bestraalde cholesterol-preparaat in de kuikenproeven te gebruiken werd het eerst met behulp van ratten op zijn antirachitische werkzaamheid onderzocht, waarbij de minimumdosis werd bepaald die noodig is, om ratten op het beschreven rachitogene dieet, tegen rachitis te beschutten. Daar wij over de antirachitische werkzaamheid van dit preparaat geen enkele aanwijzing hadden, werden verschillende doseeringen beproefd, waartoe voor elke doseering een groep van 8 ratten werd gevormd. Evenals in de vorige ijkproeven werd ook ditmaal het preparaat driemaal per week per pipet toegediend en wel opgelost in 0.1 cc grondnotenolie met carotine. De indeeling van deze ijkproef was als volgt. Groep I was de contrôle-groep, die naast het grondrantsoen driemaal per week per pipet een hoeveelheid grondnotenolie met carotine ontving te beginnen op den derden dag; Groep II, Groep III, Groep IV, Groep V, Groep VI en Groep VII ontvingen naast het grondrantsoen driemaal per week een zelfde hoeveelheid grondnotenolie met carotine als groep I, maar waarin ditmaal een hoeveelheid van het bestraalde cholesterol-preparaat was opgelost, overeenkomende met respectievelijk 0.3 γ per rat per dag, 1 γ per rat per dag, 3 γ per rat per dag, 5 γ per rat per dag, 7 γ per rat per dag en 10 γ per rat per dag. Ofschoon nog meer doseeringen werden beproefd, die zoowel grooter als kleiner waren dan de hiervoor aangegeven uitersten, kunnen deze bij de beoordeeling buiten beschouwing worden gelaten. Den zestienden dag werden de kniegewrichten van de rechterachterpooten bij alle dieren geröntgend en het resultaat beoordeeld. Hierbij bleek, dat de dieren uit de contrôle-groep allen zonder uitzondering rachitis hadden. Dit zelfde was ook het geval met Groep II, waarvan de dieren per rat per dag 0.3 γ bestraald cholesterol-preparaat hadden ontvangen. Van de 8 dieren uit Groep III, die 1 γ bestraald cholesterol-preparaat per rat per dag ontvingen, bleken zes van de acht dieren rachitis te hebben, terwijl er twee normaal waren; Groep IV,

waarbij de dieren 3 γ bestraald cholesterol-preparaat per rat per dag ontvingen, had 5 normale en 2 rachitische dieren, terwijl de ratten uit de Groepen V, VI en VII allen normaal waren.

De resultaten van deze ijkproef zijn in tabel 13 weergegeven.

TABEL 13.

1. Contrôle-groep.

Nr. Geslacht	8901 ♂	8902 ♀	8903 ♀	8904 ♀	8905 ♀	8906 ♂	8907 ♂	8908 ♂
Begingewicht	g. 33	g. 43	g. 32	g. 44	g. 32	g. 42	g. 43	g. 30
Eindgewicht na 16 dagen . . .	61	77	dood	71	40	73	75	64
Röntgendiagnose na 16 dagen	+	+	"	+	+	+	+	+

2. Bestraald cholesterol-preparaat.

(per rat per dag 0.3 γ bestraald cholesterol-preparaat).

Nr. Geslacht	8909 ♀	8910 ♀	8911 ♀	8912 ♀	8913 ♀	8914 ♂	8915 ♂	8916 ♂
Begingewicht	g. 42	g. 45	g. 45	g. 38	g. 32	g. 41	g. 44	g. 50
Eindgewicht na 16 dagen . . .	75	85	89	79	56	78	73	85
Röntgendiagnose na 16 dagen	+	+	+	+	+	+	+	+

3. Bestraald cholesterol-preparaat.

(per rat per dag 1 γ bestraald cholesterol-preparaat).

Nr. Geslacht	8917 ♀	8918 ♀	8919 ♀	8920 ♀	8921 ♂	8922 ♀	8923 ♂	8924 ♂
Begingewicht	g. 42	g. 39	g. 42	g. 40	g. 42	g. 46	g. 40	g. 40
Eindgewicht na 16 dagen . . .	72	73	81	66	68	90	68	75
Röntgendiagnose na 16 dagen	+	+	-	+	-	+	+	+

4. Bestraald cholesterol-preparaat.

(per rat per dag 3 γ bestraald cholesterol-preparaat).

Nr. Geslacht	8925 ♀	8926 ♀	8927 ♀	8928 ♀	8929 ♀	8930 ♂	8931 ♂	8932 ♀
Begingewicht	g. 38	g. 38	g. 47	g. 45	g. 42	g. 35	g. 32	g. 38
Eindgewicht na 16 dagen . . .	55	dood	76	70	65	58	54	76
Röntgendiagnose na 16 dagen	-	"	+	+	-	-	-	-

5. Bestraald cholesterol-preparaat.
(per rat per dag 5 γ bestraald cholesterol-preparaat).

Nr. Geslacht	9071 ♀	9072 ♀	9073 ♀	9074 ♀	9075 ♂	9076 ♂	9077 ♂	9078 ♂
Begingewicht	g. 37	g. 43	g. 44	g. 34	g. 35	g. 30	g. 33	g. 36
Eindgewicht na 16 dagen . . .	61	79	73	54	55	55	68	61
Röntgendiagnose na 16 dagen	—	—	—	—	—	—	—	—

6. Bestraald cholesterol-preparaat.
(per rat per dag 7 γ bestraald cholesterol-preparaat).

Nr. Geslacht	9079 ♀	9080 ♀	9081 ♀	9082 ♀	9083 ♂	9084 ♂	9085 ♂	9086 ♂
Begingewicht	g. 32	g. 31	g. 33	g. 32	g. 39	g. 30	g. 36	g. 42
Eindgewicht na 16 dagen . . .	53	51	40	38	82	52	52	98
Röntgendiagnose na 16 dagen	—	—	—	—	—	—	—	—

7. Bestraald cholesterol-preparaat.
(per rat per dag 10 γ bestraald cholesterol-preparaat).

Nr. Geslacht	8933 ♂	8934 ♀	8935 ♂	8936 ♀	8937 ♀	8938 ♀	8939 ♀	8940 ♀
Begingewicht	g. 45	g. 37	g. 48	g. 35	g. 49	g. 40	g. 27	g. 31
Eindgewicht na 16 dagen . . .	65	67	86	dood	85	65	55	60
Röntgendiagnose na 16 dagen	—	—	—	„	—	—	—	—

Hieruit blijkt dus duidelijk, dat de minimale dosis van het bestraalde cholesterol-preparaat, dat noodig is om ratten op het beschreven rachitogene dieet tegen rachitis te beschutten, bij 5 γ per rat per dag gelegen is.

2. Nadat de antirachitische werkzaamheid van het bestraalde cholesterol-preparaat in de ijkproef met ratten was vastgesteld, kon tot de hoofdproef met kuikens worden overgegaan. Zoals gezegd was het de bedoeling om in één der groepen de werking van het bestraalde cholesterol-preparaat bij kuikens te beproeven, terwijl in de andere groepen de verschillende vitamine D bronnen nog eens met elkander zouden worden vergeleken. Als proefdieren werden evenals gewoonlijk

eendagskuikens van het witte Leghornras gebruikt, die afkomstig waren van hetzelfde bedrijf als in de vorige proevenreeksen. Daar dit de laatste serie proeven was van dit onderzoek bestond aanvankelijk het plan met series van 30 dieren per groep te werken. Hiervan is evenwel niets gekomen, daar ook dit maal een groot deel van de kuikens vòòr den derden levensdag stierven, zoodat op den vierden proefdag een nieuwe indeeling in kleinere groepen moest plaats vinden. Ook ditmaal ontvingen de kuikens wederom het reeds herhaalde malen genoemde rachitogene grondrantsoen, waar doorheen de verschillende preparaten waren gemengd. De indeeling van deze proevenreeksen was als volgt.

Groep I was de contròle-groep; ze bestond uit 10 kuikens die het grondrantsoen ontvingen, waardoor 2 % grondnotenolie met carotine was gemengd. Groep II was de levertraan-groep; ze bestond uit 15 kuikens die 2 % levertraan in het grondrantsoen ontvingen. Groep III was de calciferol-groep, waarvan de kuikens 2 % grondnotenolie met carotine in het grondrantsoen ontvingen, waarin was opgelost een hoeveelheid calciferol, die in ratteneenheden vitamine D equivalent was met 2 % levertraan; de groep telde bij den aanvang van de proef 15 kuikens. Groep IV bestond uit 20 kuikens; ze ontvingen het grondrantsoen met 2 % grondnotenolie met carotine, waarin opgelost een hoeveelheid preparaat uit tonijnentraan, die in ratteneenheden vitamine D equivalent was met 2 % levertraan. Groep V ontving wederom hetzelfde grondrantsoen, eveneens met 2 % grondnotenolie met carotine, waarin ditmaal was opgelost een hoeveelheid van het bestraalde cholesterol-preparaat, waarvan het aantal ratteneenheden vitamine D wederom equivalent was met 2 % levertraan. Deze groep telde bij den aanvang van de proef 23 dieren. De duur van deze proevenreeks was zooals gewoonlijk op 8 weken gesteld. Van de aan het einde van de proef overgebleven dieren zou met behulp van de röntgenfoto van het kniegewricht worden nagegaan of de dieren al dan geen rachitis hadden; tevens zou van deze dieren het aschgehalte in de tibiae worden bepaald. Daarnaast zou het post-mortem onderzoek van het skelet worden uitgevoerd. Hiervoor kwamen alle dieren in aanmerking die na den 17den proefdag stierven, alsook die kuikens die aan het einde van de proef werden gedood. Het verloop van de proef was vrij gunstig,

afgezien dan van de sterfte die in de eerste drie dagen voorkwam en den vierden proefdag een nieuwe verdeling van de kuikens over de groepen noodzakelijk maakte. Ook gedurende het verdere verloop kwam nog sterfte voor; in de contrôle-groep die geen vitamine D in het grondrantsoen ontving, stierven in de periode van den 17den tot den 57sten dag 8 van de 10 proefkuikens. Dit is evenwel een gewoon verschijnsel, indien men hierbij bedenkt dat de dieren zeer zware rachitis hadden, niet meer groeiden en tenslotte aan uitputting ten gronde gingen. In de levertraan-groep stierven in diezelfde periode slechts 2 kuikens, terwijl in de calciferol-groep een zevental dieren, eveneens lijdende aan zeer zware rachitis, dood gingen. De dieren uit de groep, welke het preparaat uit tonijnentraan ontving, brachten het er zeer gunstig af, zonder eenig sterfgeval; van de dieren uit de groep die het cholesterol-preparaat ontvingen en die zooals blijken zal geen rachitis hadden, stierven 6 van de 23 kuikens. Wordt ook hier wederom met het zeer lage geboortegewicht rekening gehouden, dan kan ten aanzien van den groei worden gezegd, dat deze weliswaar niet best, maar toch bevredigend was. Wel liepen de gewichten van de kuikens onderling in de verschillende groepen nogal uiteen, zooals uit de hieronder gegeven gemiddelden blijkt. Voor de dieren uit groep I werd vanwege het geringe aantal kuikens het gemiddelde niet bepaald; in groep II bedroeg het 224 ± 61 g.; in groep III 242 ± 44 g.; in groep IV 300 ± 38 g.; in groep V 294 ± 47 g. Over het uitwendig voorkomen van de dieren valt op te merken, dat de kuikens in de groepen I en III klinisch duidelijk rachitis vertoonden, terwijl de dieren uit de overige groepen er normaal uitzagen. In het bijzonder geldt dit ook voor de dieren uit groep IV, die op het oog den besten indruk maakten.

Over de post-mortem beoordeeling in de verschillende groepen alsmede over de resultaten van de röntgenfoto kan worden medegedeeld, dat deze wat betreft groep I, volkomen in overeenstemming waren met vroegere waarnemingen. Zoowel de post-mortem beoordeeling alsook de röntgendiagnose toonden duidelijk aan dat alle onderzochte dieren uit groep I zware rachitis hadden. Het gemiddelde aschgehalte werd vanwege het geringe aantal dieren, dat aan het einde van de proef was overgebleven, niet berekend. Ook in de tweede groep beantwoordde

het resultaat geheel en al aan de verwachtingen en waren de uitkomsten van de post-mortem beoordeeling van het skelet en die welke met de röntgenfoto werden verkregen, volkomen met elkander in overeenstemming. Geen der dieren uit groep II vertoonden eenige afwijking die op rachitis geelk. Het gemiddelde aschgehalte in deze groep werd wel berekend en bedroeg $38.8 \pm 3.3\%$. De uitkomst van groep III, of wel de calciferol-groep, was ook een bevestiging van de reeds in vorige reeksen vastgestelde waarneming, waarbij zoowel de post-mortem beoordeeling van het skelet en de röntgendiagnose duidelijk aantoonde dat geen enkel der beoordeelde dieren normaal was, maar dat allen zonder uitzondering zware rachitis hadden. Het gemiddelde aschgehalte in de tibiae dat ook voor deze groep werd berekend bedroeg $31.0 \pm 3.4\%$. Niet in overeenstemming met de verwachtingen waren de resultaten in groep IV. In de vierde proevenreeks was gevonden dat het preparaat uit tonijnentraan in een hoeveelheid die in ratteneenheden vitamine D equivalent was met 2% levertraan in staat was om de kuikens op ons rachitogene dieet tegen rachitis te beschutten.

Deze uitkomst was zoowel met behulp van de post-mortem beoordeeling van het skelet, als met behulp van de röntgendiagnose vastgesteld.

