

**MEDEDELINGEN VAN DE LANDBOUWHOGESCHOOL  
WAGENINGEN • NEDERLAND • 65-8-(1965)**

**OVER VLUCHTIGE VETZUREN IN HET BLOED  
EN OVER DE PATHOGENESE VAN  
ACETONAEMIE BIJ RUNDEREN**

*(With a summary)*

**J. H. AAFJES**

*Afdeling Fysiologie der Dieren  
Landbouwhogeschool, Wageningen, Nederland*

*(Ontvangen/Received 25-VI-1965)*

**H.VEENMAN & ZONEN N.V.-WAGENINGEN-1965**

20419167

Mededelingen van de Landbouwhogeschool,  
Wageningen, 65-8 (1965)  
is ook gepubliceerd als dissertatie

# INHOUD

1. INLEIDING . . . . .	1
2. VLUCHTIGE VETZUREN IN HET BLOED VAN HERKAUWERS . . . . .	5
2.1. Literatuur . . . . .	5
2.2. Analysemethoden . . . . .	6
2.2.1. Bepaling van vvz (vluchtige vetzuren) in bloed . . . . .	6
2.2.2. Bepaling van vvz in pensvocht . . . . .	8
2.2.3. Bepaling van glucose in bloed . . . . .	8
2.2.4. Bepaling van ketonlichamen in bloed . . . . .	9
2.2.5. De chromatografie . . . . .	9
2.2.6. De stoomdestillatie . . . . .	12
2.2.7. Aanvullende opmerkingen . . . . .	13
2.2.8. De nauwkeurigheid der bepalingen . . . . .	13
2.3. Uitkomsten . . . . .	14
2.3.1. Proeven met Ina . . . . .	14
2.3.2. Invloed van 'emotie' . . . . .	28
2.3.3. Invloed van adrenaline en noradrenaline . . . . .	31
2.3.4. Bepalingen bij kalveren . . . . .	33
3. ACETONAEMIE . . . . .	38
4. BESPREKING VAN DE UITKOMSTEN . . . . .	53
4.1. Betrekking tussen de vvz-gehalten van pensvocht en bloed . . . . .	53
4.1.1. De onderlinge betrekkingen tussen de vvz in het pensvocht . . . . .	53
4.1.2. De onderlinge betrekkingen tussen de vvz in het bloed . . . . .	56
4.1.3. Onderlinge betrekkingen tussen de vvz in het pensvocht en die in het bloed . . . . .	61
4.1.3.1. Zonder toevoeging van zuren aan de pensinhoud . . . . .	61
4.1.3.2. Met toevoeging van zuren aan de pensinhoud . . . . .	66
4.1.4. Evenwicht tussen vorming en afvoer van vvz . . . . .	67
4.2. Acetonaemie . . . . .	69
SAMENVATTING . . . . .	73
SUMMARY . . . . .	76
LITERATUUR . . . . .	79

## 1. INLEIDING

'The quantitative chemical physiology of the ruminant is still far from complete'

T. M. SUTHERLAND, 1963

Een meer dan normale hoeveelheid ketonlichamen in het bloed, acetonaemie, is een symptoom van verschillende ziekten, die bij mens en dier worden aange troffen. In een aantal gevallen heeft dit symptoom van oudsher zó sterk de aandacht getrokken, dat men ook de ziekten, waarvan de acetonaemie eigenlijk maar een symptoom is, met dezelfde naam 'acetonaemie' heeft bestempeld. Het is er mee als met het woord 'koorts'. Vroeger duidde men daarmee niet enkel een verhoging van de lichaamstemperatuur aan, maar ook de ziekte malaria, waarvan de koorts een der opvallendste verschijnselen is.

De aanduiding met het woord acetonaemie is gebruikelijk bij een bepaalde stofwisselingsziekte van het rund: 'slepende melkziekte', ook wel ketonaemie, acetonurie, ketonurie of ketose genoemd. Deze ziekte is niet alleen belangwekkend door haar symptomatologie, maar bovendien van groot economisch belang. Een koe, die aan slepende melkziekte lijdt, kan namelijk in één lactatieperiode wel 500 tot 800 liter melk minder geven (Verslag over de Landbouw in Nederland over 1962), waardoor jaarlijks vele honderdduizenden liters melk minder worden geproduceerd dan zonder deze ziekte het geval zou zijn geweest. Bestudering van de stofwisseling der acetonlichamen en wat daarmee samenhangt, moet dan ook belangrijk worden geacht.

Aangenomen kan worden, dat het symptoom acetonaemie ontstaat doordat in de lever te veel ketonlichamen worden gevormd (SOSKIN en LEVINE, 1947). Hierbij speelt de koolhydraatstofwisseling een belangrijke rol. De huidige opvatting hieromtrent is, dat bij onvoldoende koolhydraat een overmatige hoeveelheid vetzuren met lange koolstofketen uit het vetweefsel, voornamelijk gebonden aan albumine (N.E.F.A.), in de circulatie komt (FRITZ, 1961). Uit deze overmaat niet veresterde vetzuren ontstaan in de lever ketonlichamen.

Centraal in deze redenering staat de beschikbaarheid van glucose voor het vetweefsel; is deze 'te gering', dan ontstaat acetonaemie. Nu kan een tekort aan glucose op zeer verschillende wijze tot stand komen, vandaar dat het symptoom acetonaemie onder tal van omstandigheden kan worden waargenomen.

De bekendste afwijking, waarbij acetonaemie kan optreden, is de diabetes. Hoewel hoge bloedsuikergehalten kenmerkend zijn voor deze ziekte, staat het wel vast, dat in sommige weefsels toch onvoldoende glucose kan binnendringen. Hiertoe behoort het vetweefsel.

Bij andere afwijkingen, die gepaard gaan met acetonaemie, is meestal het gehalte aan glucose in het bloed laag. Bekende voorbeelden hiervan zijn de acetonaemie bij vasten en bij glucosurie door phloridzine. Dat hierbij een glucosetekort zal ontstaan, is zonder meer duidelijk. Een laag glucosegehalte in het bloed komt ook voor bij de acetonaemie van het rund.

De acetonaemie, die optreedt bij ondervoeding van schapen aan het eind van de dracht (pregnancy toxemia), vooral als zich twee of meer lammeren in de baarmoeder bevinden, gaat eveneens gepaard met een hypoglycaemie. Naar de mening van REID (1960a) zou hierbij sprake zijn van een 'steroid-diabetes'; de desondanks bestaande hypoglycaemie zou een gevolg zijn van de grote koolhydraatopname door de vrucht(en).

Een vergelijkbaar ziektebeeld verkregen BERGMAN en SELLERS (1960) bij guinese biggetjes door ze gedurende drie dagen te laten vasten in de laatste weken der dracht. Ook hierbij hadden de dieren met het grootste aantal vruchten de ernstigste verschijnselen. Niet-drachtige dieren toonden bij vasten slechts een geringe daling van het bloed-glucosegehalte, maar geen acetonaemie.

Bij koeien is eveneens 'pregnancy disease' waargenomen (KINGREY e.a., 1957). Hierbij werden alleen die dieren ziek, die tweelingen droegen. De meest voorkomende vorm van acetonaemie bij koeien is echter die, welke optreedt na het kalven: slepende melkziekte, waarop in hoofdstuk drie teruggekomen wordt.

Naast de beschikbaarheid van glucose speelt ook de toestand waarin het vetweefsel zich bevindt, een belangrijke rol bij de vorming van ketonlichamen. Zo veroorzaakte pancreatetectomie bij ratten, waarvan het vetweefsel door vasten was uitgeput, vrijwel geen acetonaemie (SCOW en CHERNICK, 1960), in tegenstelling tot hetgeen bij normaal gevoede dieren werd gezien. Ook de volgende waarnemingen, gedaan bij een koe met diabetes, vinden hierin waarschijnlijk een verklaring. Dit dier had, toen het in ons laboratorium werd gebracht, een ernstige acetonaemie: aceton plus acetyl-azijnzuur 77 mg/100 ml, bèta-hydroxy-boterzuur 46 mg/100 ml. Het bloedsuikergehalte bedroeg 170 mg/100 ml. De voedingstoestand was redelijk; maar werd in de loop van de tijd ondanks voortdurende insuline-toediening steeds slechter; het gewicht daalde van 340 naar 290 kg. Tenslotte werd de insuline-toediening gestaakt. Daarna steeg wel weer het bloedsuikergehalte tot ruim 200 mg/100 ml; er trad echter geen acetonaemie op. Bij de sectie werden geen andere afwijkingen gevonden dan een sterke vermagering; histologisch onderzoek leerde, dat er atrofie was van de eilandjes van Langerhans.

In overeenstemming hiermee is voorts, dat slepende melkziekte vooral optreedt bij dieren die in een goede tot zeer goede voedingstoestand verkeren.

Tenslotte speelt ook de toestand, waarin de lever zich bevindt, een rol bij de vorming van ketonlichamen. Bij ernstige vormen van slepende melkziekte verliest de lever het vermogen om ketonlichamen te vormen (KUDRYAVTSEV, 1959).

Bij de onderzoeken, waarover in het volgende verslag wordt uitgebracht, werden de vluchtige vetzuren bestudeerd, omdat zij voor de fysiologie van de herkauwers van veel belang zijn en omdat daardoor vermoedelijk een beter inzicht in het wezen der acetonaemie kan worden verkregen. Daarbij hebben de volgende overwegingen een belangrijke rol gespeeld.

De samenstelling van de Nederlandse melk is goed bekend (MULDER, e.a., 1959). Voor de gemiddelde samenstelling geeft het Zuiveljaarboek 1963-'64 op:

Water	87,4%
Droge stof	12,6%
Vet	3,8%
Eiwit	3,3%
Melksuiker	4,6%
As-bestanddelen	0,9%

De samenstelling van het voeder, waaruit een koe deze melk moet maken, is eveneens bekend. Uitgebreide gegevens hierover vindt men bijv. in de Veevoedertabel 1957 en in het boek van KELLNER-BECKER (1959). Ook omtrent de hoeveelheden voeder, die nodig zijn voor onderhoud en melkproductie, zijn opgaven voorhanden (Voedernormen voor de landbouwhuisdieren en voederwaarden der veevoerders, 1964). Een rantsoen van bijvoorbeeld 7 kg goed hooi, 20 kg matig kuilgras en 2 kg A-koek per dag is voldoende voor een koe die 550 kg weegt en 10 kg melk met 3,75% vet produceert. Geeft deze koe 20 kg melk, dan behoort zij daarvoor ongeveer 4 kg A-koek meer te ontvangen. Voor 2,5 kg melk is derhalve  $\pm$  één kg krachtvoer (A-koek) nodig.

Een kg A-koek is bijvoorbeeld als volgt samengesteld:

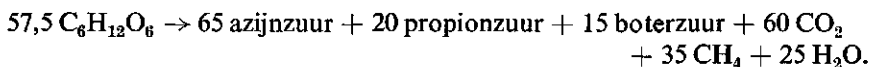
- 50 g lijnkoek,
- 100 g katoenzaadkoek,
- 50 g raapschroot,
- 100 g maisglutenvoermeel,
- 250 g mais,
- 220 g rogge,
- 100 g tarwegries,
- 100 g melasse en
- 30 g mineralen, zouten en vitaminen.

Met behulp van de Veevoedertabel (1957) werd berekend dat dit overeenkomt met

- 143 g vre (verteerbaar ruw eiwit),
- 28 g vrv (verteerbaar ruw vet),
- 20 g vrc (verteerbare ruwe celstof),
- 490 g vok (verteerbare overige koolhydraten).

Zoals bekend komt het voeder, dat een koe opneemt, terecht in de pens, een groot fermentatie-vat, alwaar, door de gezamenlijke werking van bacteriën en protozoën aanzienlijke omzettingen plaats vinden. Vooral de koolhydraten en eiwitten worden hier voor een groot deel omgezet. Daarbij ontstaan aanzienlijke hoeveelheden vluchtige vetzuren, vooral azijnzuur, propionzuur en boterzuur.

WOLIN (1960) geeft voor het ontstaan van deze vetzuren de volgende theoretische vergelijking (in molen), waarbij hij uitgaat van glucose:



Worden de 510 g vrc + vok uit een kg A-koek omgezet zoals de glucose in deze vergelijking, dan ontstaan 192 g azijnzuur, 71 g propionzuur en 62 g boterzuur, dat wil zeggen 254 g vet plus 71 g koolhydraat, als wij aannemen, dat propionzuur geheel ter beschikking komt als koolhydraat. Er rest dus van een kg A-koek na omzetting van de rc en de ok in de pens:

71 g koolhydraat (propionzuur),  
282 g vet (vrv, azijnzuur en boterzuur),  
143 g eiwit (vre).

Daaruit moet worden gevormd, 2,5 kg melk met:

115 g koolhydraat,  
95 g vet en  
82,5 g eiwit,

voorwaar geen geringe prestatie, vooral als daarbij bedacht wordt, dat vet (behalve het glycerol-deel van het molecule) niet kan worden omgezet in koolhydraat.

Duidelijk blijkt uit deze oversimplificatie, dat de omzettingen in de pens en de vorming van vluchtige vetzuren daarbij, van groot belang zijn voor de fysiologie van het rund in het algemeen en van het lacterende rund in het bijzonder.

Over de gehalten van de vluchtige vetzuren (in het vervolg met vvv aangeduid) in het pensvocht van koeien zijn reeds vele onderzoeken verricht. Omtrent het voorkomen van deze zuren in het bloed minder, omdat de gehalten hierin veel lager zijn en daarom moeilijker te bepalen.

In dit verslag worden de uitkomsten vermeld van een onderzoek vooral naar de vvv in het bloed.

## 2. VLUCHTIGE VETZUREN IN HET BLOED VAN HERKAUWERS

### 2.1. LITERATUUR

In 1944 publiceerde McCLENDON een methode voor de bepaling van vvz (vluchtige vetzuren) in kleine hoeveelheden bloed. Hij maakte gebruik van stoomdestillatie in een speciaal toestelletje en titreerde daarna in het destillaat het totaal der vvz. In mensen- en hondenbloed was de concentratie 0,0003 N, waarvan ten minste 90% azijnzuur zou zijn. Rekenen wij dat alles azijnzuur is, dan komt dit neer op 18 mg per l.

CIARANFI en FONNESU (1952) vonden met een photometrische micromethode in het arteriele bloed van schapen 46–88 mg azijnzuur per l.

Daarvóór had McCLYMONT (1951) reeds gepubliceerd over bepalingen van vvz in het bloed van koeien en andere dieren. Hij maakte daarbij gebruik van stoomdestillatie, titratie van de totale hoeveelheid gedestilleerd zuur en identificatie van de afzonderlijke zuren door middel van vloeistofchromatografie. In het arteriele bloed van schapen vond hij in totaal 80 mg vvz per l, waarvan de verdeling als volgt was: 93,0% azijnzuur, 2,3% propionzuur, 1,1% boterzuur en 3,6% hogere vetzuren.

Na de voeding was er een duidelijke toeneming van de hoeveelheid vvz in het bloed, die na 2–5 uur overging in een geleidelijke daling. Bij hoge gehalten in het bloed werden meer vvz in de uier opgenomen dan bij lage, hetgeen volgde uit de arterio-veneuze verschillen. Van belang is, dat deze onderzoeker meedeelt, dat er slechts sporen veresterde lagere vetzuren in het bloed voorkomen.

In 1952 werd door JAMES en MARTIN de gaschromatografie ingevoerd bij gelegenheid van een onderzoek naar de scheiding der vvz. Deze methode vond daarna uitgebreide toepassing, vooral voor de bepaling van de vvz in pensvocht. ANNISON (1954) gebruikte haar voor een onderzoek naar het voorkomen van mierenzuur. In het bloed van schapen bleek 10–30% van de vvz hieruit te bestaan. In het bloed van geiten, koeien, paarden, konijnen, katten, honden en mensen bleken overeenkomstige hoeveelheden mierenzuur voor te komen. Het werd niet waarschijnlijk geacht, dat dit mierenzuur afkomstig was uit het maag-darmkanaal. Gebruik van dit zuur door de melkgevende uier van een geit of door de kop van een schaap kon niet duidelijk worden aangetoond.