Dit maal was het echter anders. Van de 19 dieren die in deze groep werden onderzocht, bleken bij de post-mortem beoordeeling van het skelet 17 dieren volkomen normaal te zijn, terwijl slechts een tweetal dieren duidelijk rachitis vertoonden. Het resultaat op de röntgenfoto was evenwel geheel anders; hier bleken slechts een viertal dieren normaal te zijn. Dertien dieren uit deze groep vertoonden in meer of mindere mate rachitis, terwijl een tweetal twijfelgevallen voorkwamen. Ook het aschgehalte bleek lager te zijn dan in de overeenkomstige groep uit de vorige proevenreeks; het bedroeg gemiddeld $34.7 \pm 1.9\%$. Naar onze meening moet dit verschil in uitkomst bij de post-mortem beoordeeling van het skelet en de röntgenfoto aldus worden verklaard, dat zooals reeds terloops werd opgemerkt, de röntgenfoto somtijds een selectiever criterium is dan de post-mortem beoordeeling van het skelet. Dit geldt vooral wanneer men met grensgevallen te doen heeft. Nu is het heel goed mogelijk, dat de doseering van het preparaat uit tonijnentraan juist de grensdosis is geweest en dat de dieren uit deze groep, die inderdaad

sneller gegroeid zijn dan de kuikens uit de andere groepen, nog precies een tekort aan vitamine D hebben gehad. Dit tekort was niet groot genoeg om de veranderingen aan het skelet te doen ontstaan, maar nog wel, om kleine verschillen in de röntgenfoto tot uiting te doen komen. Ofschoon dus een volledige bevestiging in groep IV met de overeenkomstige groep uit de vorige reeks hier niet werd verkregen, kan toch de conclusie uit de vorige reeks worden gehandhaafd, temeer daar hier de uitkomsten bij de twee criteria verschillen. Dit bewijst, gezien de goede overeenstemming die in het algemeen tusschen beide criteria bestond, dat het hier een grensgeval betrof. Het is niet onmogelijk, dat het preparaat bij het bewaren in den ijskast of ook bij het oplossen een geringe verandering heeft ondergaan, waardoor de antirachitische werkzaamheid is teruggegaan. Ook zou het mogelijk kunnen zijn, dat de behoefte van de dieren aan vitamine D in dezen tijd anders is, dan toen het preparaat uit tonijntraan op ratten werd geijkt. Uit proeven van Bourdillon c.s. (1931) is gebleken dat de behoefte aan vitamine D bij ratten het geheele jaar door niet gelijk blijft; dit laatste kon Dr M. de Bruin, in zijn nog niet gepubliceerde onderzoekingen aan het Physiologisch Chemisch Laboratorium te Amsterdam, bevestigen.

Een nieuwe ijkproef met ratten, waarbij het preparaat uit tonijntraan per pipet werd toegediend, alsook de ijking van het voeder waardoor dit preparaat was vermengd, bevestigde inderdaad het uitgesproken vermoeden, dat of wel de werkzaamheid was verminderd, of wel de behoefte der ratten aan vitamine D was verhoogd.

Van zeer groot belang was de uitkomst in groep V, waarvan de dieren het bestraalde cholesterol-preparaat in hun grondrantsoen ontvingen. Zoowel de uitkomst bij de post-mortem beoordeeling van het skelet, alsook die van de röntgenfoto, waren wederom volkomen met elkander in overeenstemming. Ze toonden aan, dat alle dieren volkomen normaal waren, waarmee dus de antirachitische werkzaamheid van het bestraalde cholesterol-preparaat bij kuikens is bewezen. Het gemiddelde aschgehalte lag in deze groep iets hoger dan wij gewoonlijk in de levertraan-groep vonden; het bedroeg $40.7 \pm 2.6\%$.

Voor de volledige gegevens van deze proevenreeks wordt verwezen naar tabel no. 14.

TABEL 14.

1. Contrôle-groep.

(Grondrantsoen met 2% grondnotenolie met carotine).

Kuiken-nummer	Geslacht	Leeftijd dg.	Post-mortem onderzoek skelet	Röntgen-diagnose	Aschgehalte tibiae %
217	♂	18	rozenkrans beide zijden	+	31.9
223		20	" " "		
231		23	" " "		
206		32	" " "		
223		32	" " "		
210		38	" " "		
229		38	" " "		
230		43	" " "		
215		57	" " "		
224		57	" " "		

2. Levertraan-groep.

(Grondrantsoen met 2% levertraan).

Kuiken-nummer	Geslacht	Leeftijd dg.	Post-mortem onderzoek skelet	Röntgen-diagnose	Aschgehalte tibiae %
251	♂	32	normaal	—	35.3
252		37	"		
219		37	"		
233		57	"		
234		57	twijfelachtige rozenkrans		
235		57	normaal		
236		57	"		
238		57	"		
245		57	"		
246		57	"		
248		57	"		
253		57	"		
256		57	"		
257		57	"		
260		57	"		

3. Calciferol-groep.

(Grondrantsoen met 2% grondnotenolie met carotine waarin calciferol in ratteneenheden vitamine D equivalent met 2% levertraan).

Kuiken-nummer	Geslacht	Leeftijd dg.	Post-mortem onderzoek skelet	Röntgen-diagnose	Aschgehalte tibiae%
309		21	normaal		
390		21	rozenkrans beide zijden		
265		32	" " "		
278		32	" " "		
271		45	" " "		
289		45	" " "		
293		49	" " "		
240		57	" " "	+	29.8
269		57	" " "	+	27.7
272		57	" " "	+	28.0
285		57	normaal	+	36.8
302		57	rozenkrans beide zijden	+	29.9
307		57	" " "	+	34.4
324		57	" " "	+	30.8

4. Groep met preparaat uit tonijentraan.

(Grondrantsoen met 2% grondnotenolie met carotine, waarin preparaat uit tonijentraan in ratteneenheden vitamine D equivalent met 2% levertraan).

Kuiken-nummer	Geslacht	Leeftijd dg.	Post-mortem onderzoek skelet	Röntgen-diagnose	Aschgehalte tibiae%
241		57	normaal	+	35.2
243		57	"	+	
244		57	"	+	34.1
250		57	"	+	34.6
254		57	"	+	33.6
255		57	eenzijdige rozenkrans	+	33.0
287		57	normaal	+	32.7
288		57	"	+	34.5
292		57	eenzijdige rozenkrans	+	30.9
295		57	normaal	+	32.3
303		57	"	+	35.0
312		57	"	+	35.3
314		57	"	+	37.4
318		57	"	+	35.1
319		57	"	+	36.6
320		57	"	+	37.0
321		57	"	+	33.5
322		57	"	+	34.9
337		57	"	+	38.8

5. Groep met bestraald cholesterol-preparaat.

(Grondrantsoen met 2% grondnotenolie met carotine en een bestraald cholesterol-preparaat in ratteneenheden vitamine D equivalent met 2% levertraan).

Kuiken- nummer	Geslacht	Leeftijd dg.	Post-mortem onderzoek skelet	Röntgen- diagnose	Aschgehalte tibiae %
283		32	normaal		
209		37	"		
208		38	"		
221		39	"		
226		43	"		
220		54	"		
207	O ₁ +O ₂ +O ₃ +O ₄ +O ₅ +O ₆ +O ₇ +O ₈ +O ₉ +O ₁₀ +O ₁₁ +O ₁₂ +O ₁₃ +O ₁₄ +O ₁₅	57	"	—	37.3
211		57	"	—	39.9
212		57	"	—	41.8
213		57	"	—	44.9
214		57	"	—	41.5
218		57	"	—	40.8
247		57	"	—	44.5
249		57	"	—	41.3
258		57	"	—	43.6
264		57	"	—	35.8
280		57	"	—	39.8
306		57	"	—	39.6
311		57	"	—	38.9

Wanneer de uitkomsten die in deze proef werden verkregen nog eens nader worden gezien, dan blijkt in de eerste plaats, dat zij een volkomen bevestiging zijn van de resultaten, die in vorige proevenreeksen werden verkregen. Ook kon in deze proevenreeks de waarneming van Waddel worden bevestigd, dat het bestraalde cholesterol in staat is om kuikens op een rachitogeen grondrantsoen gehouden, tegen rachitis te beschutten. Indien derhalve de uitkomsten van de groepen III en V met elkander worden vergeleken, dan is de conclusie gerechtvaardigd, dat het in cholesterol voorkomende pro-vitamine D in geen geval identiek kan zijn met ergosterol. De in cholesterol voorkomende onzuiverheid, die door bestraling met ultraviolet licht in een antirachitisch werkzame stof wordt omgezet, moet derhalve een andere stof zijn dan ergosterol. De vraag of deze antirachitische stof identiek is met het vitamine D uit levertraan, alsook de vraag of het antirachitische vitamine uit tonijnentraan identiek is met het vitamine D uit kabeljauwlevertraan is hiermede niet beantwoord. Daartegenover staat wel vast uit de resultaten van de proeven, dat zoowel 2% levertraan, als het preparaat uit tonijnentraan, alsook het

preparaat uit bestraald cholesterol, in een doseering waarvan het aantal ratteneenheden vitamine D equivalent is met 2% levertraan, in staat zijn om kuikens op ons grondrantsoen tegen rachitis te beschutten; van het bestraalde ergosterol-preparaat is een veel grooter aantal ratteneenheden vitamine D nodig om hetzelfde effect te bereiken.

Tegenover elkaar komen dus hier, wat betreft de antirachitische werking bij kuikens onder de beschreven proefvoorwaarden gehouden: eenerzijds de levertraan, het preparaat uit tonijntraan en het preparaat uit bestraald cholesterol, anderzijds het kristallijne bestraalde ergosterol.

Wanneer de resultaten die in deze vijfde proefserie werden verkregen in enkele conclusies worden samengevat, dan kan worden besloten:

1. Onder onze proefvoorwaarden is 2% levertraan voldoende om kuikens tegen rachitis te beschutten.

2. Een hoeveelheid bestraald ergosterol in ratteneenheden vitamine D equivalent met 2% levertraan, is niet in staat om kuikens onder onze proefvoorwaarden tegen rachitis te beschutten.

3. Een hoeveelheid van het preparaat uit tonijntraan, als ook een hoeveelheid van een bestraald cholesterol-preparaat, beiden in ratteneenheden vitamine D equivalent met 2% levertraan, zijn voldoende om kuikens onder onze proefvoorwaarden tegen rachitis te beschutten.

Weliswaar bestond in deze reeks geen overeenstemming, wat betreft het preparaat uit tonijntraan, tusschen het post-mortem onderzoek van het skelet en de röntgenfoto als criterium voor rachitis. Een nieuwe ijkproef met ratten toonde aan, dat de werkzaamheid van het preparaat uit tonijntraan was teruggelopen.

4. De door bestraling van ergosterol verkregen antirachitisch werkzame stof is niet identiek met het vitamine D uit levertraan.

5. Het in cholesterol voorkomende pro-vitamine D, dat door bestraling met ultraviolet licht wordt geactiveerd, is geen ergosterol.

6. Voor de beoordeeling van rachitis bij kuikens blijkt de röntgenfoto somtijds een scherper criterium, dan de post-mortem beoordeeling van het skelet.

SAMENVATTING.

Uit de publicaties van Mussehl en Ackerson (1930), Massengale en Nussmeier (1930), Hess en Supplee (1930), Steenbock, Kletzien en Halpin (1932), King, Hull en Hall (1933), Bethke, Record en Kennard (1933) en van Ubbels (1933), was gebleken, dat in den vorm van bestraald ergosterol veel meer ratteneenheden vitamine D noodig zijn om bij kuikens een goede beenontwikkeling te waarborgen, dan in den vorm van levertraan. Het leek ons echter toe, dat bij al deze proeven niet alle voorzorgen waren genomen, die noodig zijn om de resultaten absoluut overtuigend te maken. Ook meenen wij, dat het door alle Amerikaansche onderzoekers gebruikte criterium voor het vergelijken van de antirachitische werkzaamheid van de verschillende vitamine D bronnen, met name het aschgehalte van de tibiae, een minder goed criterium is, daar uit de literatuur tal van factoren bekend zijn, die van invloed zijn op dit aschgehalte. Alleen in het onderzoek van Ubbels werd ook de röntgenfoto gebruikt voor het nagaan van de antirachitische werking van levertraan en bestraald ergosterol. De tot nu toe door hem gepubliceerde gegevens zijn evenwel te onvolledig om een oordeel mogelijk te maken. Verder is door alle onderzoekers ook te weinig rekening gehouden met het feit, dat wanneer men twee verschillende producten bij twee verschillende diersoorten met elkander vergelijkt men dient te zorgen, dat de overige omstandigheden, die van invloed kunnen zijn, zoo gelijksoortig mogelijk worden gekozen. Zoo lijkt het ons zeer gewenscht dat de ratten in de ijkproeven precies hetzelfde voedsel krijgen, dus met dezelfde Ca/P verhouding en dezelfde absolute hoeveelheden Ca en P, als later ook aan de kuikens zal worden gegeven, terwijl het noodzakelijk is te zorgen, dat ook het vitamine A in die groepen, welke geen levertraan in hun rantsoen ontvangen, wordt aangevuld tot de hoeveelheid overeenkomt met het aantal ratteneenheden vitamine A dat in levertraan aanwezig is. In een vergelijkend onderzoek met ratten en kuikens, waarbij met de hiervoor genoemde bezwaren rekening werd gehouden, is getracht een zelfstandig oordeel te krijgen over dit probleem. De ratten en de kuikens ontvingen hetzelfde grondrantsoen, terwijl waar noodig het vitamine A in den vorm van carotine werd aangevuld. Het grondrantsoen

dat werd gebruikt bestond uit 144 deelen gele mais; 60 deelen tarwegries; 30 deelen ruwe caseïne; $3\frac{1}{2}$ deel gedroogde gist; 10 deelen calciumcarbonaat en $2\frac{1}{2}$ deel keukenzout. De Ca/P verhouding in dit rantsoen bedroeg 4.2, terwijl het percentage P 0.45 % was. Doordat gezorgd was, dat bij den aanvang van de proef voldoende grondstoffen in voorraad waren om alle proevenreeksen te kunnen uitvoeren, was het uitgesloten — afgezien van veranderingen door het bewaren van het voer — dat verschillen tengevolge van kleine veranderingen in de samenstelling van het rantsoen zouden optreden. Als proefdieren werden zooals gezegd ratten, met name albino's, gebruikt, terwijl de kuikens met uitzondering van de dieren uit de eerste proevenreeks, tot het witte Leghornras behoorden en allen afkomstig waren van hetzelfde bedrijf. De indeeling van de proevenreeks was zoo, dat aan de hoofdproef met kuikens steeds de ijkproeven met ratten vooraf gingen. In deze ijkproeven werd de antirachitische werkzaamheid van de in de bijbehorende proevenreeks met kuikens te gebruiken preparaten volgens de preventieve methode met ratten geijkt, waarbij de ratten hetzelfde grondrantsoen ontvingen als de kuikens in de hoofdgroep. De te onderzoeken preparaten werden aan de ratten per pipet in den mond toegediend, terwijl ze in de kuikenproeven door het rantsoen werden gemengd. Dit geschiedde zoo, dat minstens éénmaal per week voor iedere groep het voeder werd klaar gemaakt. Als criterium voor het vaststellen van rachitis bij ratten werd de röntgenfoto van het kniegewricht gebruikt. Voor het beoordeelen van de vraag of de kuikens al dan geen rachitis hadden, werd uit verschillende overwegingen geen gebruik gemaakt van het aschgehalte van de tibiae, zooals de Amerikaansche onderzoekers doen, ofschoon in de meeste gevallen het aschgehalte wel werd bepaald. Voor de vergelijking van de antirachitische werkzaamheid der verschillende preparaten bij kuikens werden in de eerste plaats de door Johnson (1925) en Doyle (1925) beschreven veranderingen aan het skelet gebruikt, en daarnaast de röntgenfoto van het spronggewricht. Voor deze post-mortem beoordeeling van het skelet kwamen alle kuikens in aanmerking die na den 17den proefdag stierven, alsook die kuikens welke aan het einde van de proef werden gedood. De röntgenfoto werd alleen gemaakt bij de kuikens die op den 57sten dag nog in leven

waren; ook het aschgehalte in de tibiae werd alleen bij deze dieren bepaald. In totaal werden behalve enkele oriënteringsproeven een vijftal proevenreeksen uitgewerkt, die elk uit verschillende groepen bestonden en waarvan de resultaten in tabel 15 werden opgenomen. De kuikens die hier werden gebruikt, waren als eendagskuikens terstond na ontvangst over de groepen verdeeld. Uit tabel 15 blijkt, dat de resultaten van de post-mortem beoordeeling van het skelet en de röntgendiagnose over het algemeen vrij goed met elkander in overeenstemming waren, met uitzondering van groep IV uit de vijfde proevenreeks. Toch bestond de indruk, dat de röntgenfoto somtijds iets scherpere aanwijzingen geeft dan het post-mortem onderzoek van het skelet. Het aschgehalte bleek geen goed criterium te zijn; weliswaar konden ook hier in de gemiddelde aschgehalten der groepen verschillen worden geconstateerd, maar deze bleken bij statistische verwerking der cijfers niet significant te zijn. Nadat in enkele oriënterende proeven met ratten en kuikens de bruikbaarheid van het beschreven grondrantsoen was gebleken, werd in de eerste proevenreeks nagegaan, of met onze methode van onderzoek de waarneming van de reeds genoemde onderzoekers kon worden bevestigd, die immers hadden gevonden, dat ter voorkoming van rachitis bij kuikens veel meer ratteneenheden vitamine D noodig zijn in den vorm van bestraald ergosterol dan in den vorm van levertraan. Hiertoe werden zes groepen gevormd, die — behalve de contrôle-groep — allen een zekere hoeveelheid ratteneenheden vitamine D in het voeder ontvingen en wel twee groepen in den vorm van levertraan en de drie resterende groepen in den vorm van bestraald ergosterol. De post-mortem beoordeeling van het skelet, die hier als enig criterium werd gebruikt, toonde duidelijk aan, dat ofschoon 2% levertraan onder onze proefvoorwaarden voldoende was om kuikens tegen rachitis te beschutten, een doseering calciferol in ratteneenheden vitamine D equivalent met 20% levertraan, hiervoor nog onvoldoende was. De waarneming van de in den aanhef van deze samenvatting genoemde onderzoekers was hiermede dus bevestigd.

Met deze uitkomst was evenwel niet bewezen, dat nu het bestraalde ergosterol niet identiek was met het vitamine D uit levertraan; het zou immers mogelijk kunnen zijn dat in lever-

traan een andere factor voorkwam, die bij kuikens, hetzij zelfstandig antirachitisch werkt, hetzij noodzakelijk is voor de werking van het vitamine D, maar die niet noodig zou zijn voor de rat.

Deze mogelijkheid werd in de tweede en derde proevenreeks uitvoerig bestudeerd. In beide reeksen werd nu niet alleen de post-mortem beoordeeling van het skelet als criterium gebruikt, maar eveneens de röntgenfoto van het spronggewricht, terwijl daarnaast ook het aschgehalte in de tibiae werd bepaald. Zoo werden in de tweede proevenreeks met elkaar vergeleken, de werking van 2 % levertraan, het verzeepbare en onverzeepbare deel van levertraan afzonderlijk en in onderlinge combinatie, alsook de werking van calciferol opgelost in het verzeepbare deel van levertraan. Als contrôle-groepen deden hier dienst een groep zonder vitamine D en een groep waarbij het calciferol, in ratteneenheden vitamine D equivalent met 2 % levertraan, in grondnotenolie opgelost werd toegediend.

Zooals uit tabel 15 blijkt, kwam uit deze proevenreeks vast te staan, dat zowel 2 % levertraan, alsook het onverzeepbare deel van levertraan in ratteneenheden vitamine D equivalent met 2 % levertraan, in staat was onder onze proefvoorwaarden de kuikens tegen rachitis te beschutten. Een hoeveelheid calciferol, opgelost in grondnotenolie en in ratteneenheden vitamine D equivalent met 2 % levertraan, bleek hiertoe niet in staat, hetgeen derhalve een bevestiging is van de resultaten uit de eerste proevenreeks. Werde daarentegen het calciferol opgelost in het verzeepbare deel van levertraan, dan werd een iets beter resultaat verkregen, dan wanneer het calciferol was opgelost in grondnotenolie. Deze betere werking moet echter worden toegeschreven aan de sporen vitamine D, die bij het verzeepen van de levertraan en bij de bereiding van de onverzeepbare fractie van de traan, in het verzeepbare restant zijn achtergebleven. De vraag in hoeverre deze veronderstelling juist was werd in de derde proevenreeks met een zestal groepen nog eens nader bestudeerd. De resultaten die hier werden gevonden rechtvaardigen ten volle de conclusie, dat er geen enkele aanwijzing bestaat dat levertraan in het verzeepbare deel een of andere factor bevat, die activeerend zou werken op het calciferol. Evenmin bestaat er eenige aanleiding in het verzeepbare deel een factor aan te nemen, die verschillen zou

TABEL 15.

Reeks	Groep	Preparaten gemengd door het grondraantsoen	Post-mortem onderzoek van het skelet		Röntgen-diagnose		Gemiddelde aschgehalte in de tibiae in %
			Aantal kuikens	Rachitische kuikens %	Aantal kuikens	Rachitische kuikens %	
I	1	2% grondnotenolie met carotine	10	100			
	2	1% grondnotenolie met carotine en 1% levertraan.	17	29			
	3	2% levertraan	17	6			
	4	2% grondnotenolie met carotine en calciferol = 2% levertraan	14	100			
	5	2% grondnotenolie met carotine en calciferol = 20% levertraan.	15	67			
	6	2% grondnotenolie met carotine en calciferol = 200% levertraan	16	6			
II	1	2% grondnotenolie met carotine	13	100	6	100	27.1 ± 2.0
	2	2% levertraan	14	7	14	7	40.0 ± 2.6
	3	2% grondnotenolie met carotine en calciferol = 80% levertraan.	12	8	11	0	40.5 ± 2.9
	4	2% grondnotenolie met carotine en onverzeepbaar deel van levertraan = 2% levertraan.	15	7	15	7	42.1 ± 2.7
	5	2% verzeepbaar deel van levertraan met carotine	15	67	15	67	38.3 ± 1.9
	6	2% verzeepbaar deel van levertraan en onverzeepbaar deel van levertraan = 2% levertraan.	13	8	13	0	43.0 ± 1.3
III	1	4% grondnotenolie met carotine	20	100	4	100	31.0 ± 2.4
	2	4% grondnotenolie met carotine en calciferol = 2% levertraan	19	100	14	100	28.1 ± 1.8
	3	0.25% levertraan en 3.75% grondnotenolie met carotine en calciferol = 2% levertraan.	19	74	17	100	31.4 ± 2.4
	4	4% verzeepbaar deel van levertraan en calciferol = 2% levertraan	18	78	15	93	29.7 ± 2.0
	5	4% verzeepbaar deel van levertraan en calciferol = 2% levertraan	14	71	12	91	33.8 ± 2.8
	6	2% verzeepbaar deel van levertraan en 2% grondnotenolie met carotine en calciferol = 4% levertraan	17	94	16	94	30.0 ± 2.3
IV	1	2% grondnotenolie met carotine	5	100	3	100	gem. niet berekend
	2	2% levertraan	3	0	2	0	" " "
	3	2% grondnotenolie met carotine en het preparaat uit tonijntraan = 2% levertraan	15	0	13	16	38.6 ± 2.6
	4	2% grondnotenolie met carotine en het preparaat uit tonijntraan = 6% levertraan.	8	0	7	0	42.3 ± 3.0
V	1	2% grondnotenolie met carotine	10	100	2	100	gem. niet berekend
	2	2% levertraan	15	6	13	0	38.8 ± 3.3
	3	2% grondnotenolie met carotine en calciferol = 2% levertraan	14	86	7	100	31.0 ± 3.4
	4	2% grondnotenolie met carotine en het preparaat uit tonijntraan = 2% levertraan.	19	10	19	74	34.7 ± 1.9
	5	2% grondnotenolie met carotine en het preparaat uit bestraald cholesterol = 2% levertraan.	19	0	13	0	40.7 ± 2.6

= beteekent, in ratteneenheden vitamine D overeenkomende met.

van den factor, die bekend is onder den naam vitamine D. De betere werking, die is waargenomen bij het toedienen van calciferol opgelost in het verzeepbare deel van levertraan, dan opgelost in grondnotenolie, moet alleen worden toegeschreven aan de werking van een kleine hoeveelheid van het vitamine D uit levertraan, dat bij de bereiding van deze verzeepbare fractie hierin is achtergebleven.

Zeer van belang is ook de vierde proevenreeks, waarbij de werking van 2% levertraan werd vergeleken met een in ratteneenheden vitamine D equivalente hoeveelheid van een preparaat uit tonijentraan, dat in de rattenproef gebleken was in antirachitische werkzaamheid niet veel onder te doen voor het kristallijne bestraalde ergosterol. Zoo bedroeg de kleinste doseering van het calciferol die onder onze proefvoorwaarden noodig was om de rat tegen rachitis te beschutten 0.05 γ , terwijl van het preparaat uit tonijentraan 0.07 γ noodig was. Op grond van dit feit is het zeer onwaarschijnlijk, dat in dit preparaat uit tonijentraan nu nog een andere factor zou voorkomen, die ter voorkoming van rachitis bij kuikens eventueel een beter effect zou kunnen geven. Het preparaat uit tonijentraan was ons welwillend beschikbaar gesteld door Dr. F. Ender, te Oslo die het volgens een door hem beschreven methode uit tonijnlevers had gemaakt. De resultaten van deze proeven toonden duidelijk aan, dat het preparaat uit tonijentraan inderdaad in staat was in een doseering in ratteneenheden vitamine D equivalent met 2% levertraan, kuikens onder onze proefvoorwaarden tegen rachitis te beschutten; met calciferol was dit niet het geval. De eenige conclusie die o.i. na deze uitkomst kan worden getrokken is wel deze, dat het kristallijne bestraalde ergosterol niet identiek is met het antirachitische vitamine D uit levertraan.