De gehalten aan vvz, die deze onderzoekers opgeven, stemmen over het algemeen overeen met die van anderen. Zo vonden CRAINE en HANSEN (1952) in het veneuze bloed van geiten 27–43 mg azijnzuur per l en 12–24 mg propionzuur + boterzuur. Bij jonge geiten waren deze gehalten lager, vermoedelijk ten gevolge van de nog niet ontwikkelde pensfunctie.

REID (1950) vond in het veneuze bloed van schapen per l 48–90 mg azijnzuur, 0,7–4,4 mg propionzuur en 3,5–6,2 mg boterzuur. Bij lammeren waren deze gehalten wederom lager (REID, 1953). In 1957 echter deelden twee japanse onderzoekers (SHIBATA en UMETSU) mede, dat er naast deze vvz in vrije toestand ook nog aanzienlijke hoeveelheden veresterd in het bloed van herkauwers voorko-



men, dit in tegenstelling tot hetgeen McCLYMONT had gevonden. Zij maakten gebruik van een methanol-extractie en vonden na hydrolyse wel tot 600 mg azijnzuur per l.

Vervolgens deelden HOLTER en LAKSHMANAN in 1959 mede, dat zij, gebruik makend van een isotopen-verdunningsmethode, in het veneuze bloed van koeien méér vvz vonden dan gewoonlijk wordt opgegeven. Zij vonden 2,5 uur na de voeding nl. een stijging tot 238 mg azijnzuur per l.

Min of meer in overeenstemming hiermee vonden SABINE en CONNOR JOHNSON (1960) met behulp van vloeistofchromatografie (zonder destillatie) in het veneuze bloed van koeien 90–300 mg azijnzuur per l. Zij vermeldden tevens, dat het azijnzuurgehalte van het bloed bij bewaren snel daalt: na 2, 22 en 51 uur bedroeg de daling achtereenvolgens 23%, 73% en 90%.

BENSADOUN (1960) vermeldde in zijn proefschrift over de opneming van vvz uit het maagdarmlkanaal bij schapen echter waarden, die geheel overeenstemmen met de vroegere waarnemingen. Hij maakte voor zijn bepalingen gebruik van stoomdestillatie, gevolgd door gaschromatografie.

Samenvattend kan men zeggen, dat de meeste onderzoekers in het bloed van niet vastende herkauwers per l 40–100 mg vrije vluchtige vetzuren vinden. Hier van is ongeveer 80–90% azijnzuur; de rest is voornamelijk mierenzuur. Voor propionzuur en boterzuur worden, zo ze al bepaald zijn, zeer geringe hoeveelheden opgegeven. ANNISON vermeldde, dat bij verwerken van grotere hoeveelheden bloed alle vluchtige vetzuren, die in pensvocht voorkomen, ook in het bloed kunnen worden aangetoond.

De totale hoeveelheden vvz in het bloed blijken voorts te variëren in verband met de voeding en wel ten gevolge van de fermentatie in de pens. Bij vasten dalen de gehalten. Bij jonge dieren zijn zij lager door de nog weinig of niet ontwikkelde penswerking. In het arterieele bloed zijn de gehalten hoger dan in het veneuze bloed ten gevolge van opname door de weefsels in kop, uier enz.

## 2.2. ANALYSEMETHODEN

### 2.2.1. Bepaling van vvz (vluchtige vetzuren) in bloed

Van het met heparine onstolbaar gemaakte bloed werd 20 ml onteiwit met meta-fosforzuur (ANNISON, 1954): 20 ml bloed + 70 ml gedest. water + 10 ml 25% meta-fosforzuur. Na tenminste 20 min. staan werd afgefiltreerd met behulp van een büchnertrichter en een waterstraal-zuigpomp. Wanneer het neerslag op het filter juist droog was, werd het twee maal gewassen met een kleine hoeveelheid gedestilleerd water, in totaal  $\pm$  25 ml. Het filtraat werd daarna zorgvuldig in twee gelijke delen verdeeld, die als duplo afzonderlijk werden gedestilleerd en gechromatografeerd.

De isolatie van de vvz geschiedde door stoomdestillatie als volgt (zie fig. 1 voor de gebruikte opstelling).

In het begin van de destillatie laat men het water in de kolf A, waarin de stoom gevormd wordt, zacht koken, terwijl het filtraat langzaam toevloeit uit de

FIG. 1 Opstelling der stoomdestillatie.

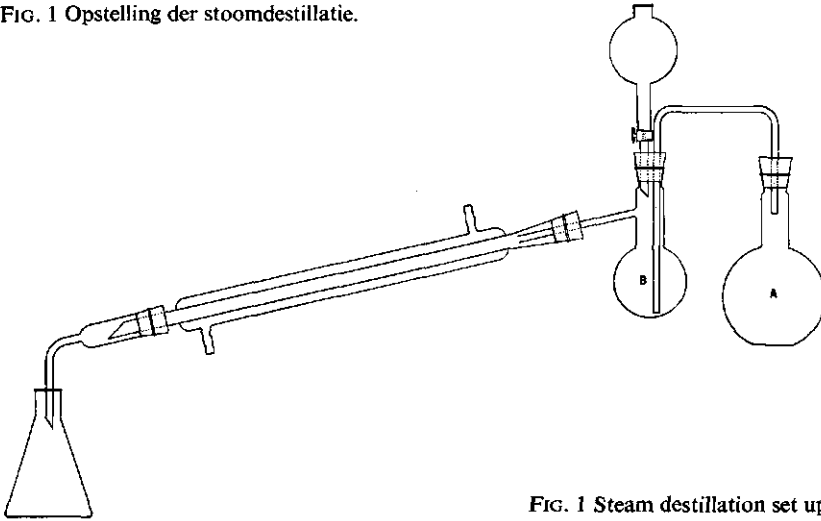


FIG. 1 Steam distillation set up.

scheitrechter in de fractioneerkolf B. Het volume in deze kolf wordt op ongeveer 10 ml gehouden, terwijl de inhoud flink kookt. Is al het filtraat toegevoegd, dan wordt de kraan van de scheitrechter dicht gedraaid en meer stoom toegevoerd door de vlam onder kolf A zo groot mogelijk te maken en die onder de fractioneerkolf zó klein, dat het volume hierin ongeveer 10 ml blijft. Er wordt gedestilleerd tot 250 ml verzameld is in de opvangerlenmeyer, waarin van te voren 1 ml NaOH 0,1 N + 1 druppel fenolftaleïne 0,5% zijn gedaan. Blijkt het destillaat na afloop kleurloos te zijn, dan wordt loog toegevoegd, totdat de kleur weer duidelijk rood is.

Vervolgens wordt het destillaat ingedampt tot een klein volume, dan overgebracht in een kleine reageerbuis van 8 cm lang en 1 cm diameter, waarin het tenslotte geheel wordt droog gedampt door het buisje in kokend water te plaatsen en lucht over de inhoud te zuigen.

De chromatografie werd uitgevoerd met behulp van een gaschromatograaf (Becker, Delft), voorzien van een vlamionisatie-detector. Voor de scheiding werd een roestvrije stalen buis van 1 m lengte en een inwendige doorsnee van 4 mm gebruikt, gevuld met 20% Tween 80 op chromosorb (EMERY en KOERNER, 1961). Draaggas was stikstof, verzadigd met mierenzuur (ACKMANN en BURGHER, 1963), welk gas in een hoeveelheid van 125 ml per min. werd doorgeleid; de temperatuur bedroeg 128°C.

Oplossingen, die gechromatografeerd moesten worden, werden niet rechtstreeks op de kolom gebracht, maar in een afzonderlijk op  $\pm 200^{\circ}\text{C}$  verwarmd aanvoerstukje gespoten, waarin zij snel verdampen. Dit aanvoerstukje bestond uit een koperen buisje van  $\pm 10$  cm lengte en een inwendige doorsnede van 1 mm, waarin een volledige krul was gelegd met een diameter van ongeveer 7 mm (inwendig). De koppelingen van dit buisje waren zodanig, dat verwijderen en schoonmaken vrij eenvoudig mogelijk waren.

Alvorens de vetzuren worden gechromatografeerd, moeten zij worden opgelost en vrij gemaakt uit de zouten. Dit gebeurde door met behulp van een pipetje 0,2 ml van een fosforzuuroplossing (10 ml 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  in 100 ml gedest. water) toe te voegen aan het droog gedampde destillaat in het reageerbuisje. Daarna werd flink geroerd met een glazen staafje. Van de verkregen oplossing, waarin de concentratie aan v.v.z. 50 maal zo hoog is als in het oorspronkelijke bloed, werd met behulp van een injectiespuit (Hamilton 50  $\mu\text{l}$  met Chaney adapter) 25  $\mu\text{l}$  in de chromatograaf gespoten. Voor het maken van een chromatogram was 12 min. nodig.

Regelmatig werden ook chromatogrammen gemaakt van een standaardoplossing, die 3000 mg azijnzuur, 100 mg propionzuur en 100 mg boterzuur per l bevatte. Dit geschiedde in elk geval voor en na een serie bloedmonsters, soms ook nog enkele malen er tussen door. Aan deze standaardoplossing was wat fosforzuur toegevoegd (5 ml 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  in 100 ml).

De pieken van azijnzuur werden gemeten met de tellende integrator van het apparaat. De pieken van boterzuur en propionzuur werden uit het chromatogram geknipt en gewogen.

Uit de verhouding van de piek-oppervlakken (-gewichten) van de standaardchromatogrammen en de chromatogrammen der monsters konden de v.v.z.-gehalten van deze laatsten worden berekend. Deze zijn daardoor alle uitgedrukt in hoeveelheden vrij zuur.

Opgemerkt moet nog worden, dat de vlamionisatie-detector ongevoelig is voor mierenzuur; dit zuur blijft daardoor geheel buiten beschouwing.

In de paragrafen 2.2.5. en 2.2.6 zal nader op de chromatografie en de stoomdestillatie worden ingegaan.

### 2.2.2. *Bepaling van v.v.z. in pensvocht*

De monsters pensvocht werden verzameld met behulp van een sonde door de bek of, als er een pensfistel aanwezig was, via deze fistel. Het pensvocht werd onmiddellijk nadat het verkregen was, aangezuurd met fosforzuur (1 ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$  op 25 ml pensvocht). Na enige tijd staan of bewaren in de ijskast bij 4°C werd van de bovenstaande vloeistof 25  $\mu\text{l}$  zonder verdere behandeling in de gaschromatograaf gespoten. De verkregen chromatogrammen werden vergeleken met chromatogrammen van een standaardoplossing, die 4 g azijnzuur, 1 g propionzuur en 1 g boterzuur per l bevatte. Aan deze oplossing was eveneens wat fosforzuur toegevoegd, zodat de concentratie ongeveer overeen kwam met die van het aangezuurde pensvocht. De piekoppervlakken van het azijnzuur, propionzuur en boterzuur werden gemeten met de integrator.

### 2.2.3. *Bepaling van glucose in bloed*

Glucose werd bepaald met de anthron-methode (HANSEN, 1960) met enkele wijzigingen in verband met de lage bloedsuikergehalten in het bloed van koeien.

Het bloed werd opgevangen in een flesje met wat vast NaF (10 mg per ml) en onteiwit met  $\text{Ba}(\text{OH})_2\text{-ZnSO}_4$ : 4 ml bloed + 8 ml water + 4 ml  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -opl.

+ 4 ml  $ZnSO_4$ -opl. (5%). De oplossingen van  $Ba(OH)_2$  en  $ZnSO_4$  waren van een zodanige concentratie, dat zij elkaar juist neutraliseerden (MAYES en ROBSON, 1957). Van het filtraat werd 1 ml gebruikt voor de kleurreactie met 5 ml van het anthronreagens.

#### 2.2.4. Bepaling van ketonlichamen in bloed

Hiervoor werd de methode gebruikt, die beschreven is door REID (1960b), echter met dit verschil, dat de kleurreactie met salicyl-aldehyde niet werd uitgevoerd in een waterbad, maar bij kamertemperatuur gedurende één nacht in het donker. Bij deze methode wordt bèta-hydroxy-boterzuur geoxydeerd tot aceton en als zodanig bepaald. De uitkomsten der bepalingen zijn daarom opgegeven in mg aceton per 100 ml bloed.

#### 2.2.5. De chromatografie

De hoeveelheden vvez, die in het bloed voorkomen, zijn gering. Bovendien is de verhouding, waarin de verschillende zuren aanwezig zijn, ongunstig voor de chromatografie. Een normale waarde voor azijnzuur is bijv. 50 mg per l, voor propionzuur en voor boterzuur 1 mg per l. Niettemin bleek het tenslotte mogelijk bevredigende chromatogrammen te maken.

Oorspronkelijk werd begonnen met het maken van chromatogrammen van oplossingen der vvez in aceton. De vluchtigheid van dit oplosmiddel was echter een groot bezwaar. Bovendien veroorzaakte de piek van de aceton op het chromatogram moeilijkheden bij geringe concentraties vvez; de azijnzuurpiek viel dan in de afloop der acetonpiek.

Daar water geen invloed heeft op de vlamionisatiedetector, leek dit oplosmiddel geschikter. Bij gebruik hiervan werd echter veel last ondervonden van adsorptieverschijnselen. Werd, na een oplossing van vvez, water in de chromatograaf gespoten, dan ontstonden nl. toch piekjes van vvez, omdat het water geadsorbeerd zuur, afkomstig van de vorige injectie, vrij maakte. Gelukkig verscheen tijdens deze proeven een publikatie van ACKMANN en BURGHER (1963), waaruit

FIG. 2 Chromatogram van de vvez, geïsoleerd uit bloed.

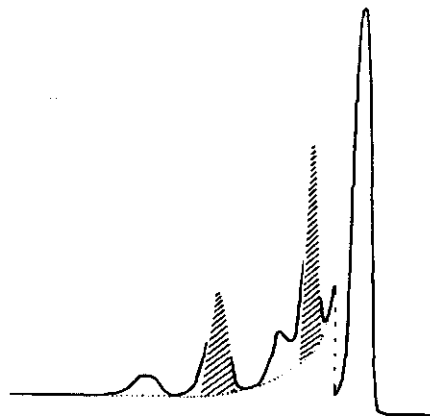


FIG. 2 Chromatogram of the volatile fatty acids (vfa) obtained from blood.

bleek, dat mierenzuur in het draaggas dit verschijnsel onderdrukt. Voorts werd gevonden, dat met stikstof als draaggas grotere pieken werden verkregen dan met waterstof. Tenslotte werden de bepalingen uitgevoerd zoals in 2.2.1. is beschreven.

Hiermee bleek het mogelijk zelfs kleine hoeveelheden v.v.z. betrouwbaar te meten; de verhouding tussen de ingespoten hoeveelheid en de piek-grootte is lineair. Dit bleek, wanneer van de standaardoplossingen der v.v.z. verdunningen werden gemaakt en deze in triplo werden gechromatografeerd. Zoals reeds eerder is vermeld, werden de pieken van azijnzuur met de integrator gemeten en die van propionzuur en boterzuur uitgeknipt en gewogen. Voor dit laatste is het noodzakelijk de basislijn van deze pieken, die gevormd wordt door de afloop der azijnzuurpiek, zo goed mogelijk te construeren. Dit werd gedaan met behulp van tekenmallen voor kromme lijnen (zie fig. 2).

De gemiddelde piekgewichten van propionzuur en boterzuur werden in fig. 3 uitgezet tegen de concentraties dezer zuren, uitgedrukt in mg/l. Voor de vermelde concentraties geldt, dat 100 mg/l standaardoplossing overeen komt met een bloedconcentratie van 2 mg/l, zowel voor propionzuur als voor boterzuur, omdat de v.v.z.-gehalten van het bloed immers  $50 \times$  werden geconcentreerd.