Ofschoon met deze conclusie het doel van dit onderzoek was bereikt, werden in een laatste serie alle vitamine D bronnen, die bestudeerd waren, nog eens naast elkaar in één reeks vergeleken. Tevens werd hierin nagegaan of de waarneming van Waddel (1934) kon worden bevestigd die had gevonden dat het bestraalde cholesterol in een doseering in ratteneenheden vitamine D equivalent met de vereischte minimum hoeveelheid levertraan, wel in staat is rachitis bij kuikens te voorkomen. Als criterium werden in deze reeks wederom de resultaten van

het post-mortem onderzoek van het skelet en de röntgenfoto vergeleken, terwijl ook het aschgehalte in de tibiae werd bepaald. De resultaten van de eerste drie groepen waren een bevestiging van de in de vorige reeksen gevonden uitkomsten. Dit was niet het geval met de uitkomst in de vierde groep, waarbij volgens de post-mortem beoordeeling van het skelet het meeren-deel van de dieren als normaal moet worden betiteld, terwijl volgens de uitkomst van de röntgenfoto het meerendeel der kuikens in meer of mindere mate rachitis vertoont. Vermoede-lijk moet dit worden verklaard door het achteruitgaan van de antirachitische werking van het preparaat, hetzij door het be-waren, hetzij door het indampen en oplossen in olie of door dat de behoefte van de dieren in dezen tijd van het jaar anders is, als toen het preparaat werd geijkt. Een nieuwe ijkproef met ratten toonde de juistheid van een dezer mogelijkheden aan. Over het preparaat uit bestraald cholesterol kan worden mede-gedeeld, dat hier de waarneming van Waddel ten volle kon worden bevestigd. Door cholesterol dat niet via het dibromide was gezuiverd met ultraviolet licht te bestralen, totdat de ab-sorptieband bij 280 m μ was verdwenen en na verwijdering van het onveranderde cholesterol werd een product verkregen dat in een hoeveelheid van 5 γ in staat was ratten tegen rachitis te beschutten. Dit product bleek nu, opgelost in grondnotenolie, in een doseering in ratteneenheden vitamine D equivalent met 2 % levertraan, in staat, om onder onze proefvoorwaarden kuikens tegen rachitis te beschutten. Hiermede is dus bewezen, dat het in cholesterol voorkomende vitamine D, dat door bestraling met ultraviolet licht antirachitisch werkzaam wordt, geen er-gosterol is.

Wanneer de in dit onderzoek verkregen resultaten worden beschouwd, dan maakt het den indruk, dat het verschijnsel van rachitis veel ingewikkelder is, dan men veelal aanneemt en dat wat klinisch rachitis wordt genoemd, een verschijnsel is, dat van een groot aantal factoren afhangt, waarvan b.v. slechts één factor door het calciferol, meer dan één door het vitamine D uit levertraan worden beïnvloed. Een soortgelijke opmerking wordt zoojuist ook gemaakt in een recente publicatie van Bills c.s. (1935).

Daar bij de ijking van de onderzochte preparaten tevens het internationale standaard-preparaat werd medegeijkt, kan tevens

een en ander worden medegedeeld over de behoefte aan vitamine D bij de kuikens onder onze proefvoorwaarden gehouden. Hierbij bleek dan, dat een hoeveelheid van 250 internationale eenheden per 100 g. voeder in den vorm van levertraan, in den vorm van het preparaat uit tonijnentraan en in den vorm van bestraald cholesterol in staat waren kuikens tegen rachitis te beschutten. Een hoeveelheid van 125 internationale eenheden in den vorm van levertraan bleek onvoldoende te zijn; ook een doseering van 2500 internationale eenheden in den vorm van calciferol bleek onvoldoende te zijn om kuikens onder onze proefvoorwaarden tegen rachitis te beschutten. Ofschoon niet in alle reeksen bepaald, bleek het voederverbruik in die series, waarbij het werd nagegaan over de periode van den tweeden tot en met den zeven en vijftigsten dag, te bedragen gemiddeld per kuiken per dag 35 g., zoodat onder onze proefvoorwaarden per kuiken per dag \pm 80 internationale eenheden vitamine D noodig waren in den vorm van levertraan, of van het preparaat uit tonijnentraan, of van het bestraalde cholesterol. Dat de behoefte sterk afhankelijk is van het dieet blijkt o.a. uit de voorloopige mededeelingen van Couch (1934), Hunter, Murphy en Knandel (1934) uit de publicaties van Bethke, Record en Kennard (1933) en van Murphy, Hunter en Knandel (1934) die veel lagere waarden vonden. Wanneer tenslotte de resultaten uit het onderzoek in een reeks conclusies worden samengevat dan kan worden besloten:

1. Onder de beschreven proefvoorwaarden is 2% levertraan voldoende om kuikens tegen rachitis te beschutten.

2. Een hoeveelheid bestraald ergosterol in ratteneenheden vitamine D equivalent met 20% levertraan, is niet in staat om kuikens onder deze proefvoorwaarden tegen rachitis te beschutten.

3. Er bestaat geen enkele aanwijzing, dat in levertraan een of andere factor voorkomt, die naast het vitamine D noodzakelijk zou zijn ter voorkoming van rachitis bij kuikens.

4. Een hoeveelheid van het onverzeepbare deel van levertraan, alsook een hoeveelheid van het preparaat uit tonijnentraan, alsook een hoeveelheid van het bestraalde cholesterolpreparaat, allen in ratteneenheden vitamine D equivalent met 2% levertraan, zijn in staat kuikens onder de beschreven proefvoorwaarden tegen rachitis te beschutten.

5. Het kristallijne bestraalde ergosterol is niet identiek met het vitamine D uit levertraan.

6. Het in cholesterol voorkomende pro-vitamine D, dat door bestraling met ultraviolet licht antirachitisch werkzaam wordt, is geen ergosterol.

7. Onder de beschreven proefvoorwaarden bedroeg de behoefte aan vitamine D bij kuikens over de periode van den eersten tot den zeven en vijftigsten levensdag, in den vorm van levertraan of van het preparaat uit tonijnentraan, of van het bestraalde cholesterol 250 internationale eenheden per 100 g. voeder of gemiddeld 80 internationale eenheden per kuiken per dag.

8. Voor de beoordeeling van rachitis bij kuikens blijkt de röntgenfoto somtijds een scherper criterium dan de post-mortem beoordeeling van het skelet. De gemiddelde aschgehalten in de tibiae blijken geen goed criterium te zijn voor het vergelijken van de antirachitische werkzaamheid van vitamine D preparaten bij kuikens.

Universiteit van Amsterdam

Laboratorium voor Physiologische Chemie.

Landbouwhoogeschool te Wageningen

Laboratorium voor Physiologie der Dieren.

October 1933-Februari 1935.

Comparative investigation on rats and chickens dealing with the identity of the artificial antirachitic vitamin (irradiated ergosterol) and the natural vitamin D of cod liver oil.

SUMMARY.

The publications of Mussehl and Ackerson (1930), Massengale and Nussmeier (1930), Hess and Supplee (1930), Steenbock, Kletzien and Halpin (1932), King, Hull and Hall (1933), Bethke, Record and Kennard (1933) and Ubbels (1933) have proved that it required more rat units of vitamin D in the form of irradiated ergosterol than in the form of cod liver oil to produce normal calcification in the chick.

In these investigations in our opinion all conditions necessary to secure convincing results had not been taken. At the same time the criterion, the bone ash content used by the American investigators to compare the antirachitic activity of the various vitamin D sources, seemed to us of doubtful reliability; many papers point out the presence of circumstances which may influence this ash content. Only Ubbels made use of radiographs of the leg bones as well to investigate the antirachitic efficiency of cod liver oil and irradiated ergosterol. However, the data published by him up to now are too incomplete to warrant a sound judgment on the question. Besides, all investigators have overlooked the fact that comparing two different sources of vitamin D used by two different species of animals, all other circumstances which might influence the experiment should be as equal as possible. Therefore it seemed to us most desirable that the rats used for the standard tests obtained exactly the same basal ration, i.e. food with the same Ca and P ratio and level as later on the chickens. At the same time it is imperative to add so much vitamin A to the food of these groups fed without cod liver oil, that the quantity equals the amount of rat units of vitamin A found in cod liver oil.

In a comparative investigation on rats and chickens we determined to study this question once more, in order to form an independent opinion, keeping the circumstances of the two species of animals as alike as possible. Both the rats and the chickens received the same basal ration; the necessary vitamin A being supplied by carotene.

The basal ration was compounded in the following proportions: 144 parts of yellow maize, 60 parts of wheat middlings, 30 parts of crude casein, $3\frac{1}{2}$ parts of dried brewers yeast, 10 parts of precipitated calcium carbonate and $2\frac{1}{2}$ parts of common salt. The Ca/P ratio in this diet was about 4.2 and the content of P 0.45 %. To prevent differences in the mineral composition of the ration, caused by small variations in the composition of the ingredients, we had seen to sufficient food in stock to last the whole series of experiments.

As test animals we used albino rats and chickens. All the chickens, except those of the first series, were single comb white Leghorns, bred at the same farm. In the experimental plan the main-test with chickens was always preceded by the standard tests on rats. In these standard tests the antirachitic potency of the preparations intended to be used in the corresponding main-tests with chickens, was determined according to the prophylactic method. The rats received as stated the same basal ration as the chickens in the main-test. The preparation to be tested was administered to the rats by means of a pipet in the mouth; to the chickens it was mixed in the ration. For each group of chickens the food was prepared at least once a week. As a criterion to determine the presence of rickets in rats we used the radiographs of the knee joint. To arrive as to the absence or presence of rickets in chickens we did not employ the ash content of the tibiae, unlike the American investigators, although in the majority of cases the ash content was determined all the same. But to compare the antirachitic efficiency of the various preparations on chickens we observed in the first place the deformities of the skeleton as described by Johnson (1925) and Doyle (1925), besides radiographs of the hock.

All chickens dying after the 17th day or killed on the end of the test, were thus examined. The radiograph was only made of those birds that were still alive on the 57th day, as was the

ash content of the tibiae determined of these chickens only. In addition to the preliminary tests, five series of experiments were projected, each consisting of several groups, the results of which are shown in table 16.

The chickens used were received as day-old chickens and immediately distributed over the several groups. The table shows, that the result of the post-mortem examination of the skeleton and the X ray diagnosis on the whole agree very well, except group IV of the fifth series. Yet it is our impression that the radiograph gives sometimes a finer distinction than the post-mortem examination of the skeleton. The bone ash content proved indeed to be an unreliable criterion; although slight differences of the mean ash content of the various groups were observable, these proved to be insignificant in statistical operation.

The usefulness of the described basal ration was studied in some preliminary tests with rats and chickens. The first series now was taken to confirm the mentioned observation that to prevent rickets in chickens irradiated ergosterol is less effective than cod liver oil.

To effect this, six groups excepting the controlgroup, received a certain quantity of vitamin D in their food; two groups in the form of cod liver oil and three in the form of irradiated ergosterol. The only criterion used here, namely the post-mortem examination of the skeleton, proved clearly, that 2% cod liver oil being sufficient to protect chickens against rickets under these circumstances, an amount of calciferol in rat units of vitamin D equivalent to 20% cod liver oil did not suffice.

This confirmed the observation of the investigators mentioned in the beginning of this summary.

However this result did not prove that irradiated ergosterol was not identical with vitamin D in cod liver oil. The possibility still remained that another factor existed in cod liver oil which acts on chickens being either independently antirachitically active or necessary for the efficiency of vitamin D. Then for rats this factor would be dispensable.

This possibility was minutely investigated in the second and third series. In both series the post-mortem examination of the skeleton and the radiograph of the hock were used as criterion, at the same time the ash content of the tibiae was determined.

TABLE 16.

Series	Group	Preparations mixed in the basal-ration	Post-mortem examination of the skeleton		X-Ray examination		Average ashcontent in the tibiae %
			Number of chickens	Rachitic chickens %	Number of chickens	Rachitic chickens %	
I	1	2% peanut oil with carotene . . .	10	100			
	2	1% peanut oil with carotene and 1% codliver oil	17	29			
	3	2% codliver oil	17	6			
	4	2% peanut oil with carotene and calciferol = 2% codliver oil . .	14	100			
	5	2% peanut oil with carotene and calciferol = 20% codliver oil .	15	67			
	6	2% peanut oil with carotene and calciferol = 200% codliver oil	16	6			
II	1	2% peanut oil with carotene . . .	13	100	6	100	27.1 ± 2.0
	2	2% codliver oil	14	7	14	7	40.0 ± 2.6
	3	2% peanut oil with carotene and calciferol = 80% codliver oil .	12	8	11	0	40.5 ± 2.9
	4	2% peanut oil with carotene and nonsaponifiable matter of codliver oil = 2% codliver oil . .	15	7	15	7	42.1 ± 2.7
	5	2% saponifiable fraction of codliver oil with carotene	15	67	15	67	38.3 ± 1.9
	6	2% saponifiable fraction of codliver oil and nonsaponifiable matter of codliver oil = 2% codliver oil	13	8	13	0	43.0 ± 1.3
III	1	4% peanut oil with carotene . . .	20	100	4	100	31.0 ± 2.4
	2	4% peanut oil with carotene and calciferol = 2% codliver oil . .	19	100	14	100	28.1 ± 1.8
	3	0.25% codliver oil and 3.75% peanut oil with carotene and calciferol = 2% codliver oil	19	74	17	100	31.4 ± 2.4
	4	4% saponifiable fraction of codliver oil	18	78	15	93	29.7 ± 2.0
	5	4% saponifiable fraction of codliver oil and calciferol = 2% codliver oil	14	71	12	91	33.8 ± 2.8
	6	2% saponifiable fraction of codliver oil and 2% peanut oil with carotene and calciferol = 4% codliver oil	17	94	16	94	30.0 ± 2.3
IV	1	2% peanut oil with carotene . . .	5	100	3	100	average not calculated
	2	2% codliver oil	3	0	2	0	" " "
	3	2% peanut oil with carotene and the preparation of tunnyliver oil = 2% codliver oil	15	0	13	16	38.6 ± 2.6
	4	2% peanut oil with carotene and the preparation of tunnyliver oil = 6% codliver oil	8	0	7	0	42.3 ± 3.0
V	1	2% peanut oil with carotene . . .	10	100	2	100	average not calculated
	2	2% codliver oil	15	6	13	0	38.8 ± 3.3
	3	2% peanut oil with carotene and calciferol = 2% codliver oil . .	14	86	7	100	31.0 ± 3.4
	4	2% peanut oil with carotene and the preparation of tunnyliver oil = 2% codliver oil	19	10	19	74	34.7 ± 1.9
	5	2% peanut oil with carotene and irradiated cholesterol = 2% codliver oil	19	0	13	0	40.7 ± 2.6

= means, in rat units vitamin D according to.

In the second series the efficiency of 2% cod liver oil, its saponifiable — and non-saponifiable fraction, separated and combined and also the efficiency of calciferol dissolved in the saponifiable fraction of cod liver oil were compared. As control group a lot fed without vitamin D, and another fed on calciferol in peanut oil in rat units equivalent to 2% cod liver oil were used.

Table 16 shows that these tests proved the efficiency both of 2% cod liver oil and the non-saponifiable matter equivalent to 2% cod liver oil to protect chickens against rickets under the test conditions. A quantity of calciferol in peanut oil according to 2% cod liver oil did not prevent rickets, being a confirmation of the first series. If, on the other hand, the calciferol was fed in the saponifiable fraction of cod liver oil instead of in peanut oil, the result was somewhat more favourable. It is however our opinion that this greater efficiency is due to the small amount of vitamin D that remains in the saponifiable fraction of the oil by saponification and preparation of the non-saponifiable matter.

The rightness of this supposition was tested in a third series of six groups. The result fully justified our opinion that nothing proves the existence of some factor in the saponifiable fraction of cod liver oil enhancing the antirachitic potency of the calciferol. Nor does anything warrant the belief that the saponifiable fraction should contain a factor different from what we call vitamin D. The better potency of the calciferol dissolved in the saponifiable fraction of cod liver oil, than dissolved in peanut oil is only due to the action of a small quantity of vitamin D remained from the cod liver oil in preparing this saponifiable fraction.

In the fourth series the efficiency of 2% cod liver oil and a concentrate from tunny liver oil were compared. A rat test had proved it to be hardly less efficient than crystalline irradiated ergosterol. The smallest dose of calciferol required under the test conditions to prevent rickets in rats, was 0.05 γ against 0.07 γ of the concentrate of tunny liver oil. On this fact is based our opinion that it is very unlikely to suppose in this concentrate from tunny liver oil even now another factor giving better results in preventing rickets in chickens.

The concentrate from tunny liver oil was kindly procured to

us by Dr F. Ender at Oslo; it was prepared from tunny livers according to the method described by himself (1933; 1934). The results of these trials proved evidently, that this concentrate indeed protected chickens against rickets under our test conditions in a dose of rat units of vitamin D according to 2% cod liver oil, being not the case with calciferol. We feel sure that this result can lead to one conclusion, namely: crystalline irradiated ergosterol is not identical with the antirachitic vitamin from cod liver oil.

The different vitamin D sources already studied in previous series now moreover were compared once more in one series.

At the same time we tried to confirm Waddell's observation irradiated cholesterol being as effective in preventing rickets in chickens as the rat equivalent amount of vitamin D from cod liver oil (1934). Again our criterion was a comparison of the post-mortem examination of the skeleton, the radiographs of the hock and the ash content of the tibiae. The result of the first three lots was a confirmation of the conclusions of the former groups. This was not the case with the fourth lot, the greater part of which, according to the post-mortem examination of the skeleton, ought to be called normal. However according to the radiograph of the hock most showed rickets in a less or more severe degree. Probably this is due to the diminution of the antirachitic potency of the concentrate from tunny liver oil either caused by long keeping, or by the evaporation and dissolution in oil or by a variable need of the animals in vitamin D in comparison to the time the preparation was tested. A new standard test with rats proved the rightness of one of these suppositions. As regards the preparation of irradiated cholesterol we can fully subscribe the rightness of Waddell's observation. Cholesterol, not purified via the dibromide, was exposed to ultraviolet rays till the absorption band at 280 $m\mu$ disappeared. After separating the unchanged cholesterol a preparation resulted, which was able to protect rats against rickets in a quantity of 5 γ . This preparation also prevented rickets in chickens under our test conditions when dissolved in peanut oil in a dose in rat units of vitamin D equivalent to 2% cod liver oil. This proves that the provitamin D found in cholesterol being activated antirachitically by ultraviolet irradiation is not ergosterol. Reviewing the results of our

investigation we got the impression that the syndrome called rickets is a much more complicated one than is generally supposed; what is clinically called rickets is a syndrome depending on many factors. E.g. only one being influenced by calciferol, several by vitamin D from cod liver oil.

As in our standard tests we have included the international standard preparation we are able to mention something about the need of vitamin D in chickens kept under our test conditions. Here it appeared that a quantity of 250 international units per 100 gm. of ration in the form of cod liver oil, of a concentrate from tunny liver oil or of irradiated cholesterol fully protects chickens against rickets. A quantity of 125 international units in the form of cod liver oil and a dose of 2500 international units in the form of calciferol appeared insufficient. Although not all series were investigated, those checked during the 2nd till the 57th day the average of food consumption per chicken per diem was 35 gm.; so under our test conditions each chicken required per diem \pm 80 international units of vitamin D in the form of cod liver oil, of the concentrate from tunny liver oil or of the irradiated cholesterol. That the need is strongly influenced by the diet is i.a. proved by the provisory communications of Couch (1934), Hunter, Murphy and Knandel (1933), and the papers of Bethke, Record and Kennard (1933) and of Murphy, Hunter and Knandel (1934) who found smaller values.

Resuming the results of the investigation we conclude:

1. Under our test conditions 2% cod liver oil sufficed to protect chickens against rickets.
2. A quantity of irradiated ergosterol in rat units of vitamin D equivalent to 20% cod liver oil is not sufficient to prevent rickets in chickens.
3. No single fact points to the presence of another factor in cod liver oil being indispensable besides vitamin D to protect chickens against rickets.
4. A quantity of the non-saponifiable matter of cod liver oil, just as a quantity of the irradiated cholesterol, just as a quantity of a concentrate from tunny liver oil, all in rat units of vitamin D equivalent to 2% cod liver oil, were within the limits of experimental error equally efficient in protecting chickens against rickets.

5. Crystalline irradiated ergosterol is not identical with vitamin D from cod liver oil.

6. The provitamin D in cholesterol, activated antirachitically by ultraviolet irradiation, is not ergosterol.

7. Under our test conditions the need for vitamin D in chickens during the period of the first till the fifty-seventh day, either in the form of cod liver oil or of the tunny liver oil concentrate or of irradiated cholesterol was 250 international units per 100 gm. of ration, i.e. an average of ± 80 international units per diem per chicken.

8. To determine rickets in chickens, the radiograph is sometimes a more minute criterion than the post-mortem examination of the skeleton. The average of the ash content of the tibiae proves to be no reliable criterion for the comparison of the antirachitic efficiency of vitamin D preparations in chickens.

University at Amsterdam

Laboratory of Physiological-Chemistry.

Agricultural University at Wageningen

Laboratory of Animal Physiology.

October 1933-February 1935.

BIBLIOGRAPHIE

- ACKERSON, (C. W.), M. J. BLISH and F. E. MUSSEHL: A study of the phosphorus, calcium and alkaline reserve of the bloodsera of normal and rachitic chicks. *J. biol. Chem.*, 63, 75-84, (1925).
- ADAMS, (G.) and E. V. McCOLLUM: A method for the biological assay of cod liveroil. *J. biol. Chem.*, 78, 495-524, (1928).
- BARNES, (D. J.), M. J. BRADY and E. M. JAMES: The comparative value of irradiated ergosterol and cod liveroil as a prophylactic antirachitic agent when given in equivalent dosage according to rat units of vitamin D. *Am. J. Diseases Child.*, 39, 45-58, (1930).
- BASU, (N. K.): Vitamins from egg yolk and fish oil. *Nature*, 133, 262, (1934).
- BEALL, (D.) and J. BIELLY: Activated ergosterol. *Trans. Roy. Soc. Canada*, 26, III, 57-60, (1932).
- BERGAMI, (G.): Vitamina D ed ergosterolo irradiato. *Archivio di Scienze biologiche* 19, 204-226, (1933/34).
- BETHKE, (R. M.): Types of leg disorders affecting growing chicks. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 32, 476-478, (1933).
- BETHKE, (R. M.), D. C. KENNARD and C. H. KICK: The availability of calcium in calcium salts and minerals for bone formation in the growing chick. *Poultry Science*, 9, 45-50, (1929).
- BETHKE, (R. M.), D. C. KENNARD, C. H. KICK and G. ZINZALIAN: The calcium-phosphorus relationship in the nutrition of the growing chick. *Poultry Science*, 8, 257-265, (1929).
- BETHKE, (R. M.), D. C. KENNARD and M. C. KIK: Nutritional studies of the growing chick I. The relation of sunlight and green clover to leg weakness in chicks. *J. biol. Chem.*, 63, 377-390, (1925).
- BETHKE, (R. M.), P. R. RECORD and D. C. KENNARD: A type of nutritional leg paralysis affecting chicks. *Poultry Science*, 10, 355-368, (1931).
- BETHKE, (R. M.), P. R. RECORD and D. C. KENNARD: The comparative antirachitic efficiency of irradiated ergosterol and irradiated yeast and cod liveroil for the chicken. *J. Nutrition*, 6, 413-425, (1933).
- BETHKE, (R. M.), H. STEENBOCK and M. T. NELSON: Calcium and phosphorus relations to growth and composition of blood and bone with varying vitamin intake. *J. biol. Chem.*, 58, 71-103, (1923/24).
- BILLS, (CH. E.): Physiology of the sterols including vitamin D. *Phycol. Review*, 15, 1-97, (1935).

- BILLS, (CH. E.), O. N. MASSENGALE and M. IMBODEN: Demonstration of the existence of two forms of vitamin D in fish liver oils. *Science*, N. S. 80, 596, (1934).
- BILLS, (CH. E.), O. N. MASSENGALE, F. G. McDONALD and A. M. WIRICK: The action of activated ergosterol in the chicken. III. Evidence of the existence of only one provitamin in crude ergosterol. *J. biol. Chem.* 108, 323-330, (1935).
- BOURDILLON, (R. B.), H. M. BRUCE, C. FISCHMANN and T. A. WEBSTER: The quantitative estimation of vitamin D by radiography. *Medic. Res. Council. Spec. Rep. nr. 158*, (1931).
- BRANION, (H. D.) and J. B. SMITH: The influence of vitamin D on hatchability and egg production. *Poultry Science*, 11, 261-265, (1932).
- BROWNING, (E.): *The Vitamins. London*, (1931).
- BRUCE, (H. M.) and R. K. CALLOW: Cereals and rickets. The role of inositolhexaphosphoric acid. *Biochem. J.*, 28, 517-528, (1934).
- BUCKNER, (G. D.) and J. H. MARTIN: Calcium and phosphorus metabolism of the growing chick. *Poultry Science*, 8, 284-289, (1929).
- BUCKNER, (G. D.), W. M. INSKO Jr. and J. H. MARTIN: Deformed leg bones and slipped tendons. *Poultry Science* 10, 392, (1932).
- BUCKNER, (G. D.), J. H. MARTIN and W. M. INSKO Jr.: Calcium and phosphorus requirements of the growing chick. *Poultry Science*, 9, 235-238, (1930).
- BUCKNER, (G. D.), J. H. MARTIN and W. M. INSKO Jr.: The effect of magnesium carbonate when added to diets of growing chicks. *Poultry Science*, 11, 58-62, (1932).
- BUCKNER, (G. D.), J. H. MARTIN and W. M. INSKO Jr.: The relative utilization of certain calcium compounds by the growing chick. *Poultry Science*, 9, 1-5, (1929).
- BURR, (G. O.) and MILDRED M. BURR: A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *J. biol. Chem.*, 82, 345-367, (1929).
- CARVER, (J. S.), A. BRUNSTAD, J. L. St. JOHN, F. W. FRASIER and W. ATHOW: Fish oils as a source of vitamin D for growing chicks. *Agric. Exp. Sta., Washington, Tech. Bull., nr. 284*, (1933).
- CARVER, (J. S.), E. J. ROBERTSON, D. BRAZIE, R. H. JOHNSON and J. L. St. JOHN: The vitamin D requirements of chickens. *Wash. Agr. Exp. Sta. Bull., nr. 299*, (1934).
- CHIDESTER, (F. E.), A. L. ASHWORTH, G. A. ASHWORTH and I. A. WILLES: Iodine in cod liveroil. *Nature*, 130, 544-545, (1932).
- COLLIER, (J.): Prevention of weak legs in experimental chickens. *Science*, 60, 42, (1924).
- COUCH, (J. R.): Vitamin D requirements of growing chicks. *Poultry Science*, 13, 306-307, (1934).
- DALMER, (O.), F. VON WERDER und TH. MOLL: Beitrag zum biologischen Vergleich des Vitamins D aus Fischleberölen mit dem aus bestrahltem Ergosterin. *Z. Physiol. Chem.*, 224, 86-96, (1934).