De gemiddelde integratorwaarden, bepaald voor azijnzuur, werden in fig. 4 uitgezet tegen de concentraties; een standaardoplossing van 4 g/l komt overeen met een bloedconcentratie van 80 mg/l azijnzuur.

De figuren laten zien, dat de piek-oppervlakken van azijnzuur en ook die van propionzuur en boterzuur recht evenredig zijn met de concentraties.

Het is van belang er op te wijzen, dat het gebruik van een fosforzuuroplossing ter aanzuring van de drooggedampte v.v.z.-zouten aanleiding geeft tot ophoping van dit zuur (en zouten) in het aanvoerpipje naar de kolom (zie 2.2.1). Dit heeft tot gevolg, dat op den duur de pieken van de v.v.z. kleiner worden, hetgeen vooral geldt voor chromatogrammen van de v.v.z. uit bloed. Daarom werd na iedere duplo-bepaling het aanvoerpipje verwijderd en doorstroomd met heet water uit een geysier. Op deze wijze bleek het mogelijk het voortdurend afnemen der piek-hoogten te voorkomen. Dit is in feite de reden, die tot de constructie van het aan-

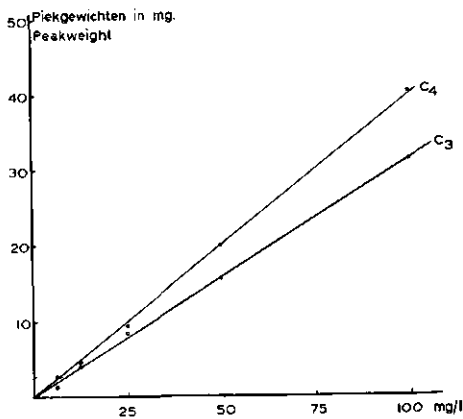


FIG. 3 Betrekking tussen de concentraties van propionzuur- en boterzuuroplossingen waarvan 25  $\mu$ l in de gaschromatograaf werd gespoten en de gewichten van de uit de verkregen chromatogrammen geknipte pieken van deze zuren. C<sub>3</sub> is propionzuur en C<sub>4</sub> is boterzuur.

FIG. 3 Relationship between the concentrations of propionic and butyric acid solutions from which 25  $\mu$ l was injected into the gas chromatograph and the peak weights of these acids cut out of the obtained chromatograms. C<sub>3</sub> = propionic acid and C<sub>4</sub> = butyric acid.

FIG. 4 Betrekking tussen de concentraties van azijnzuuroplossingen waarvan 25  $\mu$ l in de gaschromatograaf werd gespoten en de met een integrator gemeten grootte der azijnzuurpieken.

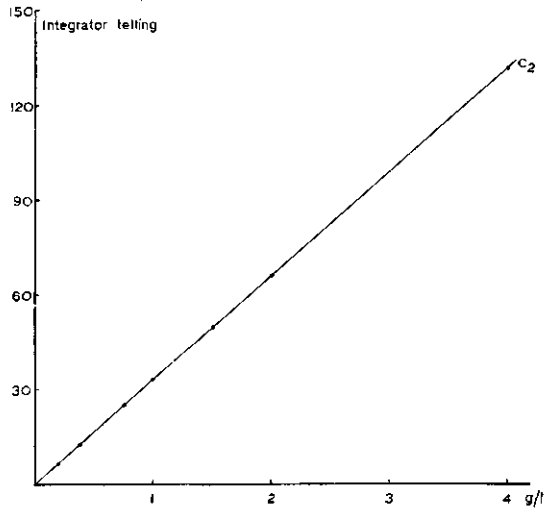


FIG. 4 Relationship between the concentrations of acetic acid solutions of which 25  $\mu$ l was injected into the gas chromatograph and the resultant peak areas measured with a numerical integrator.

voerpijpe met krul leidde. In de krul toch wordt het taai vloeibare fosforzuur als het ware weggevangen.

Ter illustratie van het oplossend vermogen dezer chromatografie wordt in fig. 5 een chromatogram weergegeven van een mengsel van alle vluchtige vetzuren tot en met valeriaanzuur, opgelost in water. Deze grafiek dient afgelezen te worden van rechts naar links; azijnzuur veroorzaakt nl. de eerste piek rechts.

Wordt hiermee een chromatogram van de vtz uit bloed vergeleken (fig. 2), dan blijkt het volgende:

1. Azijnzuur is de belangrijkste component van het mengsel vtz uit bloed.
- Om toch nog redelijk grote pieken te krijgen van de overige vtz in bloed is het

FIG. 5 Chromatogram van een oplossing in water van de vtz tot en met valeriaanzuur.

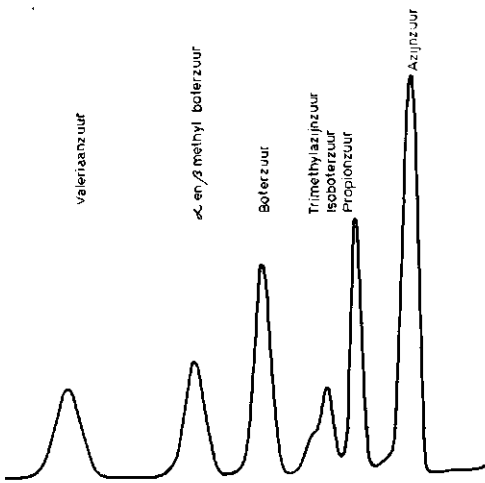


FIG. 5 Chromatogram of a solution of vfa in water.

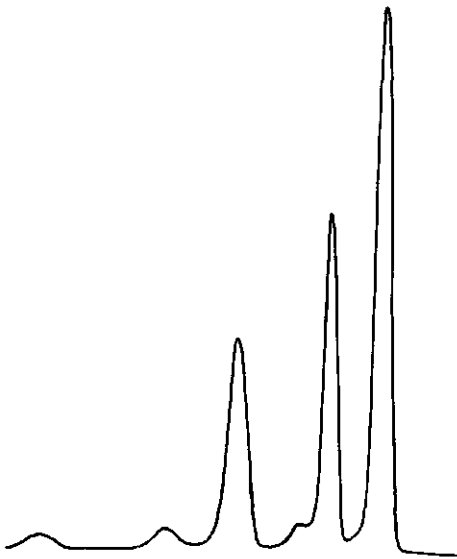


FIG. 6 Chromatogram van pensvocht.

FIG. 6 Chromatogram of rumen fluid.

noodzakelijk na de azijnzuurpiek de versterking van het signaal tien maal zo groot te maken. Dit heeft tot gevolg, dat de pieken van de overige v.v.z. geen horizontale basis hebben, doch zich bevinden op de afloop van het azijnzuur, zoals eerder reeds vermeld. De recht omhoog lopende lijn na de azijnzuurpiek is een gevolg van het overgaan op deze grotere gevoeligheid van het toestel.

2. Propionzuur en boterzuur zijn duidelijk aanwezig en goed meetbaar.
3. Er is in de afloop van het propionzuur een klein piekje te zien op de plaats van iso-boterzuur.
4. Na het boterzuur komt er een piekje op de plaats van iso-valeriaanzuur.
5. Valeriaanzuur geeft op het chromatogram van het bloed geen piek, dit in tegenstelling tot chromatogrammen van pensvocht, waarop deze piek altijd voorkomt (fig. 6).

Er werd van afgezien de piekjes van iso-boterzuur en iso-valeriaanzuur uit te meten.

#### 2.2.6. De stoomdestillatie

Het filtraat van het met meta-fosforzuur onteiwitte bloed werd zonder meer gedestilleerd met stoom. Door de verhitting gaat meta-fosforzuur over in ortho-fosforzuur, zodat deze destillatie te vergelijken is met die, beschreven door KLINGMÜLLER e.a. (1955). Er werd van afgezien om vóór de stoomdestillatie de pH op 3 te brengen, zoals werd aangeraden door ANNISON (1954), omdat hierdoor de reproduceerbaarheid verminderde. Weliswaar kunnen hierdoor wat grotere hoeveelheden pyrodruivenzuur, crotonzuur (uit bèta-hydroxy-boterzuur) en melkzuur overdestilleren; deze storen echter de chromatografische bepaling der v.v.z. niet.

Onderzocht werd nog of vacuum-stoomdestillatie, waarbij de temperatuur veel lager blijft, zoals gebruikt door BROUWER en NIJKAMP (1950) voor de bepaling van vvz in urine, andere uitkomsten gaf als de stoomdestillatie bij 100°C. Een verschil kon niet worden waargenomen.

### 2.2.7. Aanvullende opmerkingen

Nagegaan werd of bewaren van bloed invloed had op de daarin aanwezige hoeveelheid vvz, zoals door SABINE en CONNOR JOHNSON (1960) gevonden was. Hiertoe werd een monster bloed van Lionne 12, verkregen op 29-V-1964, verschillende malen geanalyseerd. Het bloed werd bewaard in een koelkast bij 4°C. Dit gaf de volgende uitkomsten in mg/l.

29-V azijnzuur 60,6, propionzuur 1,02, boterzuur 0,86,  
1-VI azijnzuur 61,1, propionzuur 1,07, boterzuur 0,81,  
azijnzuur 59,2, propionzuur 0,93, boterzuur 0,75,  
4-VI azijnzuur 61,4, propionzuur 0,99, boterzuur 0,76,  
azijnzuur 59,4, propionzuur 0,98, boterzuur 0,70,  
8-VI azijnzuur 59,2, propionzuur 1,05, boterzuur 0,66,  
azijnzuur 59,4, propionzuur 1,03, boterzuur 0,67.

Hieruit blijkt, dat alleen het gehalte aan boterzuur een geringe verlaging toonde in het verloop van ruim een week. Er werd dan ook naar gestreefd het bloed spoedig na het verkrijgen der monsters te onteiwitten.

Wat betreft het voorkomen van veresterde vvz in het bloed, kon de bevinding van McClymont (1951), dat dit slechts zeer geringe hoeveelheden zijn, worden bevestigd. Bij gebruik van methanol-extractie, zoals door SHIBATA en UMETSU (1957) werd aangeraden, werden wel is waar hogere uitkomsten verkregen; maar deze methode gaf bij analyse van water in plaats van bloed ook een duidelijk positieve uitslag.

### 2.2.8. De nauwkeurigheid der bepalingen

De bepalingen der vvz in het bloed werden in duplo verricht. Met behulp van 100 duplo-bepalingen en de formule

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^k d_i^2}{2k}$$

(DE JONGE, 1960),

waarin  $s^2$  = de variantie van een enkelvoudige bepaling,  
 $d_i$  = het verschil van het  $i^e$  tweetal bepalingen en  
 $k$  = het aantal waarnemingen, dat in duplo is verricht, werden de volgende spreidingen voor het gemiddelde van een duplobepaling berekend:



Azijnzuur:  $s = 2,2$  mg/l,  
 Propionzuur:  $s = 0,08$  mg/l,  
 Boterzuur:  $s = 0,06$  mg/l.

Gebruik makend van de t-tabel (SNEDECOR, 1962) volgt hieruit, dat een verschil tussen de gemiddelden van twee duplo-bepalingen significant is met een waarschijnlijkheid als aangegeven in tabel 1.

TABEL 1. Significantie voor het verschil tussen de gemiddelden van 2 duplo-bepalingen der vyz in bloed

Waarschijnlijkheid	95 %	99 %	99,9 %
Minimum-verschillen:			
Azijnzuur	4,4 mg/l	5,8 mg/l	7,5 mg/l
Propionzuur	0,16 mg/l	0,21 mg/l	0,27 mg/l
Boterzuur	0,12 mg/l	0,16 mg/l	0,21 mg/l

TABLE 1. Significance of the difference between the mean of two duplicate analyses of vfa in blood.

Er werd van afgezien een spreiding te berekenen van de vyz-bepalingen in het pensvocht, omdat bekend is, en ook tijdens het onderzoek bleek, dat het pensvocht niet homogeen is.

Voor de glucosebepalingen werd een spreiding van 1,4 mg/100 ml berekend uit 50 duplo's. Hieruit volgt, dat verschillen tussen de gemiddelden van 2 duplo-bepalingen significant zijn met een waarschijnlijkheid van 95 %, 99 % en 99,9 %, als ze groter zijn dan resp. 2,8, 3,8 en 4,9 mg/100 ml bloed.

Voor bèta-hydroxy-boterzuur werd uit 20 duplo-bepalingen berekend, dat de spreiding 0,9 mg/100 ml bedroeg, d.w.z. dat verschillen tussen de gemiddelden van 2 duplobepalingen significant zijn met een waarschijnlijkheid van 95 %, 99 % of 99,9 % als ze groter zijn dan resp. 2,1, 2,8 en 3,8 mg/100 ml bloed (uitgedrukt in mg aceton).

### 2.3. UITKOMSTEN

'Then he used the latest method  
 Introduced by James and Martin  
 Showing peaks upon the paper  
 Like the Rockies at the sunset,  
 Like the mole hills in the prairies.  
 Thus he estimated lipids  
 And he wondered if it mattered,  
 Wondered secretly about it  
 With unpublishable wond'rings.'

HIAWATHA'S LIPID, HUGH SINCLAIR<sup>1</sup>

#### 2.3.1. Proeven met de fistelkoe Ina

Het onderzoek naar het voorkomen van de vyz in het bloed werd voorname-

<sup>1</sup> Met dank aan dr. Binnerts.

FIG. 7 Vvz-gehalten in het pensvocht van Ina op 26-IX-1963. C<sub>2</sub> is azijnzuur, C<sub>3</sub> is propionzuur en C<sub>4</sub> is boterzuur.

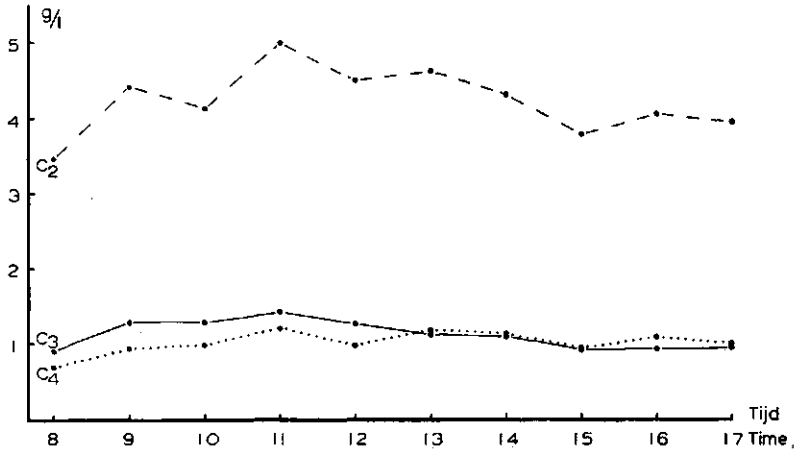


FIG. 7 Vfa-concentration in the rumen fluid of Ina on 26-IX-1963. C<sub>2</sub>= acetic acid, C<sub>3</sub>= propionic acid and C<sub>4</sub>= butyric acid.

lijk opgezet om enig inzicht te krijgen in de stofwisseling van vvez en acetonlichamen, vooral om aldus een bijdrage te leveren tot het vraagstuk van de slepende melkziekte. Alvorens hier verder op in te gaan zullen eerst de gegevens, verkregen door onderzoek bij normale koeien, worden besproken. Veel gebruik

FIG. 8 Vvz-gehalten in het bloed van Ina op 26-IX-1963. Zie voor de betekenis der letters het bijschrift van fig. 7.