- DAVIES, (W. L.): Variations in phosphorus content of maize meal used in rachitogenic rations. *Analyst*, 59, 340-341, (1934).
- DAVIS, (D. E.) and J. R. BEACH: The antirachitic value of salmon oil. *Poultry Science*, 7, 216-218, (1928).
- DOLS, (M. J. L.): Is bestraald ergosterol identiek met het vitamine D uit levertraan? *Chem. Weekblad*, 32, 146-148, (1935).
- DOLS, (M. J. L.): The comparative antirachitic efficiency of irradiated ergosterol and cod liveroil for the chicken and a description of a more reliable method for the determination of rachitic leg weakness in baby-chickens. *Arch. néerl. Physiol.*, 19, 290-294, (1934).
- DOYLE, (L. P.): Enlarged parathyroids in rachitic chickens. *Science*, 61, 118, (1925).
- DOYLE, (L. P.): Rickets in mature chickens. *Poultry Science*, 4, 146-150, (1925).
- DOYLE, (L. P.): The differential diagnosis of leg weakness in chicks. *Poultry Science*, 10, 393, (1931).
- DRUMMOND, (J. C.) and T. P. HILDITCH: The relative values of cod liveroils from various sources. *London*, (1930).
- DUBIN, (H. E.) and C. FUNK: Studies on the chemistry of cod liveroil. I. Effect of hydrogenation on the vitamin content. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 21, 139-141, (1923).
- DUBIN, (H. E.) and C. FUNK: Studies on the chemistry of cod liveroil. I. The effect of hydrogenation upon the vitamin content. *J. Metabolic Res.*, 4, 461-465, (1923/24).
- DUBIN, (H. E.) and C. FUNK: Studies on the chemistry of cod liveroil. II. A cod liveroil concentrate manifesting both antirachitic and antiophthalmic properties. *J. Metabolic Res.*, 4, 467-479, (1923/24).
- DUNN, (L. C.): The effect of cod liveroil in various amounts and forms on the growth of young chickens. *J. biol. Chem.*, 61, 129-136, (1924).
- EDSON, (A. W.): Cod liveroil in the winter ration of pullets. *Minnesota Agric. Exp. Sta. Bull. nr. 286*, (1932).
- ELVEHJEM, (C. A.) and B. E. KLINE: Calcium and phosphorus studies in the chick. *J. biol. Chem.*, 103, 733-744, (1933).
- ELVEHJEM, (C. A.) and V. F. NEU: Studies in vitamin A avitaminosis in the chick. *J. biol. Chem.*, 97, 71-82, (1932).
- EMMET, (A. D.) and G. PEACOCK: Does the chick require fat soluble vitamins? *J. biol. Chem.*, 56, 679-693, (1923).
- EMMET, (A. D.) and G. E. PEACOCK: The chick as an experimental animal in vitamine studies. *J. biol. Chem.*, 50, *Proc. Soc. biol. Chemists*, XXXVI, 40, (1922).
- ENDER, (F.): Der Unterschied zwischen den synthetischen und den natürlich vorkommenden D-Vitamin hinsichtlich ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften. *Z. f. Vitaminforschung*, 2, 241-249, (1933).
- ENDER, (F.): Zur Herstellung hochkonzentrierter Präparate des natürlichen D-Vitamins. *Z. f. Vitaminforschung*, 3, 161-163, (1934).

- EIJKMAN, (CH.): Polyneuritis bij hoenders. *Geneesk. Tijdschr. voor Ned. Indië*, 36, 214-269, (1896).
- FUNK, (C.): Die Vitamine. München, 3e Auflage, (1924).
- GARRAHAN, (J. P.) and J. C. TRAVERSARO: *Semana med.*, 36, 824, (1929), geciteerd uit Ethel Browning: *The Vitamins*, London, 1931.
- GLANZMANN, (E.): Endokrine Drüsen und Rachitis. *Z. f. Vitaminforschung*, 3, 167-194, (1934).
- GRIEM, (W. B.): Report on biological methods for the determination of cod liveroil in feed mixtures. *J. Assoc. Off. Agric. Chemists*, 15, 222-226, (1932).
- GRIJNS, (G.): Over polyneuritis gallinarum. *Geneesk. Tijdschr. voor Ned. Indië*, 41, 3-110, (1901).
- HALL, (G. E.) and EARL J. KING: Calcium and phosphorus metabolism in the chicken. II. „Range paralysis”. *Poultry Science*, 10, 259-268, (1931).
- HALPIN, (J. G.) and A. R. LAMB: The effect of ground phosphate rock fed at various levels on the growth of chicks and on egg production. *Poultry Science*, 11, 5-13, (1932).
- HART, (E. B.), J. G. HALPIN and H. STEENBOCK: Use of synthetic diets in the growth of baby chicks. A study of leg weakness in chickens. *J. biol. Chem.*, 43, 421-442, (1920).
- HART, (E. B.), J. G. HALPIN and H. STEENBOCK: The nutritional requirements of baby chicks. II. Further study of leg weakness in chickens. *J. biol. Chem.*, 52, 379-386, (1922).
- HART, (E. B.), S. W. F. KLETZIEN, H. T. SCOTT and J. G. HALPIN: The alleged new vitamin in milk for poultry. *Poultry Science*, 9, 308-312, (1930).
- HART, (E. B.), O. L. KLINE and J. A. KEENAN: A ration for the production of rickets in chicks. *Science*, 73, 710-711, (1931).
- HART, (E. B.), H. T. SCOTT, O. L. KLINE and J. G. HALPIN: The calcium-phosphorus ratio in the nutrition of growing chicks. *Poultry Science*, 9, 296-306, (1930).
- HART, (E. B.), H. STEENBOCK, S. W. F. KLETZIEN, J. G. HALPIN and W. T. JOHNSON: *Wisconsin Agr. Exp. Sta. Bull.*, nr. 396, (1927); geciteerd volgens Buckner en Martin. (1929).
- HART, (E. B.), H. STEENBOCK and S. LEPKOVSKY: Is the antirachitic factor of cod liveroil, when mixed with ground grains, destroyed through storage? *J. biol. Chem.*, 65, 571-578, (1925).
- HART, (E. B.), H. STEENBOCK, S. LEPKOVSKY and J. G. HALPIN: The nutritional requirements of baby chicks. III. The relation of light to the growth of the chicken. *J. biol. Chem.*, 58, 33-40, (1923/24).
- HART, (E. B.), H. STEENBOCK, S. LEPKOVSKY and J. G. HALPIN: The nutritional requirements of baby chicks. IV. The chicks requirement for vitamin A. *J. biol. Chem.*, 60, 341-354, (1924).

- HART, (E. B.), H. STEENBOCK, S. LEPKOVSKY, S. KLETZIEN, J. G. HALPIN and W. T. JOHNSON: The nutritional requirement of the chicken. V. The influence of ultra-violet light on the production, hatchability and fertility of the egg. *J. biol. Chem.*, 65, 579-595, (1925).
- HAUGE, (S. M.), C. W. CARRICK and R. W. PRANGE: Fat soluble requirements for growing chicks. *Poultry Science*, 6, 135-140, (1927).
- HELLER, (V. G.), K. R. HUNTER and R. B. THOMPSON: Phosphorus distribution in chicken blood as affected by the diet. *J. biol. Chem.*, 97, 127-132, (1932).
- HENDERSON, (E. W.): Factors involved in malformation of the bones of growing chicks. I. The value of egg yolk and chicken fat. *Poultry Science*, 12, 91-96, (1933).
- HERNER, (M. C.) and A. D. ROBINSON: A study of leg-bone deformities in growing chicks. I. Deformities produced by high mineral rations. *Poultry Science*, 11, 283-288, (1932).
- HESS, (A. F.), J. M. LEWIS, T. L. MACLEOD and B. H. THOMAS: Antirachitic potency of the milk of cows fed irradiated yeast or ergosterol. *J. Amer. med. Assoc.*, 97, 370-374, (1931).
- HESS, (A. F.) and G. C. SUPPLEE: The action of irradiated ergosterol on rats and chickens. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 27, 609-610, (1930).
- HESS, (A. F.), M. WEINSTOCK and F. D. HELMAN: The antirachitic value of irradiated phytosterol and cholesterol. *J. biol. Chem.*, 63, 305-308, (1925).
- HESS, (A. F.), M. WEINSTOCK, H. RIVKIN and J. GROSS: The lack of relations between the development and cure of rickets and the inorganic phosphorus concentration of the blood. *J. biol. Chem.*, 87, 37-46, (1930).
- HESS, (A. F.) and A. WINDAUS: Experiments on activation of cholesterol derivatives and allied sterols by ultraviolet irradiation. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 24, 171, (1926/27).
- HEUSER, (G. F.) and L. C. NORRIS: Rickets in chicks. I. Variations in the antirachitic potency of different brands of cod liveroil. *Poultry Science*, 6, 9-17, (1926).
- HEUSER, (G. F.) and L. C. NORRIS: Rickets in chicks. II. Variations in the antirachitic potency of different grades of cod liveroil. *Poultry Science*, 6, 94-98, (1926/27).
- HEUSER, (G. F.) and L. C. NORRIS: Rickets in chicks. III. The effectiveness of mid-summer sunshine and irradiation from a quartz mercury vapor arc in preventing rickets in chicks. *Poultry Science*, 8, 89-98, (1928/29).
- HOLMES, (A. D.), H. E. BROWN, J. W. SMITH, G. B. TREADWELL and W. M. E. WHITELOCK: Studies of the vitamin potency of cod liveroils. XIX. Influence of cod liveroil on reproduction. *Poultry Science*, 5, 110-116, (1925).
- HOLMES, (A. D.) and M. G. PIGOTT: Effects of cod liveroil on calcium metabolism of young chicks. *Ind. and Eng. Chem.*, 23, 190-196, (1931).

- HOLMES, (A. D.) and M. G. PIGOTT: The relative antirachitic activity of cod liveroil and irradiated ergosterol. *New. Eng. J. of Med.*, 203, 220, (1930), geciteerd uit Ethel Browning: *The Vitamins*. London, 1931.
- HOLMES, (A. D.), M. PIGOTT and D. F. MENARD: The permanancy of cod liveroil vitamins in stored feeds. *Poultry Science*, 10, 37-52, (1930).
- HOLMES, (A. D.), M. G. PIGOTT and W. B. MOORE: Mineral content of tibiae from chicks with slipped tendon. *Poultry Science*, 12, 356-361, (1933).
- HOLMES, (A. D.), M. G. PIGOTT and W. B. MOORE: The influence of sex on the size and composition of tibiae of growing chicks. *Poultry Science*, 11, 243-249, (1932).
- HOLMES, (A. D.) and F. TRIPP: Factors which influence the effectiveness of a rachitogenic ration. *J. biol. Chem.*, 97, (1932). *Proc. Amer. Soc. Biol. Chemists*, XXVI, 9.
- HOLTZ, (F.), F. LAQUER, H. KREITMAIR und TH. MOLL: Beiträge zur Kenntnis des Vitamins D. I. Mitteilung. Die Wertbestimmung im Tierversuch. *Biochem. Z.* 237, 247-275, (1931, a.).
- HOLTZ, (F.), F. LAQUER, H. KREITMAIR und TH. MOLL: Ueber die biologische Wertbestimmung von Vitamin D-Präparaten. *Münch. med. Wochenschr.*, 78, 1688, (1931, b.).
- HOU, (H. C.): Further observations on the relation of the preen gland of birds to rickets. *Chinese J. Physiol.*, 4, 79-91, (1930).
- HOU, (H. C.): Relation of the preen gland (glandula uropigialis) of birds to rickets. *Chinese J. Physiol.*, 3, 171-181, (1929).
- HOU, (H. C.): Relation of preen gland of birds to rickets. III. Site of activation during irradiation. *Chinese J. Physiol.*, 5, 11-18, (1931).
- HOU, (H. C.): Studies on the glandula uropigialis of birds. *Amer. J. Physiol.*, 85, 380, (1928).
- HOU, (H. C.): Studies on the glandula uropigialis of birds. *Chinese J. Physiol.*, 2, 345-380, (1928).
- HOU, (H. C.): The role of the skin in the cure of rickets by irradiation. II. The site of activation of the provitamin. *Chinese J. Physiol.*, 4, 345-358, (1930).
- HOU, (H. C.) and E. TSO: The role of the skin in the cure of rickets by irradiation. *Chinese J. Physiol.*, 4, 93-116, (1930).
- HUGHES, (J. S.) and R. W. TITUS: Should leg weakness in growing chicks be called rickets? *J. biol. Chem.*, 69, 289-294, (1926).
- HUGHES, (J. S.), L. F. PAYNE and W. L. LATSHAW: The influence of ultraviolet light on leg weakness in growing chicks and egg production. *Poultry Science*, 4, 151-156, (1925).
- HUGHES, (J. S.), L. F. PAYNE, R. W. TITUS and J. M. MOORE: The relation between the amount of ultraviolet light received by hens and the amount of antirachitic vitamin in the eggs produced. *J. biol. Chem.*, 66, 595-600, (1925).
- HUGHES, (J. S.), R. W. TITUS and L. WITHAM: The relative values of

- green oat sprouts, green alfalfa and cod liveroil in the prevention of rickets in growing chicks. *Poultry Science*, 5, 59-66, (1925/26).
- HUNTER, (J. E.), R. ADAMS DUTCHER and H. C. KNANDEL: Does vitamin A possess vitamin D sparing properties when fed to growing chicks? *Poultry Science*, 11, 239-240, (1932).
- HUNTER, (J. E.), R. A. DUTCHER and H. C. KNANDEL: Further studies on the production of experimental „slipped tendon” or „hock disease” in chicks. *Poultry Science*, 10, 392, (1931).
- HUNTER, (J. E.), R. A. DUTCHER and H. C. KNANDEL: Relative utilization of calcium from calcium carbonate and calcium gluconate by chickens. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 31, 70-75, (1933).
- HUNTER, (J. E.) and E. M. FUNK: The production of „slipped tendon” in chicks by experimental feeding. *Proc. 22nd Annual Meeting for Poultry Science*, (1930).
- HUNTER, (J. E.), H. C. KNANDEL and R. A. DUTCHER: Factors involved in the experimental production and prevention of hock disease in battery brooded chicks. *Atti del V Congresso mondiale di pollicoltura, Roma, 3a Sezione nr. 96*, (1933).
- HUNTER, (J. E.), R. R. MURPHY and H. C. KNANDEL: The quantitative requirements of growing chicks and laying hens for vitamin D. *Poultry Science*, 13, 305, (1934).
- INSKO, Jr. (W. M.), D. F. SOWELL and M. LYONS: Is phosphorus a causative factor in the production of slipped tendon? *Poultry Science*, 13, 370-375, (1934).
- JANSEN, (B. C. P.) en W. F. DONATH: Over de isoleering van het anti-beri-beri vitamine. *Versl. Kon. Akad. Wetenschappen, Amsterdam*, 35, 923-934, (1926).
- JOHN, (J. L. St.), C. KEMPF and L. BOND: Observations on the bone-ash method of determining effectiveness of vitamin D supplements. *Poultry Science*, 12, 34-36, (1933).
- JOHNSON, (W. T.): The diagnosis of leg weakness associated with abnormal bone development. *Poultry Science*, 4, 55-61, (1924/25).
- JUNGHERR, (E.): Observations on the macroscopic diagnosis of fowl paralysis. *Poultry Science*, 12, 184-188, (1933).
- KARRER, (P.), R. MORF und K. SCHOEPP: Zur Kenntnis des Vitamins A aus Fischtranen. 1; 2. *Helv. Chim. Acta*, 14, 1036-1040; 1431-1436, (1931).
- KING, (EARL J.) and G. E. HALL: Calcium-phosphorus metabolism in the chicken. III. The influence of cereals and vitamins A and D. *Poultry Science*, 10, 332-345, (1931).
- KING, (EARL J.) und G. E. HALL: Hypervitaminose bei Hühnern. *Biochem. Z.* 229, 315-322, (1930).
- KING, (EARL J.), H. HULL and G. E. HALL: Calciumphosphorus metabolism in the chicken. IV. Ergosterol requirement of growing chicks. *Poultry Science*, 12, 129-132, (1933).

- KLEIN, (D.) and W. C. RUSSEL: The fate of the antirachitic factor in the chicken. I. The antirachitic factor balance in the growing chick. *J. biol. Chem.*, 93, 693-704, (1931).
- KLEIN, (G. T.): A study of various methods of preventing rickets in chicks. *Poultry Science*, 7, 31-40, (1927).
- KNOWLES, (H. R.), E. B. HART and J. G. HALPIN: The relation of the preen gland to rickets in the domestic fowl. *Poultry Science*, 14, 33-36, (1935).
- KNOX, (CH. W.) and A. R. LAMB: The effect of certain vitamin carrying additions to a normal ration for baby chicks. *Poultry Science*, 3, 101-108, (1924).
- KON, (S. K.) and R. G. BOOTH: The vitamin D activity of butter. 1. A chemical differentiation of the antirachitic factor of autumn and winter butter from irradiated ergosterol and the vitamin D of cod liveroil. *Biochem. J.*, 27, 1302-1309, (1933).
- KON, (S. K.) and R. G. BOOTH: The vitamin D activity of butter. 2. The complex of the antirachitic action of butter. *Biochem. J.*, 28, 111-120, (1934, a.).
- KON, (S. K.) and R. G. BOOTH: The vitamin D activity of butter. 3. An attempt to elucidate the nature of the labile factor in butter antirachitic for the rat. The antirachitic potency of lard, olive oil, egg oil and the fatty acids of butters and lard. *Biochem. J.*, 28, 121-130, (1934, b.).
- KRAUS, (W. E.), R. M. BETHKE and C. F. MONROE: The effect of feeding irradiated ergosterol to cows on the vitamin D content of milk. *J. Nutrition*, 5, 467-477, (1932).
- KUHN, (R.), P. GYOERGY und TH. WAGNER-JAUREGG: Ueber Lactoflavin, den Farbstoff der Molke. *Ber. Deutsche Chem. Gesellsch.*, 66, 1034-1038, (1933).
- LACHAT, (L. L.): Studies relative to the estimation of vitamin D. II. Effect of seasonal variation and sex upon calcification in rachitic chicks. *Poultry Science*, 13, 353-357, (1934).
- LACHAT, (L. L.), H. A. HALVORSON and L. S. PALMER: Studies relative to the estimation of vitamin D. *J. Assoc. Off. Agric. Chemists*, 15, 660-675, (1932).
- LEERSUM, (E. C. VAN): Bestraalde levertraan. *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, 74, 899-901, (1930).
- LUETTRINGHAUS, (A.): Vitamin D. *Angew. Chemie*, 47, 552-558, (1934).
- LUNIN, (N.): Ueber die Bedeutung der anorganischen Salze für die Ernährung des Thieres. *Z. Physiol. Chem.*, 5, 31-39, (1881).
- MANNING, (J. R.): Bibliography on cod liveroil in animal feeding with non critical comments and abstracts. *Washington, Bureau of Fisheries, Document nr. 1065*, (1929).
- MASSENGALE, (O. N.): The effect of feeding rachitic diets, containing different ratios of calcium to phosphorus on the calcium and inorganic phosphorus of the blood serum of chicks. *Poultry Science*, 8, 335-343, (1929).

- MASSENGALE, (O. N.) and M. NUSSMEIER: The action of activated ergosterol in the chicken. I. The effect on the calcium and inorganic phosphorus of the blood serum. *J. biol. Chem.*, 87, 415-422, (1930).
- MASSENGALE, (O. N.) and M. NUSSMEIER: The action of activated ergosterol in the chicken. II. Prevention of leg weakness. *J. biol. Chem.*, 87, 423-426, (1930).
- McCOLLUM, (E. V.) and M. DAVIS: Observations on the isolation of the substance in butterfat which exerts a stimulating influence on growth. *J. biol. Chem.*, 19, 245-250, (1914).
- McCOLLUM, (E. V.) and N. SIMMONDS: The newer knowledge of nutrition. *New York, 4th edition*, (1929).
- McDONALD, (F. G.) and M. NUSSMEIER: The antiricketic potency of eggs from hens receiving massive doses of activated ergosterol. *J. biol. Chem.*, 99, 79-83, (1932).
- McGOWAN, (J. P.) and A. R. G. EMSLIE: Rickets in chickens with special reference to its nature and pathogenesis. *Biochem. J.*, 28, 1503-1512, (1934).
- Medical Research Council: Vitamins. A survey of present knowledge. *London*, (1932).
- MENSCHICK, (W.) und I. H. PAGE: Ueber die Resorbierbarkeit des unbestrahlten Ergosterins. Ein Beitrag zur Methodik der quantitativen Ergosterinbestimmung. *Z. Physiol. Chem.*, 211, 246-252, (1932).
- MILBY, (T. T.): A method for determining the ash content of the leg bones of chicks afflicted with slipped tendon. *Poultry Science*, 13, 307-308, (1934).
- MILBY, (T. T.): A statistical analysis of some experiments on slipped tendon. *Poultry Science*, 12, 352-355, (1933).
- MILLER, (R. J.), R. A. DUTCHER and H. C. KNANDEL: Nutritional leg weakness in poultry. *Poultry Science*, 8, 113-123, (1929).
- MURPHY, (R. R.), J. E. HUNTER and H. C. KNANDEL: The vitamin D requirements of growing chicks and laying hens. *Pensylvania Agric. Exp. Sta. Bull. nr. 303*, (1934).
- MUSSEHL, (F. E.) and C. W. ACKERSON: Effect of modifying the Ca/P ratio of a specific ration for growing chicks. *Poultry Science*, 11, 293-296, (1932).
- MUSSEHL, (F. E.) and C. W. ACKERSON: Irradiated ergosterol as an antirachitic for chicks. *Poultry Science*, 9, 334-338, (1930).
- MUSSEHL, (F. E.) and C. W. ACKERSON: The antirachitic value of sardine oil for growing chicks. *Poultry Science*, 12, 31-33, (1933).
- MUSSEHL, (F. E.), M. J. BLISH and C. W. ACKERSON: Mineral metabolism of the growing chick. I. The effect of feeding excessive amounts of calcium and phosphorus. *Poultry Science*, 6, 239-242, (1927).
- MUSSEHL, (F. E.), R. S. HILL, M. J. BLISH and C. W. ACKERSON: Utilization of calcium by the growing chick. *J. Agr. Science*, 40, 191-199, (1930).
- MUSSEHL, (F. E.), R. HILL and J. A. ROSENBAUM: The antirachitic properties of irradiated feedstuffs. *Poultry Science*, 6, 25-30, (1926).

- MUSSEHL, (F. E.) and S. J. MARSDEN: Weak bones in crate fed poultry. *Poultry Science*, 7, 41-45, (1927).
- NELSON, (E. M.) and H. STEENBOCK: Fat soluble vitamins. 24. The non precipitability of the antiophthalmic and antirachitic properties from cod liveroil by digitonin. *J. biol. Chem.*, 64, 299-312, (1925).
- NONIDEZ, (J. F.): Studies on the bones in avian rickets. I. Bone lesions in chickens deprived of the antirachitic factor after five weeks of normal growth. *Amer. J. Pathol.*, 4, 463-480, (1928).
- NONIDEZ, (J. F.) and H. D. GOODALE: Histological studies on the endocrines of chickens deprived of ultraviolet light. Parathyroids. *Amer. J. Anat.*, 38, 319-347, (1927).
- NORRIS, (L. C.), G. F. HEUSER and H. S. WILGUS Jr.: Is the chief value of milk for feeding poultry due to the presence of a new vitamin? *Poultry Science*, 9, 133-140, (1929/30).
- NORRIS, (L. C.), G. F. HEUSER, H. S. WILGUS Jr. and A. T. RINGROSE: The occurrence in chicks of a paralysis of nutritive origin. *Poultry Science*, 10, 93-97, (1930/31).
- OBERLING, (CH.) et M. GUERIN: Lésions d'ostéite fibreuse chez la poule avec hypertrophie des parathyroïdes. *C. R. Soc. Biol.*, 108, 1134-1136, (1931).
- OBERLING, (CH.) et M. GUERIN: Nouvelles recherches sur les ostéites par carence chez les poules. *C. R. Soc. Biol.*, 112, 1288-1291, (1933).
- PAPPENHEIMER, (A. M.) and L. C. DUNN: Relation of leg weakness in growing chicks to mammalian rickets. *J. biol. Chem.*, 66, 717-729, (1925).
- PARK, (E. A.): The etiology of rickets. *Physiol. Review*, 3, 106-163, (1923).
- PARKHURST, (R. T.) and M. R. McMURRAY: The relation of calcium and phosphorus to growth and rachitic leg weakness in chickens. *J. Agric. Science*, 22, 874-882, (1932).
- PAYNE, (L. F.), J. S. HUGHES and H. F. LEINHARDT: The etiological factors involved in the malformation of bones in young chickens. *Poultry Science*, 11, 158-165, (1932).
- PLIMMER, (R. H. A.) and J. L. ROSEDALE: The rearing of chickens in the intensive system. Part I. The vitamin requirements. *Biochem. J.*, 16, 11-18, (1922).
- POULSSON, (E.): Ueber die Wirksamkeit von Dorschlebertran und bestrahlten Präparaten bei Rachitis. *Deutsche med. Wochenschr.*, 57, 664-667, (1931).
- REERINK, (E. H.) en A. VAN WIJK: De bereiding van vitamine D met behulp van ultraviolet licht. *Ned. Maandschrift v. Geneesk.*, N.R. 9, 1-26, (1930).
- ROHMER and DUBOIS: Mead Johnson Excerpts 881, (1931), geciteerd uit: *Poultry Science*, 10, 334, (1931).