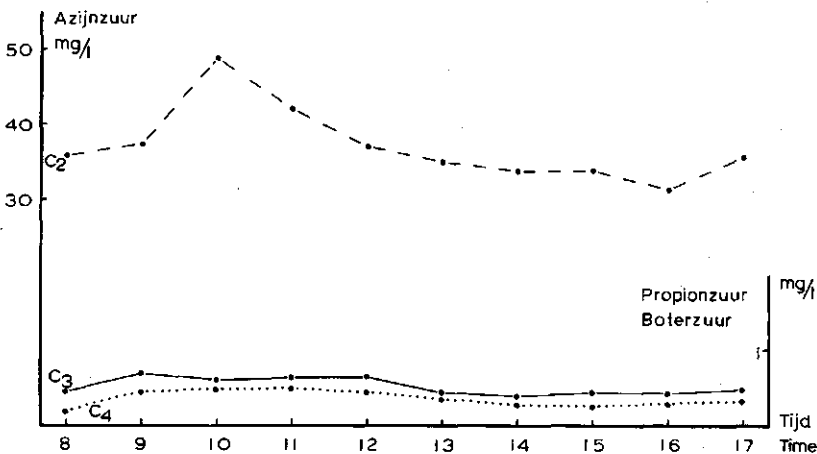


FIG. 8 Vfa-concentration in the blood of Ina on 26-IX-1963. For the meaning of the letters see the caption to fig. 7.

FIG. 9 Vvz-gehalten in het pensvocht van Ina op 18-X-1963. Bij de pijlen zijn zuren aan de pensinhoud toegevoegd, als in de tekst vermeld. C<sub>2</sub> is azijnzuur, C<sub>3</sub> is propionzuur en C<sub>4</sub> is boterzuur.

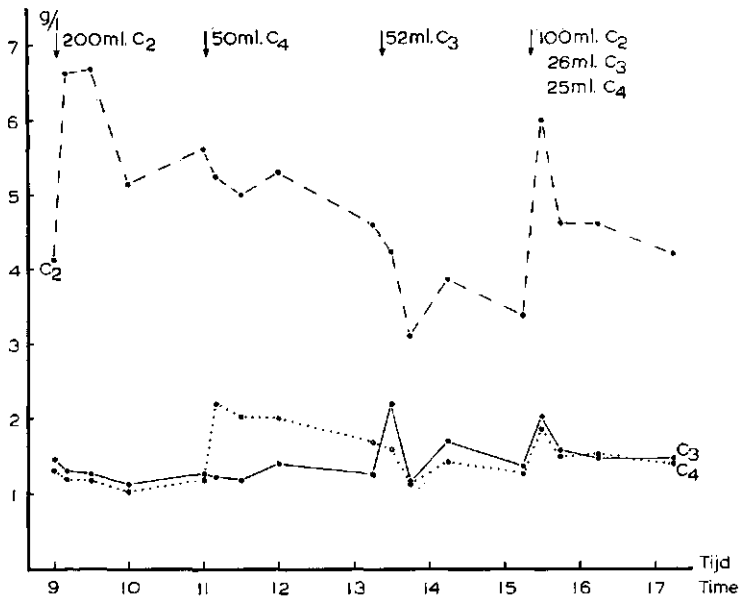


FIG. 9 Vfa-concentration in the rumen fluid of Ina on 18-X-1963. At the arrows vfa solutions were introduced into the rumen. C<sub>2</sub>= acetic acid, C<sub>3</sub>= propionic acid and C<sub>4</sub>= butyric acid.

werd daarbij gemaakt van Ina, een zwartbonte Friese melkkoe, 7 jaar oud, waarbij ongeveer twee jaar tevoren (1962) een pensistel was aangebracht. Hierdoor was het zeer eenvoudig de gehalten aan vvz in het pensvocht te vergelijken met die in het bloed.

Om het verzamelen van bloedmonsters te vergemakkelijken werd met behulp van een punctienaald een plastic catheter van 2 mm dik in een der venae jugulares gebracht, daarin 10-15 cm opgeschoven en dan gefixeerd met pleisters of zo nodig door vastnaaien op een lapje stof, dat op de huid was geplakt met bisonkit. Door de catheter, waarop een spuit kon worden aangesloten, kon op ieder gewenst ogenblik bloed worden verkregen. Stolling werd voorkomen door na iedere monsterneming een weinig heparine in het slangetje te spuiten. Gewoonlijk werd de catheter 's morgens ingebracht en bleef dan de gehele dag liggen.

Met behulp hiervan werden verschillende malen zgn. dag-krommen gemaakt. Daarbij werden als regel ieder uur een monster bloed en een monster pensvocht genomen. In bepaalde gevallen werden in de pens oplossingen van vvz gebracht om de invloed hiervan op de gehalten in het bloed na te gaan. Deze oplossingen waren altijd met behulp van NaOH op een pH 6 gebracht en zodanig verdund, dat de concentratie aan vvz ten hoogste 10 maal zo sterk was als die van het

FIG. 10 Vvz-gehalten in het bloed van Ina op 18-X-1963. Zie voor de betekenis der pijlen en letters het bijschrift van fig. 9.

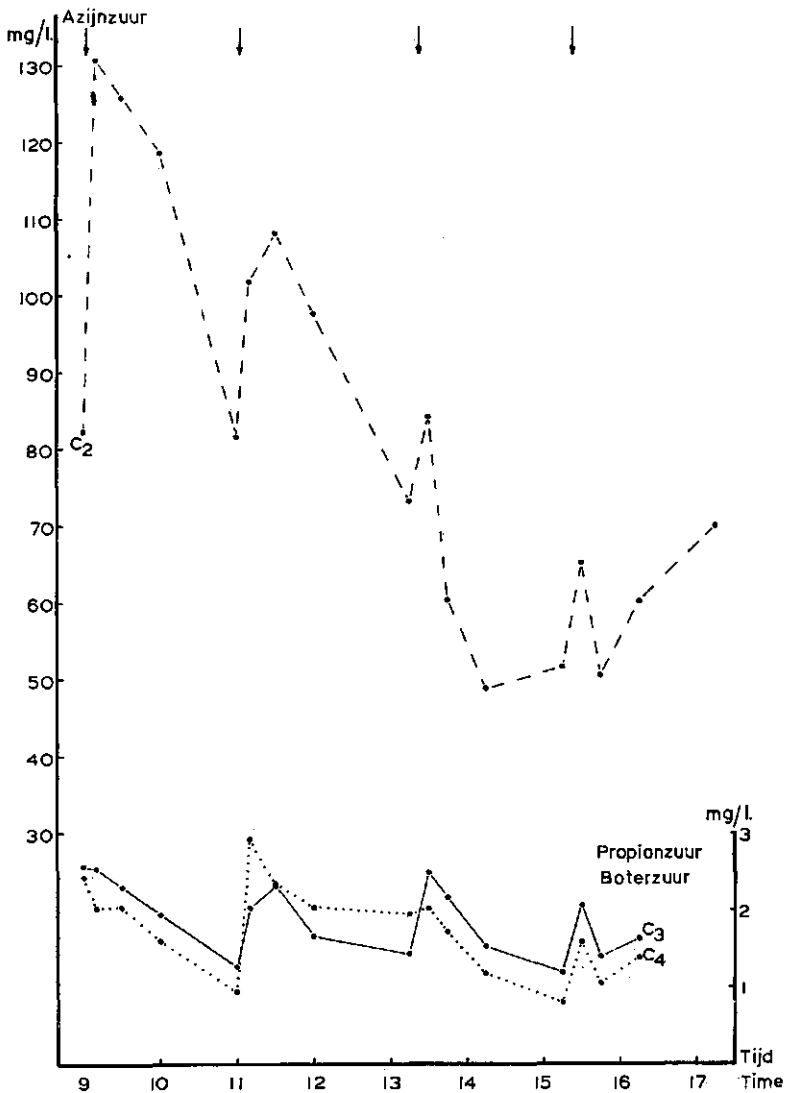


FIG. 10 Vfa-concentration in the blood of Ina on 18-X-1963. For the meaning of the arrows and the letters see the caption to fig. 9.

pensvocht. Na inbrengen van zuur in de pens werden vaker monsters genomen dan zoeven is vermeld.

De eerste maal, dat een dagcurve werd gemaakt, was op 26-IX-1963 nog vóór de verwachte kalfdatum; Ina kalfde nl. op 10-X-1963. Het dagrantsoen bestond

FIG. 11 Vvz-gehalten in het pensvocht van Ina op 2-XII-1963. Bij de pijlen zijn zuren aan de pensinhoud toegevoegd, als in de tekst vermeld. C<sub>2</sub> is azijnzuur, C<sub>3</sub> is propionzuur en C<sub>4</sub> is boterzuur.

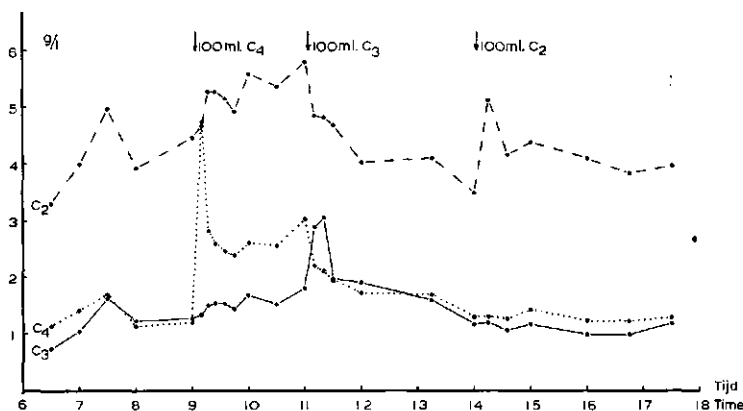


FIG. 11 Vfa-concentration in the rumen fluid of Ina on 2-XII-1963. At the arrows vfa solutions were introduced into the rumen. C<sub>2</sub>= acetic acid, C<sub>3</sub>= propionic acid and C<sub>4</sub>= butyric acid.

uit 8 kg goed hooi en 4 kg A-brok, gelijkelijk over ochtend en avond verdeeld. De samenstelling van A-brok was dezelfde als die, van de A-koek in de inleiding; het enige verschil is, dat A-brok in cilindertjes is geperst.

Om 8 uur werden de eerste monsters genomen; onmiddellijk daarna werd voer verstrekt. Vervolgens werden ieder uur monsters genomen tot en met 17 uur, de tijd dat wederom gevoederd werd.

De gehalten aan azijnzuur, propionzuur en boterzuur, aangeduid als C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> en C<sub>4</sub>, zijn voor het pensvocht weergegeven in fig. 7, voor het bloed in fig. 8.

Uit deze figuren blijkt, dat zowel in het pensvocht als in het bloed na het voeren een geringe stijging optrad in de gehalten aan vvz, die na ongeveer 3 uren overging in een langzame daling.

Op 18-X-1963, acht dagen na het kalven, werd wederom een dagcurve gemaakt.<sup>1</sup> De koe gaf toen ± 20 kg melk en kreeg een rantsoen, bestaande uit 8 kg goed hooi, 6 kg A-brok en 3,5 kg gedroogde pulp per dag. Om 6 uur werd de helft van dit rantsoen gegeven. Om 9 uur werden monsters bloed en pensvocht genomen en werd een catheter in de vena jugularis gebracht en onmiddellijk daarna werd een oplossing van 200 ml (± 212 g) azijnzuur, opgelost in 3 l water, in de pens gegoten. Om 11 uur werd 50 ml (± 48 g) boterzuur opgelost in 1 l water in de pens gebracht, om 13.15 uur een oplossing van 52 ml (± 51 g) propionzuur in 1 l water en om 15.15 uur een oplossing van 100 ml (± 106 g) azijnzuur, 26 ml (± 26 g) propionzuur en 25 ml (± 24 g) boterzuur in 2,5 l water. Tien en dertig minuten na iedere toevoeging van zuur werden monsters bloed en

<sup>1</sup> De bij deze en een deel van de bij de volgende proefneming verkregen uitkomsten, zijn gepubliceerd in de Brit. Vet. J. (1964), 120, 487.

pensvocht genomen. De gehalten aan vyz in pensvocht en bloed zijn achtereenvolgens weergegeven in fig. 9 en fig. 10.

Na toevoeging van azijnzuur trad een duidelijke stijging van het azijnzuurgehalte in het bloed op. Na inbrengen van boterzuur in de pens was er echter, behalve een stijging van het boterzuurgehalte van het bloed, eveneens een stijging van het azijnzuurgehalte, terwijl ook het propionzuurgehalte toenam. De toppen van het azijnzuur en het propionzuur lijken hierbij wat later te zijn gekomen dan die van het boterzuur.

Ook na toevoeging van propionzuur aan de pensinhoud lijkt er naast een duidelijke stijging van het propionzuurgehalte van het bloed, ook een toename van het azijnzuur te zijn ingetreden.

Om deze niet geheel verwachte uitkomsten nader te onderzoeken werd op 2-XII-1963 wederom een dagcurve gemaakt, waarbij vooral aandacht werd geschonken aan de invloed van de toevoeging van boterzuur aan de pensinhoud en wel door het nemen van een aantal monsters met korte tussenpozen. De catheter werd om 6.30 uur ingebracht; onmiddellijk daarna werd gevoerd. Het rantsoen bestond uit 8 kg goed hooi, 7 kg A-brok en 3,5 kg gedroogde pulp per dag. De melkproductie bedroeg  $\pm 24$  kg per dag.

Om 9.05 uur werd een oplossing van 100 ml ( $\pm 96$  g) boterzuur in 2 l water in de pens gegoten, om 11.05 uur volgde 100 ml ( $\pm 99$  g) propionzuur opgelost in 2 l

FIG. 12 Vyz-gehalten in het bloed van Ina op 2-XII-1963. Zie voor de betekenis der pijlen en letters het bijschrift van fig. 11.

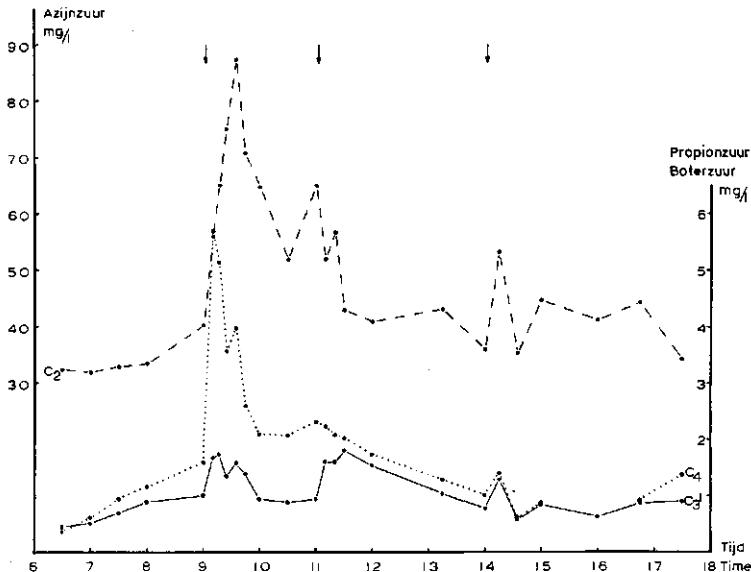


FIG. 12 Vfa-concentration in the blood of Ina on 2-XII-1963. For the meaning of the arrows and letters see the caption to fig. 11.

water en om 14.05 uur nog een oplossing van 100 ml ( $\pm$  106 g) azijnzuur in 2 l water. Monsters pensvocht en bloed werden genomen op de tijdstippen, aange-

FIG. 13 Vfa-gehalten in het pensvocht van Ina op 19-XII-1963. De tijden, waarop monsters werden genomen, zijn in de figuur vermeld. Om 14.30 uur werd een oplossing van 200 ml azijnzuur, 50 ml propionzuur en 50 ml boterzuur in 5 l water (pH 6) aan de pensinhoud toegevoegd. C<sub>2</sub> is azijnzuur, C<sub>3</sub> is propionzuur en C<sub>4</sub> is boterzuur.

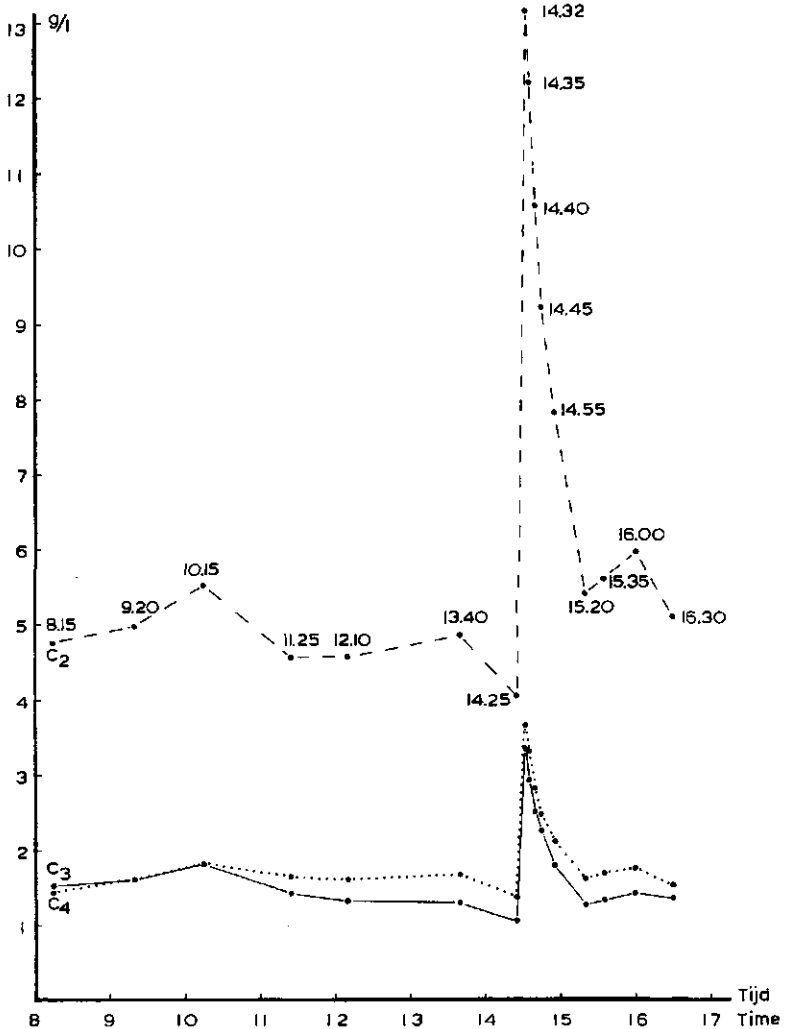


FIG. 13 Vfa-concentration in the rumen fluid of Ina on 19-XII-1963. Samples were obtained at the indicated times. At 2.30 p.m. a solution of 200 ml acetic acid, 50 ml propionic acid and 50 ml butyric acid in 5 l water (pH 6) was introduced into the rumen. C<sub>2</sub>= acetic acid, C<sub>3</sub>= propionic acid and C<sub>4</sub>= butyric acid.

geven in fig. 11 en fig. 12, waarin ook de gehalten aan azijnzuur, propionzuur en boterzuur in pensvocht en bloed zijn weergegeven.

Uit de figuren blijkt duidelijk, dat de boterzuurtoevoeging aan de pensinhoud ook nu weer een stijging van het azijnzuurgehalte van het bloed heeft gegeven. De top van deze stijging werd na ongeveer een half uur bereikt, in tegenstelling tot de stijging van het boterzuur in het bloed waarvan het gehalte reeds na vijf minuten op zijn hoogste punt was. De toevoeging van propionzuur aan de pens-

FIG. 14 Vvz-gehalten in het bloed van Ina op 19-XII-1963. Zie voor verdere gegevens het bijschrift van fig. 13.

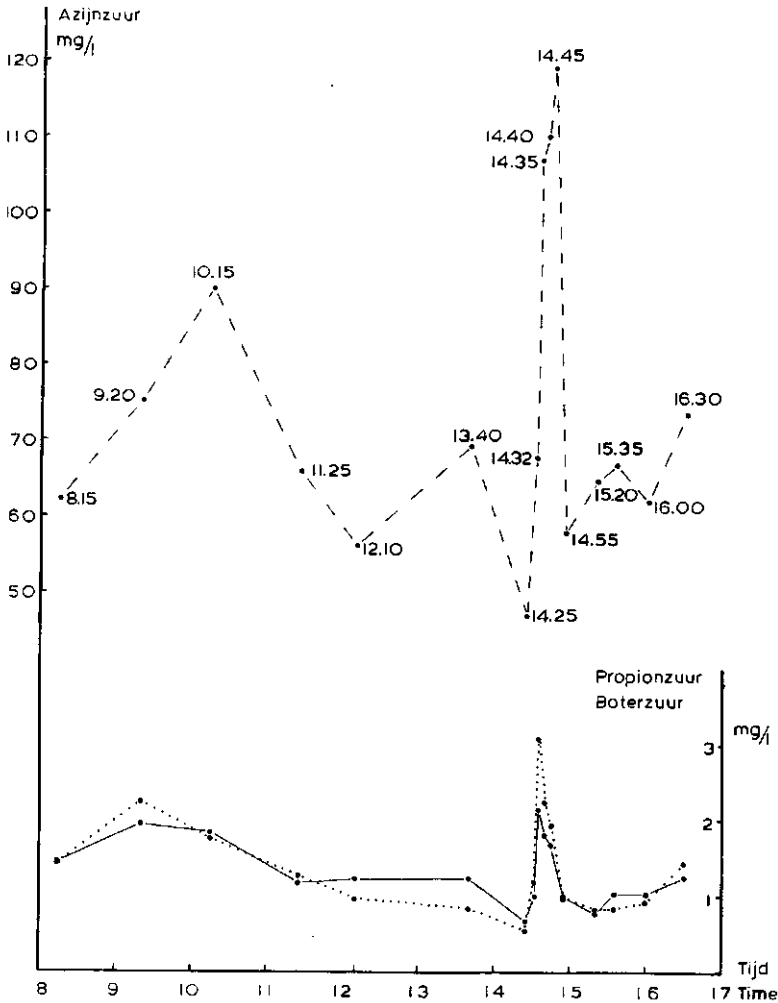


FIG. 14 Vfa-concentration in the blood of Ina on 19-XII-1963. For more data see the caption to fig. 13.



inhoud had een slechts weinig grotere invloed op het propionzuurgehalte van het bloed dan de toevoeging van boterzuur; wat de invloed op het azijnzuur- en boterzuurgehalte betreft, deze was maar zeer gering. Ook de toevoeging van het azijnzuur aan de pensinhoud had aanzienlijk minder invloed op de gehalten van het bloed dan de toevoeging van het boterzuur, zelfs op het gehalte aan azijnzuur.

Van belang is het op te merken, dat de gehalten aan vvz in het bloed, behalve door de toevoegingen der zuren, ook beïnvloed kunnen zijn door de vvz, die in de pens ontstaan ten gevolge van de gisting van het opgenomen voer. Dit zal worden toegelicht aan fig. 13 en fig. 14, die gemaakt werden met behulp van de gegevens, verkregen bij een volgende proef op 19-XII-1963. Ina gaf toen  $\pm 23$  kg melk; het rantsoen was nog hetzelfde. 's Morgens werd de catheter om 8.15 uur ingebracht, nadat om 6 uur was gevoederd. Vervolgens werd een aantal monsters bloed en pensvocht verzameld zonder dat vvz aan de pensinhoud werden toegevoegd. Om 14.30 uur werd een oplossing van 200 ml ( $\pm 212$  g) azijnzuur, 50 ml ( $\pm 50$  g) propionzuur en 50 ml ( $\pm 48$  g) boterzuur in 4 l water in de pens gegoten. Na deze toevoeging werd wederom een aantal monsters bloed en pensvocht verzameld, waarbij het opviel, dat de koe om 14.48 uur een aanzienlijke hoeveelheid water dronk, dat ad lib. ter beschikking stond.

De analyseuitkomsten van de verzamelde monsters, weergegeven in fig. 13 (pensvocht) en fig. 14 (bloed), laten duidelijk zien, dat er in de loop van de mor-

FIG. 15 Vvz-gehalten in het pensvocht van Ina op 15-I-1964. De tijden, waarop de monsters werden genomen, zijn vermeld in fig. 16. Bij de pijl werd een oplossing van 100 ml propionzuur in 2 l water (pH 6) aan de pensinhoud toegevoegd.  $C_2$  is azijnzuur,  $C_3$  is propionzuur en  $C_4$  is boterzuur.

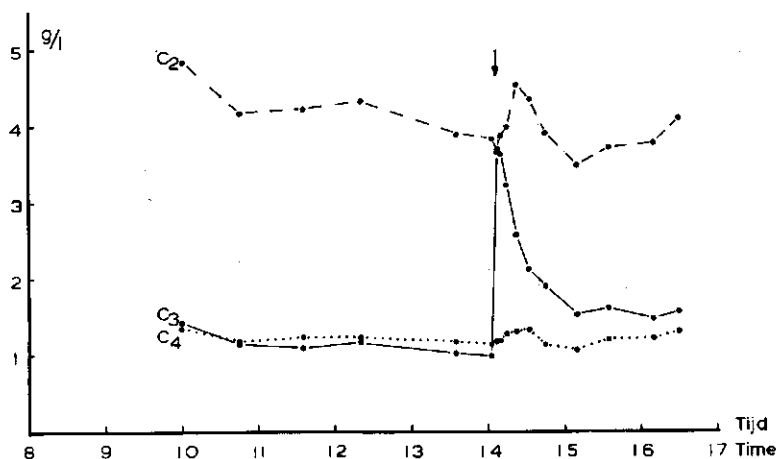


FIG. 15 Vfa-concentration in the rumen fluid of Ina on 15-I-1964. Samples were obtained as indicated in fig. 16. At the arrow a solution of 100 ml propionic acid in 2 l water (pH 6) was introduced into the rumen.  $C_2$  = acetic acid,  $C_3$  = propionic acid and  $C_4$  = butyric acid.

FIG. 16 Vvz-gehalten in het bloed van Ina op 15-I-1964. Zie voor verdere gegevens het bij-schrift van fig. 15.

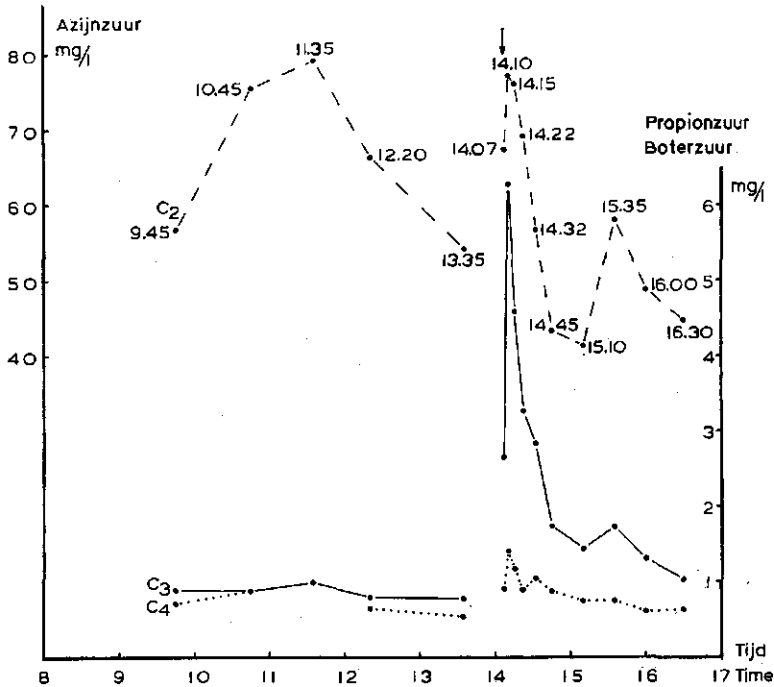


FIG. 16 Vfa-concentration in the blood of Ina on 15-I-1964. For more data see the caption to fig. 15.

gen een stijging optrad in de gehalten der vvz, vooral van het bloed, naar aangenomen mag worden ten gevolge van de gisting van het voer.

De toevoeging van het mengsel vvz aan de pensinhoud gaf ook nu een duidelijke stijging van de vvz in het bloed. Daarbij bereikten de gehalten aan propionzuur en boterzuur al na 5 minuten een maximum; het azijnzuurgehalte steeg echter tot 15 minuten na de toevoeging. Daarna trad een zeer steile daling in, zodat na 25 minuten het oorspronkelijke niveau van alle drie vvz weer was bereikt. De mogelijkheid dat het water drinken hierbij een rol heeft gespeeld, dringt zich zeer sterk op.

Een ander beeld dan op 2-XII-1963 was verkregen, gaf de toevoeging van propionzuur aan de pensinhoud op 15-I-1964. Om 9.45 uur werd een catheter in de vena jugularis gebracht, gevolgd door het nemen van een aantal monsters bloed en pensvocht tot 14.05 uur. Op dat tijdstip werd een oplossing van 100 ml ( $\pm 99$  g) propionzuur in 2 l water in de pens gegoten, wederom gevolgd door het nemen van een aantal monsters bloed en pensvocht. De tijden waarop de monsters werden genomen, zijn vermeld in fig. 16. Het rantsoen was gelijk aan dat op 2-XII-1963; om 6 en 16 uur werd gevoerd, de melkgift was  $\pm 21$  kg.

De analyseuitkomsten van de verkregen monsters zijn weergegeven in fig. 15 (pensvocht) en fig. 16 (bloed). Helaas is het bloedmonster van 14.03 uur, genomen vlak vóór de toediening van propionzuur, verloren gegaan. Voorts is de boterzuurwaarde van het bloedmonster van 11.35 uur niet opgenomen in de figuur, omdat zij veel te hoog was ten gevolge van met boterzuur verontreinigd glaswerk.

Uit figuur 16 blijkt, dat toevoeging van 100 ml propionzuur aan de pensinhoud een snelle stijging gaf van het propionzuurgehalte van het bloed, zodat het maximum reeds na 5 minuten werd bereikt. Tegelijk met deze stijging ging ook het gehalte van het azijnzuur in het bloed omhoog, eveneens met een maximum na 5 minuten, dit ondanks het feit, dat na de toevoeging van het propionzuur een

FIG. 17 Vvz-gehalten in het pensvocht van Ina op 3-III-1964. De tijden, waarop de monsters werden genomen, zijn vermeld in fig. 18. Om 11.08 uur werd een oplossing van 50 ml isovaleriaanzuur in 2 l water (pH 6), en om 14.05 uur een oplossing van 50 ml boterzuur in 2 l water (pH 6) aan de pensinhoud toegevoegd. C<sub>2</sub> is azijnzuur, C<sub>3</sub> is propionzuur en C<sub>4</sub> is boterzuur.

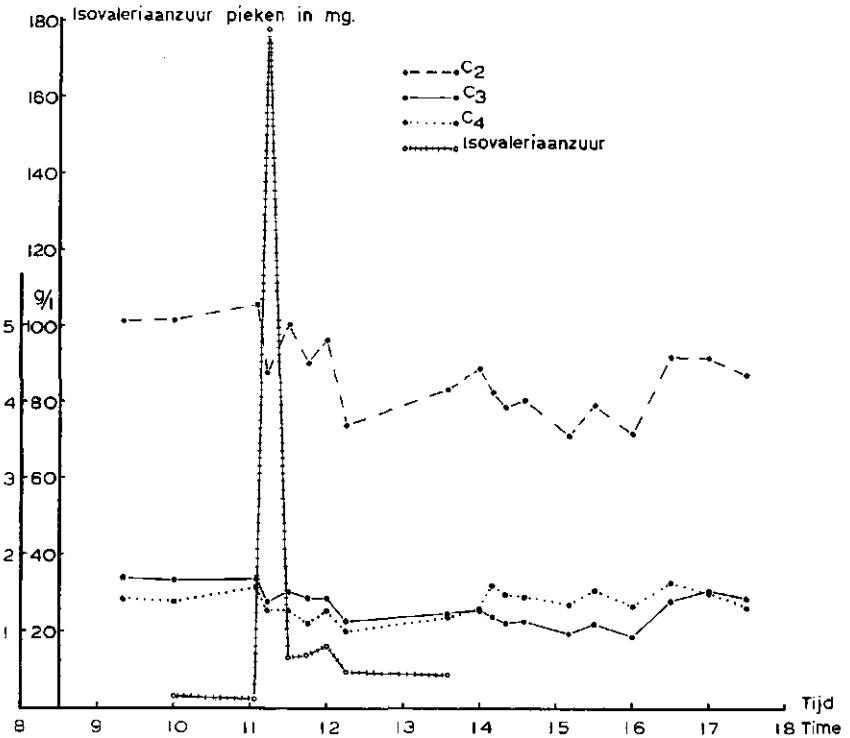


FIG. 17 Vfa-concentration in the rumen fluid of Ina on 3-III-1964. Samples were obtained at times as indicated in fig. 18. At 11.08 a.m. a solution of 50 ml iso-valeric acid in 2 l water (pH 6) and at 2.05 p.m. a solution of 50 ml butyric acid in 2 l water (pH 6) was introduced into the rumen. C<sub>2</sub> = acetic acid, C<sub>3</sub> = propionic acid and C<sub>4</sub> = butyric acid.