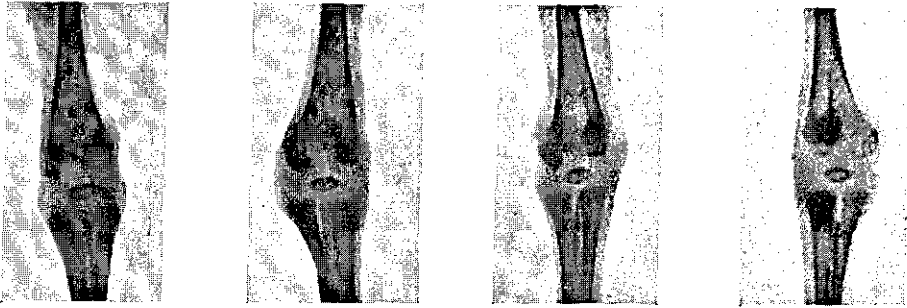
- ROSENHEIM, (O.) and T. A. WEBSTER: Relation of cholesterol and vitamin D. *Biochem. J.*, 21, 127-129, (1927, a.).
- ROSENHEIM, (O.) and T. A. WEBSTER: Rickets and cholesterol. *Lancet*, I, 1025-1026, (1925).
- ROSENHEIM, (O.) and T. A. WEBSTER: The parent substance of vitamin D. *Biochem. J.*, 21, 389-397, (1927, b.).
- RUSSEL, (W. C.) and D. KLEIN: The vitamin A content of a ration and the antirachitic potency of irradiated ergosterol. *Poultry Science* 10, 269-274, (1931).
- RUSSEL, (W. C.), M. W. TAYLOR and D. E. WILCOX: The fate of the antirachitic factor in the chicken. 2. The effectiveness of the factor administered by mouth and intraperitoneally. *J. biol. Chem.*, 99, 109-118, (1932).
- RYGH, (O.): La troisième vitamine D. *Z. f. Vitaminforschung*, 3, 164-167, (1934, a.).
- RYGH, (O.): Occurrence of antirachitic vitamin in green plants. *Nature*, 133, 255, (1934, b.).
- RYGH, (O.): The third vitamin D. *Nature*, 133, 533, (1934, c.).
- SANCTIS, (A. G. DE) and J. D. CRAIG: Comparative value of viosterol and cod liveroil as prophylactic antirachitic agents. *J. Amer. med. Assoc.*, 94, 1285-1286, (1930).
- SCHIEBLICH, (M.): Zur Wertbestimmung von Vitamin D Präparaten. *Biochem. Z.*, 265, 1-4, (1933).
- SCHOENHEIMER, (R.): New contribution in sterol metabolism. *Science*, 74, 579-584, (1931).
- SCHOENHEIMER, (R.) und H. DAM: Ueber Ergosterin-Resorption bei der legenden Henne. *Z. Physiol. Chem.*, 211, 241-245, (1932).
- SCHROEDER, (C. H.): Sexual differences in calcification and the effect on assays. *Poultry Science*, 12, 256-260, (1933).
- SHEEHY, (E. J.) and K. SHEIL: Vitamin D for chicks. The effect of an insufficient supply of vitamin D on growth of the skeleton and internal organs of chickens. *Proc. Royal Soc., Dublin*, 20, 173-179, (1932).
- SHERMAN, (H. C.) and S. L. SMITH: The Vitamins. *New York*, 2nd edition, (1931).
- SHERWOOD, (R. M.): Lime and phosphorus acid requirements for chicks. *Texas Agric. Exp. Sta. Bull.*, nr. 42, (1932).
- SHOHL, (A. T.), H. B. BROWN, C. S. ROSE and E. SAUERWEIN: Does the ratio of calcium to phosphorus of the diet determine, whether rickets is produced in the rat. *J. biol. Chem.*, 97; *Proc. Amer. Soc. Biol. Chemists*, XXVI, 10, (1932).
- STEENBOCK, (H.) and A. BLACK: Fat soluble vitamins. 23. The induction of growth promoting and calcifying properties in fats and their unsaponifiable constituents by exposure to light. *J. biol. Chem.*, 64, 263-298, (1925).
- STEENBOCK, (H.), E. B. HART, J. H. JONES and A. BLACK: The in-

- organic phosphorus and calcium of the blood used as criteria in the demonstration of the existence of a specific antirachitic vitamin. *J. biol. Chem.*, 58, 59-70, (1923).
- STEENBOCK, (H.), J. H. JONES and E. B. HART: Fat soluble vitamins. Stability of the antirachitic vitamin to saponification. *J. biol. Chem.*, 58, 383-393, (1923, b.).
- STEENBOCK, (H.), J. H. JONES and E. B. HART: Stability of vitamins in cod liveroil. *J. biol. Chem.*, 55; *Proc. Amer. Soc. Biol. Chemists*, XXVI, (1923, a.).
- STEENBOCK, (H.), S. W. F. KLETZIEN and J. G. HALPIN: The reaction of the chicken to irradiated ergosterol and irradiated yeast as contrasted with the natural vitamin D of fish liveroils. *J. biol. Chem.*, 97, 249-264, (1932).
- STEENBOCK, (H.), M. T. SELL and M. V. BUELL: Fat soluble vitamin. The fat soluble vitamin and yellow pigmentation in animal fats. *J. biol. Chem.*, 47, 89-109, (1921).
- SUPPLEE, (G. C.), R. C. BENDER and M. J. DORCAS: Irradiated milk. The amount of energy required to prevent rickets in chickens. *J. biol. Chem.*, 97, 63-69, (1932).
- SVIRBELY, (J. L.) and A. SZENT-GYOERGYI: Hexuronic acid as the antiscorbutic factor. *Nature*, 129, 576-577, (1932).
- TITUS, (H.): Perosis or deforming leg weakness in the chicken. *Poultry Science*, 10, 392, (1931).
- TITUS, (H. W.): Perosis or deforming leg weakness in the chicken. *Poultry Science*, 11, 117-125, (1932).
- TITUS, (H. W.) and W. M. GINN: Rice bran, a preventive of perosis (deforming leg weakness) in chickens. *Science*, 74, 249-250, (1931).
- TITUS, (H. W.), E. McNALLY and F. C. HILBERG: Effect of calcium carbonate and calcium sulphate on bone development. *Poultry Science*, 12, 5-8, (1933).
- TULLY, (W. C.), S. M. HAUGE, C. W. CARRICK and R. E. ROBERTS: Calcium and phosphorus requirements for growing chicks. I. Studies with salt mixtures under rachitic conditions. *Poultry Science*, 10, 299-309, (1931).
- TULLY, (W. C.), S. M. HAUGE, C. W. CARRICK and R. E. ROBERTS: Calcium and phosphorus requirements for growing chicks. II. Studies with natural minerals under rachitic conditions. *Poultry Science*, 10, 310-318, (1931).
- UBBELS, (P.): Kabeljaulebertran und künstlich bereitetes Vitamin D als Bestandteile von Kückenfutter: *Atti del V Congresso mondiale di pollicoltura, Roma, 2a Sezione*, n. 42, (1933).
- UBBELS, (P.): Kabeljauwlevertraan en kunstmatig bereid vitamine D als bestanddeelen van kuikenvoeder. *Mededeeling Landbouwoorlichtingsdienst* nr. 4, 18-31, (1934).
- VANEY, (GRACE M. DE), H. E. MUNSELL and H. W. TITUS: Effects of

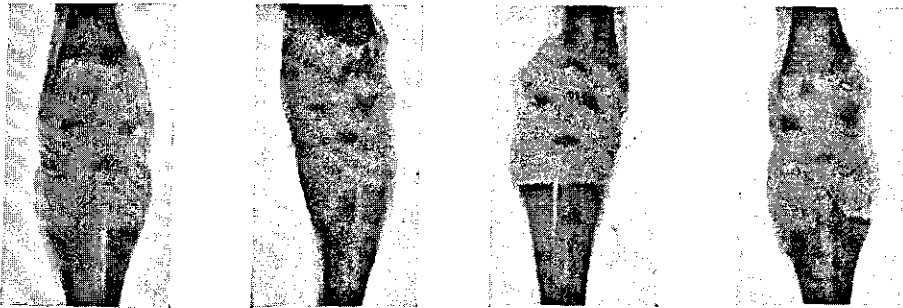
- sources of vitamin D on storage of the antirachitic factor in the egg. *Poultry Science*, 12, 215-222, (1933).
- VOET, (J.): Een onderzoek naar de waarde van enkele vitamine D preparaten voor kuikens en tevens naar de mogelijkheid vitamine D preparaten door middel van kuikens te standaardiseeren. *Dissertatie, Utrecht* (1934).
- WADDEL, (J.): The provitamin D of cholesterol. I. The antirachitic efficacy of irradiated cholesterol. *J. biol. Chem.*, 105, 711-738, (1934).
- WEIDLICH, (G.): Die Chemie des Vitamins D. *Z. f. Vitaminforschung*, 2, 253-266, (1933).
- WILGUS, Jr. (H. S.): The quantitative requirement of the growing chick for calcium and phosphorus. *Poultry Science*, 10, 107-117, (1931).
- WINDAUS, (A.) und A. HESS: Sterine und antirachitisches Vitamin. *Nachr. Gesell. f. Wiss., Göttingen*, 1926, 175-184, (1927).
- WOLFF, (L. K.): Vitaminen. 's-Gravenhage, (1932).
- WYMAN, (E. T.), A. D. HOLMES, L. W. SMITH, D. S. STOCKBARGER and M. G. PIGOTT: Does the irradiation of cod liveroil increase its antirachitic potency? *Amer. J. Diseases Child.*, 34, 753-764, (1927).
- YODER, (L.): An antirachitic derivative of cholesterol. *Science*, N.S. 80, 385-386, (1934).
- ZUCKER, (T. F.): Further observations on the chemistry of cod liveroil. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 20, 136, (1922).
- ZUCKER, (T. F.), A. M. PAPPENHEIMER and M. BARNETT: Observations on cod liveroil and rickets. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 19, 167-169, (1922).



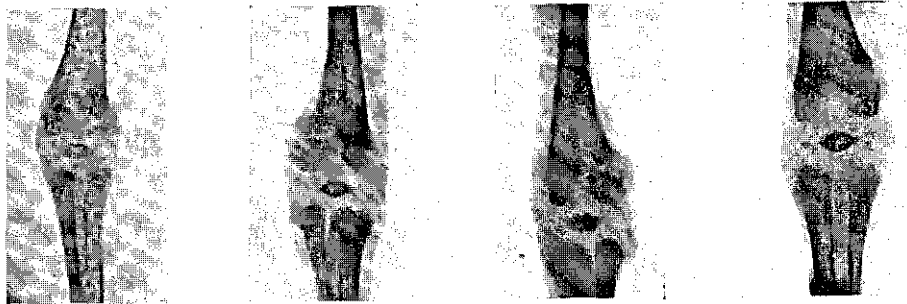
Grondrantsoen zonder vitamine D.
Basal ration without vitamin D.



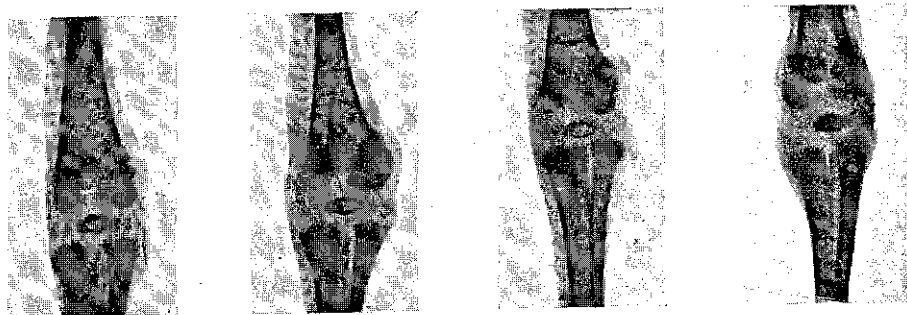
Grondrantsoen + 2% levertraan.
Basal ration + 2% cod liver oil.



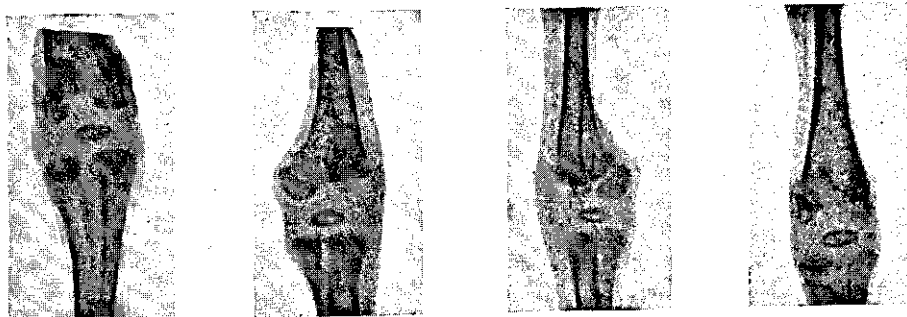
Grondrantsoen + calciferol = 2% levertraan.
Basal ration + calciferol = 2% cod liver oil.



Grondrantsoen + preparaat uit tonijnentraan = 2% levertraan.
 Basal ration + concentrate of tunny liver oil = 2% cod liver oil.



Grondrantsoen + bestraald cholesterol = 2% levertraan.
 Basal ration + irradiated cholesterol = 2% cod liver oil.



Grondrantsoen + bestraald cholesterol = 2% levertraan.
 ♥ Basal ration + irradiated cholesterol = 2% cod liver oil.

STELLINGEN.

1.

De normale maag-darm flora bij herkauwers moet niet worden beschouwd als schadelijk in den zin van Metschnikoff, maar als noodzakelijk voor een goede spijsvertering.

2.

Het in cholesterol voorkomende pro-vitamine D, dat door bestraling met ultraviolet licht antirachitisch werkzaam wordt, is geen ergosterol.

3.

De in de veeteelt algemeen gebruikelijke methode, de eigenschappen der dieren in morphologische kenmerken en physiologische eigenschappen te verdeelen, is onjuist.

4.

Het vitaminiseeren van melk is af te raden.

5.

Artikel 4 van de Wet van 30 December 1921, ter bestrijding van het bedrog in den handel in zaaizaad, kunstmest en voederstoffen, is noch in het belang van den consument, noch in dat van den producent.

6.

De meening van een bepaalde richting, die het uitsluitend gebruik van organische meststoffen voorstaat, dat de met kunstmest verbouwde voedermiddelen minderwaardig of zelfs nadeelig zouden zijn voor de gezondheid, in vergelijking met de in natuurmest verbouwde gewassen, mist allen grond.

7.

Om de isomeren α - en β -carotine te scheiden volgens de chromatographische analyse verdient gebluschte kalk volgens Karrer de voorkeur boven het door Kuhn en Winterstein gebruikte aluminium-oxyde.

8.

De bepaling van het aschgehalte in de beenderen is, als criterium voor rachitis, zoowel bij ratten als kuikens onbruikbaar.

9.

Het melkgebrek „sterk” wordt door de werking van een enzym, de oleinase, veroorzaakt, waardoor in het melkvet chemische veranderingen plaats vinden.

10.

Met de A.I.V. methode is nog niet het ideaal van groenvoederconserveering bereikt.

11.

Zoowel uit wetenschappelijk oogpunt, als ook voor den handel in voederstoffen, is het van groot belang, dat een regeling tot stand komt, waarbij de benaming, omschrijving, grenscijfers en onderzoekingsmethoden voor voederstoffen internationaal worden vastgesteld.