FIG. 18 Vvz-gehalten in het bloed van Ina op 3-III-1964. Zie voor verdere gegevens het bijschrift van fig. 17.

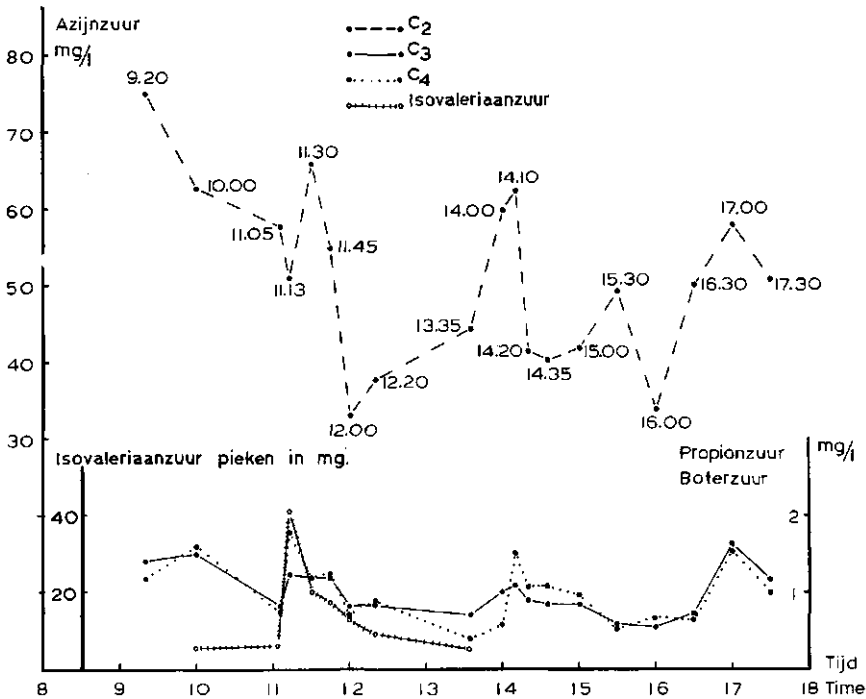


FIG. 18 Vfa-concentration in the blood of Ina on 3-III-1964. For more data see fig. 17.

stijging optrad van het azijnzuurgehalte van het pensvocht met een maximum om 14.22 uur. Waarom de invloed van de toevoeging van propionzuur op de vvz-gehalten van het bloed groter was dan op 2-XII-1963 is niet duidelijk; misschien staat dit in verband met de toediening van boterzuur op 2-XII-1963, 2 uur eerder.

Voorts werd nog de vraag onder ogen gezien of toevoeging van vluchtige vetzuren, die in geringere concentratie in het pensvocht voorkomen dan de drie bovengenoemde, invloed hebben op de gehalten in het bloed. Om deze vraag te beantwoorden werd op 3-III-1964 een dagcurve gemaakt, waarbij om 11.08 uur een oplossing van 50 ml ( $\pm 46$  g) iso-valeriaanzuur in 2 l water in de pens werd gegoten. Te 14.05 uur werd ter vergelijking 50 ml ( $\pm 48$  g) boterzuur in 2 liter water door de fistel toegediend. Wederom werd gevoerd om 6 en 16 uur; het rantsoen was onveranderd, de melkgift bedroeg  $\pm 19$  kg.

De uitkomsten van de analyses der verkregen monsters zijn weergegeven in fig. 17 en 18 voor resp. pensvocht en bloed. Hierin zijn tevens weergegeven de gewichten van enkele iso-valeriaanzuurpieken, gewogen nadat deze uit de chromatogrammen waren geknipt. Hierbij moet worden bedacht, dat pieken van de pensvocht-chromatogrammen in deze figuren veroorzaakt worden door een 500

maal zo hoge concentratie als even grote pieken van de chromatogrammen van het bloed.

Uit fig. 18 blijkt, dat toevoegen van 50 ml iso-valeriaanzuur aan het pensvocht een duidelijke invloed heeft gehad op de drie vyz in het bloed. De stijging van het boterzuur is zelfs vergelijkbaar met die na toevoeging van 50 ml boterzuur aan de pensinhoud.

Opgemerkt moet worden, dat de stijging van het azijnzuurgehalte van het bloed deze keer niet zo duidelijk was, ja dat reeds vóór de toevoeging van boterzuur aan de pensinhoud een stijging van het gehalte aan azijnzuur in het bloed was opgetreden. Vooral deze laatste waarneming wees er op, dat de vyz in het bloed, behalve door de vyz in het pensvocht, ook door andere factoren beïnvloed worden.

Duidelijk komt dit ook naar voren in de figuren 19 en 20, die de analyseuitkomsten weergeven van monsters verzameld op 18-III-1964. Ina kreeg toen nog steeds hetzelfde rantsoen en gaf ongeveer 18 kg melk per dag; er werd gevoerd om 6 uur en 16 uur.

Nadat om 9 uur een catheter was ingebracht en monsters pensvocht en bloed

FIG. 19 Vyz-gehalten in het pensvocht van Ina op 18-III-1964. De tijden, waarop de monsters werden genomen, zijn vermeld in fig. 20. Om 9.15 uur en om 14.30 uur werd een oplossing van 100 ml boterzuur in 2 l water (pH 6) aan de pensinhoud toegevoegd. C<sub>2</sub> is azijnzuur, C<sub>3</sub> is propionzuur en C<sub>4</sub> is boterzuur.

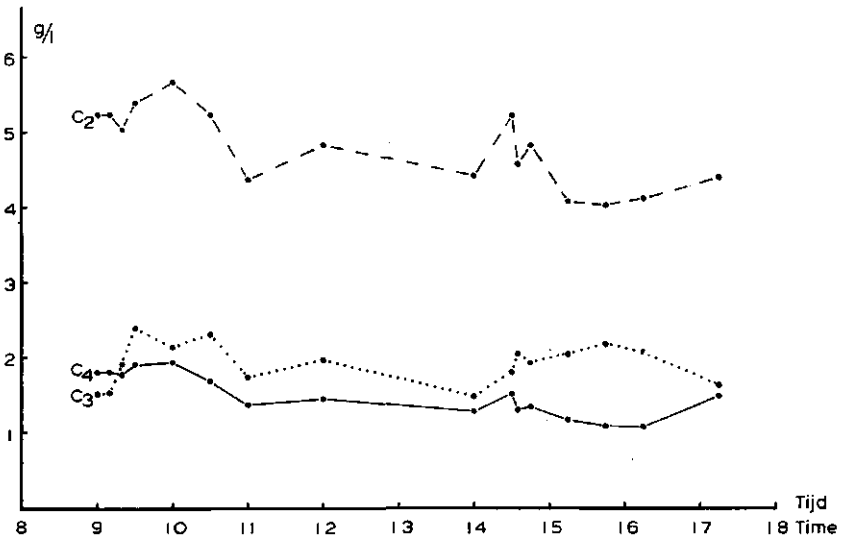


FIG. 19 Vfa-concentration in the rumen fluid of Ina on 18-III-1964. Samples were obtained at the times as indicated in fig. 20. At 9.15 a.m. and 2.30 p.m. a solution of 100 ml butyric acid in 2 l water (pH 6) was introduced into the rumen. C<sub>2</sub> = acetic acid, C<sub>3</sub> = propionic acid and C<sub>4</sub> = butyric acid.

FIG. 20 Vvz-gehalten in het bloed van Ina op 18-III-1964. Zie voor verdere gegevens het bijschrift van fig. 19.

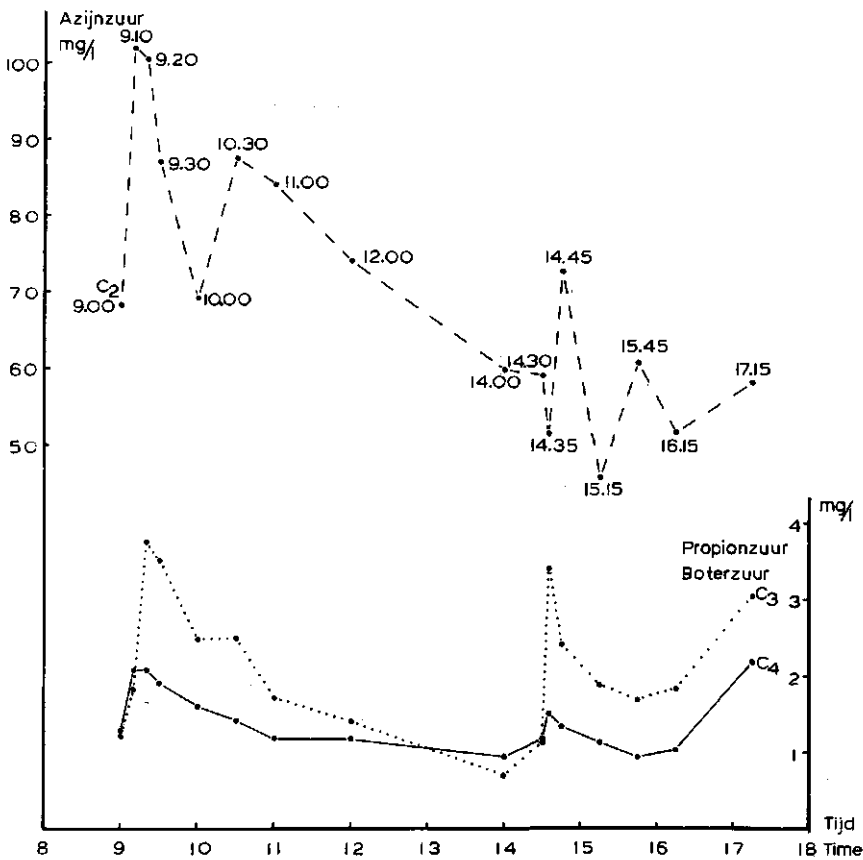


FIG. 20 Vfa-concentration in the blood of Ina on 18-III-1964. For more data see fig. 19.

waren genomen, werden 10 minuten later nogmaals monsters getrokken, nog vóór 9.15 uur, toen er 100 ml ( $\pm$  96 g) boterzuur in 2 l water in de pens werd gegoten. Het monsternemen werd hierna voortgezet en om 14.30 uur werd nogmaals een zelfde hoeveelheid boterzuur in de pens gebracht, wederom gevolgd door het nemen van een aantal monsters.

Uit fig. 20 blijkt, dat reeds vóór de toevoeging van de eerste hoeveelheid boterzuur een aanzienlijke stijging van het azijnzuur-, propionzuur- en boterzuurgehalte van het bloed had plaats gevonden, terwijl de gehalten van deze zuren in het pensvocht gelijk waren gebleven.

Om dit te verklaren werd verondersteld, dat de stijging een gevolg was van het inbrengen van de catheter.

Daarom werden bij het maken van een dagcurve op 8-IV-1964 na het inbrengen van de catheter om 6 uur onmiddellijk vóór het voeren, enkele tussentijdse

monsters genomen terwijl de koe at en wel om 6.05 uur, 6.15 uur en 6.30 uur. Het rantsoen was nog als voorheen en werd geheel opgegeten; de melkgift was inmiddels gedaald tot 16 kg.

Het maken van deze dagcurve was overigens bedoeld om haar te kunnen vergelijken met de kromme, gemaakt op 26-IX-1963 nog vóór het kalven; er werden derhalve geen zuren aan de pensinhoud toegevoegd. De uitkomsten zijn weergegeven in fig. 21 (pensvocht) en fig. 22 (bloed). Uit fig. 22 blijkt, dat de kruisjes, voorstellende de monsters van 6.05 uur en 6.15 uur iets boven de dagcurve vallen. Het lijkt of een andere oorzaak dan de stijging van de vyz in het pensvocht hiervoor verantwoordelijk moet zijn. Overigens blijkt de stijging van de vyz in het bloed in de loop van de dag nu aanzienlijk groter te zijn dan vóór het kalven, terwijl de gehalten in het pensvocht vóór en na het kalven slechts weinig verschillen.

### 2.3.2. Invloed van 'emotie'

De invloed van het inbrengen van de catheter op de vyz in het bloed werd nader onderzocht door bij enkele koeien punctie van de vena jugularis te verrichten, de naald in situ te laten en met tussenpozen van een paar minuten enkele monsters bloed te verzamelen. Hierbij werd geen heparine gebruikt, zodat een eventuele invloed daarvan bij voorbaat was uitgesloten. Dit gaf op 29-V-1964 bij Lionne 12, een zeer rustig dier, staande op een stalrantsoen dat voldoende was voor haar melkgift van ongeveer 17 kg per dag, de uitkomsten vermeld in tabel

FIG. 21 Vyz-gehalten in het pensvocht van Ina op 8-IV-1964.  $C_2$  is azijnzuur,  $C_3$  is propionzuur en  $C_4$  is boterzuur.

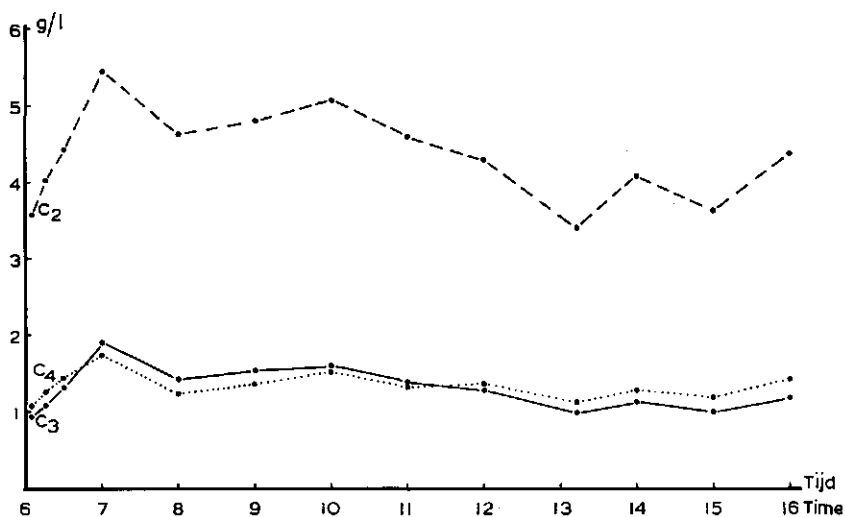


FIG. 21 Vfa-concentration in the rumen fluid of Ina on 8-IV-1964.  $C_2$ = acetic acid,  $C_3$ = propionic acid and  $C_4$ = butyric acid.

FIG. 22 Vvz-gehalten in het bloed van Ina op 8-IV-1964. Zie voor de betekenis der letters het bijschrift van fig. 21.

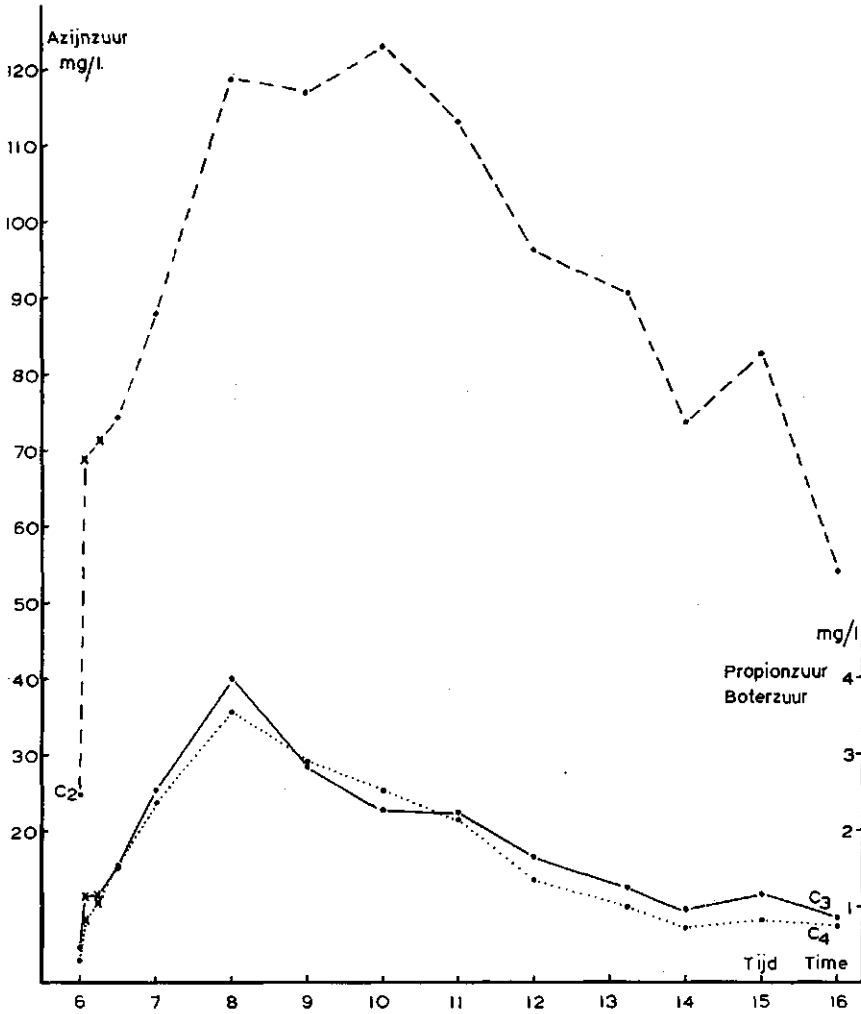


FIG. 22 Vfa-concentration in the blood of Ina on 8-IV-1964. For the meaning of the letters see the caption to fig. 21.

2. In deze tabel zijn tevens de uitkomsten van glucosebepalingen in de bloedmonsters vermeld. Gevoederd was om 8 uur.

Bij een dergelijk onderzoek met Betsy 2, een koe die in de wei enkel gras ontving en ongeveer 23 kg melk leverde, gaven de analyses van de monsters bloed, verkregen op 11-VI-1964, de uitkomsten vermeld in tabel 3.



TABEL 2. Vvz- en glucosegehalten in monsters bloed van Lionne 12, op de vermelde tijdstippen verkregen met een vena-punctienaald, die in situ gelaten werd

Tijd	Azijnzuur (mg/l)	Propionzuur (mg/l)	Boterzuur (mg/l)	Glucose (mg/100 ml)
10.12	34,0	0,78	0,68	58,1
10.14	51,4	1,00	0,94	62,7
10.17	65,7	1,11	0,94	64,5

TABLE 2. Vfa- and glucose concentration found in blood samples obtained from Lionne 12 at the indicated times by means of a hollow needle which remained in situ in a jugular vein.

TABEL 3. Vvz- en glucosegehalten in monsters bloed van Betsy 2 op de vermelde tijdstippen verkregen met een vena-punctienaald, die in situ gelaten werd

Tijd	Azijnzuur (mg/l)	Propionzuur (mg/l)	Boterzuur (mg/l)	Glucose (mg/100 ml)
10.47	32,8	0,99	0,99	48,7
10.48	55,0	1,21	1,14	49,6
10.52	79,0	1,49	1,40	54,0
10.57	84,8	1,63	1,90	56,2

TABLE 3. Vfa- and glucose concentration found in blood samples obtained from Betsy 2 at the indicated times by means of a hollow needle which remained in situ in a jugular vein

Bij Lionne 12 werd dit onderzoek ruim een maand later op 7-VII-1964 herhaald, terwijl ze in de wei liep en geen krachtvoer meer ontving (tabel 4).

Uit deze uitkomsten blijkt:

1. dat zeer snel na het inbrengen van de naald in de vena jugularis een stijging optreedt in de gehalten der vvz van het bloed,
2. dat deze stijging aanzienlijk is: verdubbeling van het azijnzuurgehalte, verhoging tot 1,5 maal van de gehalten aan propionzuur en boterzuur,
3. dat het glucose-gehalte eveneens stijgt.

De stijging van het glucose-gehalte van het bloed ten gevolge van emoties is reeds lang bekend. Deze wordt voornamelijk veroorzaakt door adrenaline-afscheiding door de bijniere.

Het lag dus voor de hand de invloed van de bijniermerghormonen adrenaline en noradrenaline op de vvz van het bloed te onderzoeken.

TABEL 4. Vvz- en glucosegehalten in monsters bloed van Lionne 12 op de vermelde tijdstippen verkregen met een vena-punctienaald, die in situ gelaten werd

Tijd	Azijnzuur (mg/l)	Propionzuur (mg/l)	Boterzuur (mg/l)	Glucose (mg/100 ml)
11.14	39,0	0,55	0,56	59,0
11.19*	58,9	0,64	0,64	60,8
11.24	73,9	0,73	0,78	61,5
11.29	68,4	0,78	0,82	61,8
11.34	70,4	0,80	0,85	60,3

TABLE 4. Vfa- and glucose concentration found in blood samples obtained from Lionne 12 at the indicated times by means of a hollow needle which remained in situ in a jugular vein.

\* bepaling in enkelvoud

### 2.3.3. Invloed van adrenaline en noradrenaline

De invloed van adrenaline- en noradrenaline-toediening werd onderzocht bij 2 koeien, die in de wei liepen en niet werden bijgevoerd. Ina gaf op 17-VI en 13-VII ongeveer 13 kg melk; op 2-IX had zij een maand droog gestaan. Lionne 12 gaf op 16-VII ongeveer 18 kg melk en op 11-VIII nog ongeveer 10 kg melk per dag.

Op 17-VI-1964 werd bij Ina twee maal adrenaline en één maal water ingespoten door de catheter, die om 8.45 uur was ingebracht. De analysegegevens van de monsters bloed en pensvocht, genomen vóór en na de inspuitingen, zijn weergegeven in tabel 5.

Op 13-VII-1964 werd dit onderzoek bij Ina herhaald met noradrenaline-inspuiting door de catheter, die om 9.10 uur was ingebracht. Monsters pensvocht werden daarbij niet meer verzameld. De uitkomsten van de analyses van het bloed zijn weergegeven in tabel 6.

In verband met de geringe veranderingen die de vvz-gehalten door deze hormoontoedieningen ondergingen, werd bij Lionne 12 op 16-VII-1964, nadat om 14.20 uur een catheter in de rechter vena jugularis was gebracht, in de andere vena jugularis te 15.05 uur een venapunctienaald gestoken om te zien welk effect dit zou hebben in vergelijking met een mengsel van  $\frac{1}{2}$  ml adrenaline +  $\frac{1}{2}$  ml noradrenaline, beide met een concentratie van 1 mg/ml. De verkregen uitkomsten zijn weergegeven in tabel 7.

De invloed van het inbrengen van de naald bleek aanmerkelijk groter dan die van de adrenaline-inspuiting door de catheter.

Omdat subcutane toediening van adrenaline een sterker effect op het bloedsuikergehalte zou hebben dan intraveneuze injectie (DUKES, 1955), werd nagegaan of deze wijze van toedienen misschien eveneens een grotere invloed op de vvz-gehalten van het bloed zou hebben. Daartoe werd op 11-VIII-1964 bij Lionne 12 om 9 uur een catheter in de vena jugularis gebracht en daarna op verschillende wijzen adrenaline ingespoten, terwijl voorts ook nog op andere manieren

TABEL 5. Vza- en glucosegehalten in het bloed en vza-gehalten in het pensvocht van Ina voor en na toediening van adrenaline en water door een catheter op de vermelde tijdstippen

Tijd	Bloed				Pensvocht			
	Azijnzuur (mg/l)	Propionzuur (mg/l)	Boterzuur (mg/l)	Glucose (mg/100 ml)	Tijd	Azijnzuur (g/l)	Propionzuur (g/l)	Boterzuur (g/l)
8.45	24,8	0,37	0,13	43,8	8.55	4,59	1,40	1,17
8.50	33,2	0,50	0,16	43,9	10.—	4,80	1,48	1,22
10.—	27,9	0,49	0,24		11.—	4,84	1,49	1,28
11.—	34,6	0,56	0,30		12.—	3,72	1,14	1,00
12.—	22,2	0,56	0,31		13.30	4,23	1,31	1,16
13.30	31,7	0,74	0,50					
14.15	57,6	1,03	0,71	48,8				
	1 ml adrenaline (1 mg/ml) ingespoten							
14.20	52,4	0,97	0,66	56,2	14.20	4,38	1,38	1,24
15.—	41,6	0,78	0,50	51,5				
	1 ml water ingespoten							
15.05	37,4	0,64	0,44	51,8	15.10	4,17	1,28	1,18
16.05	37,6	0,72	0,57	48,7				
	1 ml adrenaline (1 mg/ml) ingespoten							
16.06	34,1	0,48	0,36	54,1				
16.10	41,8	0,89	0,56	56,5	16.10	4,47	1,37	1,26
16.20	46,4	1,22	0,84	56,3				
16.35	35,2	0,92	0,66	48,8				
17.05	44,3	0,83	0,63		17.05	4,58	1,39	1,28

TABEL 5. Vfa- and glucose concentration in blood and vfa-concentration in rumen fluid samples obtained from Ina at the indicated times before and after administering adrenalin and water through a catheter in a jugular vein.

TABEL 6. Vvz- en glucosegehalten in het bloed van Ina voor en na toediening van noradrenaline en water door een catheter

Tijd	Azijnzuur (mg/l)	Propionzuur (mg/l)	Boterzuur (mg/l)	Glucose (mg/100 ml)
9.10	43,7	0,76	0,61	54,9
9.20	42,4	0,57	0,36	64,1
10.—	Catheter uit de vena, om 11 uur opnieuw ingebracht			
11.—	44,0	0,62	0,52	61,3
12.—	53,0	0,60	0,49	59,4
13.30	60,9	1,00	0,86	58,7
14.—	47,8	1,10	1,08	56,9
14.01	1 ml noradrenaline (1 mg/ml) langzaam ingespoten			
14.10	66,2	1,18	1,35	58,0
15.—	69,3	1,07	0,87	58,6
15.05	1 ml water ingespoten			
15.10	69,2	1,20	1,24	56,3
16.—	66,4	1,00	0,76	54,9
16.05	1 ml noradrenaline (1 mg/ml) wat sneller ingespoten			
16.10	67,4	1,46	1,31	59,9
16.15	66,1	1,22	1,02	63,8
16.30	57,8	1,15	1,05	60,8
17.—	55,7	1,20	0,99	57,2

TABLE 6. Vfa- and glucose concentration in blood samples obtained from Ina before and after administering of noradrenalin and water through a catheter in a jugular vein.

werd getracht invloed op de vvz-gehalten van het bloed uit te oefenen. De handelingen die werden verricht en de uitkomsten die werden verkregen zijn vermeld in tabel 8.

Tenslotte werden bij Ina op 2-IX-1964 nog grotere hoeveelheden adrenaline intramusculair ingespoten. De gegevens, die daarbij verkregen werden, zijn vermeld in tabel 9. In deze tabel is te zien, dat na inspuiting van 5 ml adrenaline een sterke stijging van het bloedsuiker-gehalte optrad. De vvz-gehalten van het bloed toonden echter maar een geringe verandering. Over het algemeen kan men trouwens zeggen, dat adrenaline- of (en) noradrenalinetoediening maar weinig invloed had op de vvz in het bloed, zij het iets meer dan toediening van water; de invloed van emoties was echter beslist groter.

#### 2.3.4. Bepalingen bij kalveren

Behalve de juist besproken 'emotionele' en hormonale invloeden op de vvz van het bloed is er een duidelijke samenhang met de gebeurtenissen in de pens, zoals al uit de proeven met Ina bleek. Op dit verband hebben ook de thans volgende bepalingen van de vvz in het bloed van kalveren betrekking, hoewel hierbij de gehalten van de vvz in het pensvocht niet zijn bepaald. Wel werd het glucosegehalte van het bloed gemeten.

De uitkomsten, die verkregen zijn uit de monsters verzameld op drie verschil-

TABEL 7. Vvz- en glucosegehalten in het bloed van Lionne 12 na verschillende handelingen zoals in de tabel vermeld

Monster uit	Tijd	Azijnzuur (mg/l)	Propionzuur (mg/l)	Boterzuur (mg/l)	Glucose* (mg/100ml)	
	14.20	Catheter in vena jugularis gebracht				
Naald	14.20	35,2	0,48	0,41	52,8	
Catheter	14.30	42,2	0,60	0,51	50,8	
Catheter	14.45	37,8	0,48	0,38	52,0	
Catheter	15.02	33,5	0,46	0,28	53,3	
	15.05	Naald in andere vena jugularis gebracht				
Naald	15.05	33,7	0,37	0,22	53,9	
Catheter	15.13	41,0	0,39	0,28	53,9	
Naald	15.15	55,0	0,58	0,34	58,4	
	15.15	Naald verwijderd				
Catheter	15.30	34,5	0,38	0,29	57,5	
Catheter	16.04	26,0	0,42	0,26	57,7	
	16.05	$\frac{1}{2}$ ml adrenaline + $\frac{1}{2}$ ml noradrenaline (beide 1 mg/ml) door catheter ingespoten				
Catheter	16.10	30,4	0,48	0,36	56,2	
Catheter	16.20	35,2	0,57	0,56	61,2	
Catheter	16.30	38,4	0,57	0,59	59,6	
Catheter	17.—	39,0	0,56	0,50	56,0	

TABLE 7. Vfa- and glucose concentration in blood samples obtained from Lionne 12 after several actions as indicated in the table.

\* Glucose in enkelvoud bepaald

lende data, zijn met de geboortedata opgenomen in tabel 10. Het stierkalf en Roosje 11 kregen op 5-V-1964 alleen nog maar koemelk. Zwartschoft 13 en Lampkje 12 liepen in de wei en kregen alleen maar gras. De overige kalveren werden gevoed met kunstmelk (sprayfo) en hadden verder gelegenheid om naar believen hooi en kalverkorrels te gebruiken. Op 12-V-1964 en 26-V-1964 liepen alle kalveren overdag in de wei.

Uit de tabel blijkt, dat de gehalten der vvz in het bloed van jonge kalveren lager zijn dan die bij volwassen runderen. Dit geldt vooral voor het azijnzuurgehalte. In hoeverre deze gehalten door de venapunctie beïnvloed zijn, is zonder meer niet uit te maken. Het nemen van bloedmonsters bij kalveren is voor deze dieren een enerverende gebeurtenis. De glucosegehalten tonen dan ook grote variatie, maar zijn voor kalveren niet abnormaal; de vvz laten hiermee geen samenhang zien.

TABEL 8. Vvz- en glucosegehalten in het bloed van Lionne 12 na verschillende handelingen zoals in de tabel vermeld

Tijd	Azijnzuur (mg/l)	Propionzuur (mg/l)	Boterzuur (mg/l)	Glucose (mg/100 ml)
9.00	Catheter voor aftappen van bloed in vena jugularis gebracht			
9.02	26,6	0,35	0,31	58,1
10.04	42,9	0,50	0,48	54,1
10.05	1 ml water + alcohol (50%) subcutaan			
10.10	36,4	0,42	0,39	54,7
11.—	30,8	0,42	0,40	56,7
11.01	1 ml adrenaline (1 mg/ml) subcutaan			
11.05	31,5	0,40	0,48	57,2
12.—	35,4	0,44	0,40	55,3
12.01	1 ml noradrenaline intramusculair (1 mg/ml)			
12.05	30,0	0,40	0,48	55,3
13.45	38,5	0,40	0,42	niet bepaald
14.—	37,2	0,44	0,58	53,6
14.05	Knal van stukje vuurwerk			
14.08	45,1	0,44	0,64	52,2
15.11	32,9	0,38	0,50	50,0
15.13	Punctienaald in andere vena jugularis en monster hieruit			
	40,7	0,38	0,36	51,1
15.15	51,3	0,45	0,56	52,6
15.18	Nog een monster uit naald en deze verwijderd			
	43,0	0,32	0,52	53,6
15.19	39,2	0,48	0,43	niet bepaald
16.19	39,0	0,39	0,58	48,8
16.20	2 ml adrenaline (1 mg/ml) subcutaan			
16.24	38,6	0,45	0,67	50,3
16.35	48,0	0,60	0,86	52,2
17.—	39,3	0,40	0,74	51,5

TABEL 8. Vfa- and glucose concentration in blood samples obtained from Lionne 12 after several actions as indicated in the table.

TABEL 9. Vvz- en glucosegehalten in het bloed van Ina na verschillende handelingen zoals in de tabel vermeld

Tijd	Azijnzuur (mg/l)	Propionzuur (mg/l)	Boterzuur (mg/l)	Glucose (mg/100 ml)
9.10	Catheter voor aftappen van bloed in vena jugularis gebracht			
9.10	36,5	0,48	0,26	56,4
10.—	35,9	0,58	0,37	53,9
11.04	42,4	0,76	0,50	53,9
11.05	2 ml adrenaline (1 mg/ml) intramusculair			
11.10	49,2	0,78	0,58	53,9
11.20	39,6	0,70	0,50	58,7
12.—	54,8	1,01	0,82	58,8
13.45	49,8	1,10	1,17	56,9
14.05	63,6	1,32	1,20	57,1
14.06	2 ml noradrenaline (1 mg/ml) intramusculair			
14.11	54,7	1,16	1,01	55,4
14.21	59,4	1,38	1,26	58,9
15.05	57,5	1,01	0,82	60,8
15.06	5 ml water intramusculair			
15.10	56,0	1,02	0,92	59,1
15.21	63,6	1,16	1,04	59,1
16.10	61,7	1,11	0,84	59,4
16.11	5 ml adrenaline (1 mg/ml) intramusculair			
16.16	62,4	1,18	0,97	57,9
16.25	58,0	1,47	1,10	60,0
16.35	66,2	1,71	1,26	122,—
17.—	65,5	1,53	1,11	128,—

TABEL 9. Vfa- and glucose concentration in blood samples obtained from Ina after several actions as indicated in the table.

TABEL 10. Azijnzuur- ( $C_2$ ), propionzuur- ( $C_3$ ), boterzuur- ( $C_4$ ) en glucosegehalten in het bloed van kalveren op verschillende data

Naam	Geboortedatum	5-V-1964					12-V-1964					26-V-1964				
		$C_2$ (mg/l)	$C_3$ (mg/l)	$C_4$ (mg/l)	glucose (mg/100 ml)		$C_2$ (mg/l)	$C_3$ (mg/l)	$C_4$ (mg/l)	glucose (mg/100 ml)		$C_2$ (mg/l)	$C_3$ (mg/l)	$C_4$ (mg/l)	glucose (mg/100 ml)	
Stierkalf	1- V-1964	5,0	0,12	0,48	87											
Roosje 11	29- IV-1964	4,2	0,10	0,63	96											
Anna 11	16- IV-1964	4,2	0,14	0,13	67											
Zwartschoft 17	9- IV-1964	8,4	0,12	0,19	75											
Lionne 18	7- IV-1964	7,2	0,28	0,21	85											
Zwartschoft 16	19- III-1964															
Zwartschoft 15	12- III-1964	9,1	0,36	0,26	142											
Lampkje 14	1- XI-1963	7,1	0,38	0,32	68											
Zwartschoft 13	17- XII-1962															
Lampkje 12	1- X-1962															
		4,2	0,11	0,12	67											
		4,4	0,11	0,14	78											
		8,3	0,30	0,11	75											
		15,8	0,80	0,30	74											
		12,1	0,48	0,42	82											
		23,1	0,46	0,24	61											
		3,2	0,10	0,07	106											
		6,3	0,22	0,18	78											
		6,0	0,30	0,16	90											
		6,8	0,28	0,16	94											
		6,4	0,23	0,43	80											
		5,6	0,26	0,18	91											
		19,8	0,43	0,24	64											
		20,3	0,63	0,17	56											

TABEL 10. Acetic acid ( $C_2$ ), propionic acid ( $C_3$ ), butyric acid ( $C_4$ ) and glucose concentration in blood samples of calves on different dates.



### 3. ACETONAEMIE

'Ketosis represents carbohydrate deficiency, not starvation.'

Nutrition Reviews, 22 (1964) 102

Acetonaemie of slepende melkziekte is een aandoening, voornamelijk voorkomende bij lacterende runderen, waaraan reeds zeer veel onderzoek is gewijd. Klassiek is de beschrijving, die SJOLLEMA en VAN DER ZANDE in 1923 van het ziektebeeld hebben gegeven:

'This disease usually occurs about a week or ten days after parturition, sometimes somewhat later. It is especially observed in cows that give high milk yields and that are in excellent condition, i.e. more or less fat. The symptoms are: the odor of acetone, lack of appetite, growing worse as the disease advances, some obstruction and production of dry faeces, decreased milk yield and also forced breathing. A small number of the diseased animals are in an excited state. Insufflation of air in the udder is often used in treatment. The animals recover after some time, especially when put out to grass. It is an exception that they die from this disease, and in those cases there is probably a complication. There is considerable loss to the farmer, because of the greatly reduced milkproduction.'

Sedert deze beschrijving van de ziekte werd gegeven, is onze kennis ervan weliswaar toegenomen (SHAW, 1956; SEEKLES, 1960; PEARCE, 1960); maar hoe de ziekte ontstaat en waar de diepere oorzaak er van ligt, is nog steeds onbekend. Daardoor is het niet mogelijk acetonaemie op te wekken, wanneer men dat zou willen. Wel is het mogelijk gebleken door ondervoeding na de partus bij runderen sommige verschijnselen van acetonaemie te verkrijgen: hypoglycaemie en verhoging van de gehalten aan ketonlichamen in bloed en urine (HENDRIKS, 1963). In hoeverre dit beeld overeenkomt met het ziektebeeld der acetonaemie is nog de vraag. Een duidelijk verschil is bijv. de bereidheid tot voedselopname. Deze is bij acetonaemie slecht, vaak grillig of zelfs geheel afwezig; bij ondervoeding echter ziet men juist het tegenovergestelde.

In het algemeen gesproken ontstaat het symptoom acetonaemie, zoals in de inleiding is besproken, ten gevolge van overmatige vorming van ketonlichamen uit vetzuren in de lever. Deze vetzuren zijn grotendeels afkomstig uit de energiedepôts van het lichaam: het vetweefsel. Het lichaamsvet speelt nl. een belangrijke rol in de energiehomeostase van het organisme.

De 'calorieën' in het opgenomen voedsel, zowel die in koolhydraten en eiwitten als die in de vetten, die niet onmiddellijk worden verbruikt, worden opgeslagen om benut te worden zodra er behoefte aan is. Dit bewaren geschiedt in de vorm van vet: voornamelijk palmitinezuur, stearinezuur en oliezuur, veresterd aan glycerol. Voor de vorming van dit vet zijn koolhydraten onontbeerlijk, al was het alleen maar voor het glycerol-deel van het molecule.

Mobilisatie geschiedt door afbraak tot glycerol en hogere vetzuren, welke laatsten, gebonden aan proteïnen, als niet veresterde vetzuren (N.E.F.A.) door

het bloed kunnen worden getransporteerd. De tegelijkertijd gevormde glycerol komt eveneens vrij; deze kan niet onmiddellijk gebruikt worden voor reësterificatie.

Koolhydraat speelt een zeer belangrijke rol in deze dynamiek van het vetweefsel: Het is nodig voor de opbouw van vet; omgekeerd treedt vetafbraak op bij koolhydraattekort (FRITZ, 1961). Hormonale invloeden zijn hierbij van veel belang (REID e.a., 1963).

Het is in verband hiermee aannemelijk, dat de hypoglycaemie, die bij slepende melkziekte optreedt, een causale rol speelt bij de overmatige vorming van ketonlichamen. Mogelijk dat daarbij de vorming van ketonlichamen uit hogere vetzuren in de penswand ook van belang is (JACKSON e.a., 1964). Bovendien draagt een deel van de vvez, die in grote hoeveelheden uit de pens worden geresorbeerd, tot de vorming van ketonlichamen bij; in hoeverre glucosetekort hierop bevorderend werkt, is nog onvoldoende bekend.

Vanzelfsprekend doen zich voor het ontstaan van een koolhydraattekort bij slepende melkziekte twee mogelijkheden voor.

1. Onvoldoende vorming van glucose uit het opgenomen voedsel.
2. Te groot verlies aan glucose ten gevolge van de grote melkproductie. Men zou dit in vele gevallen kunnen opvatten als een gevolg van een hoog opgedreven melkproductie bij het moderne rund, waarmede nog niet is gezegd, dat men naar minder productief melkvee zou moeten streven.

Of korter gezegd: De uit het opgenomen voer gevormde glucose is onvoldoende voor de melkproductie. Vaak wordt hiervoor onvoldoende voeding of onjuiste gisting met de vorming van te weinig propionzuur verantwoordelijk gesteld (VAN ADRICHEM, 1962). Mogelijk echter moet een te hoge melkgift worden overwogen. Men ziet immers bij slepende-melkziektepatiënten de melkgift dalen of deze wordt 'te laag' geacht. Blijkbaar echter is deze geringe(re) melkgift toch niet voldoende of te laat ingetreden om het ontstaan van glucosetekort te voorkomen.

Als deze redenering juist is, ligt de oorzaak van de acetonaemie besloten in het antwoord op de vraag: Waardoor wordt de melkgift zó groot, dat er een glucosetekort ontstaat?

Keren wij na deze bespiegeling terug naar het experiment. Te zamen met Ir. Y. S. Rypkema werden bij een aantal koeien op stalrantsoenen gedurende enkele weken, voornamelijk na het kalven, één maal per week een monster bloed en een monster pensvocht verzameld. Deze koeien waren vóór het kalven passend gevoed, doch kregen daarna een rantsoen, bestaande uit 6 kg goed hooi, 12 kg matig kuilvoer en zoveel krachtvoer, tot de zetmeelwaarde ongeveer 10% te laag was. Sommige van deze koeien vertoonden dan ook een zogenaamde ondervoedingsacetonaemie. Het onderzoek werd uitgevoerd met 7 koeien, waarvan enkele gegevens vermeld zijn in tabel 11.

De monsters werden steeds ongeveer twee uur na de voeding verzameld.

Tijdens deze periode van ondervoeding werden op 13-IV-1964 monsters genomen, nadat vier van de koeien: Zwartschoft 5, Lampkijé 7, Zwartschoft 8 en

TABEL 11. Kalfdatum, geboortedatum en melkgift van 7 koeien, die na het kalven ondervoed werden

Naam	Kalfdatum	Geboortedatum	Melkgift in kg
Roosje	7- I-1964	19- II-1960	19
Betsy	8- I-1964	22-III-1957	22
Lampkje	26- I-1964	30-III-1960	20
Witschoft	3- II-1964	23- X-1960	20
Zwartschoft 8	12-III-1964	9-III-1959	18
Zwartschoft 5	19-III-1964	25-III-1955	21
Lampkje 7	20-III-1964	6-XI-1957	22

TABLE 11. Date of calving, birth date and milk production of seven cows which were underfed after calving.

Witschoft gedurende 24 uur in het geheel geen voedsel hadden gehad; een vijfde koe, Lampkje, kreeg haar gewone rantsoen.

De azijnzuur-, propionzuur- en boterzuurgehalten van alle verzamelde monsters pensvocht zijn achtereenvolgens weergegeven in fig. 23, 24 en 25. Duidelijk is hierin een verlaging van de gehalten dezer drie zuren ten gevolge van het vasten te zien. In de figuren 26, 27 en 28, waarin de gehalten van de vyz in het bloed zijn weergegeven, valt eveneens een duidelijke daling waar te nemen op 13-IV-1964. Tevens blijken de gehalten der vyz in het bloed van Zwartschoft 5 en

FIG. 23 Azijnzuurgehalten in monsters pensvocht op de verschillende data verkregen bij zeven koeien, die een rantsoen ontvingen, waarvan de zetmeelwaarde ongeveer 10% onder de behoefte lag.

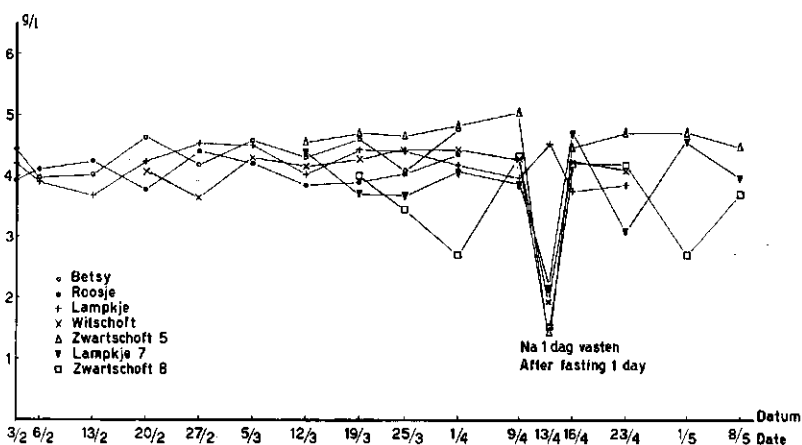


FIG. 23 Acetic acid concentration in rumen fluid samples obtained on the indicated dates from seven cows which received a ration with a starch value that was 10% too low.

FIG. 24 Propionzuurgehalten in de monsters pensvocht, waarvan de azijnzuurgehalten zijn weergegeven in fig. 23.

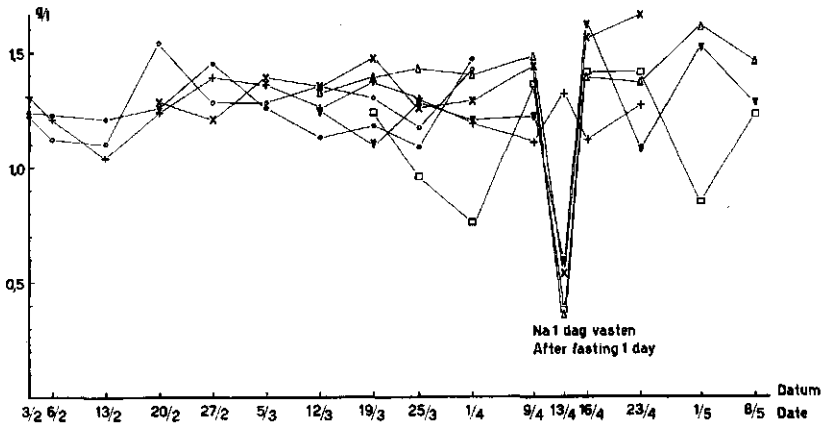


FIG. 24 Propionic acid concentration in the rumen fluid samples indicated in the caption to fig. 23.

Lampkje 7 op 12-III en 19-III lager te zijn dan daarna, terwijl de pensvochtgehalten op die data niet afwijkend waren. Uit tabel 11 blijkt echter, dat deze waarnemingen gedaan zijn nog vóór of op de kalfdatum. Dit wordt in 4.1.3.1. nader besproken.

FIG. 25 Boterzuurgehalten in de monsters pensvocht, waarvan de azijnzuurgehalten zijn weergegeven in fig. 23.

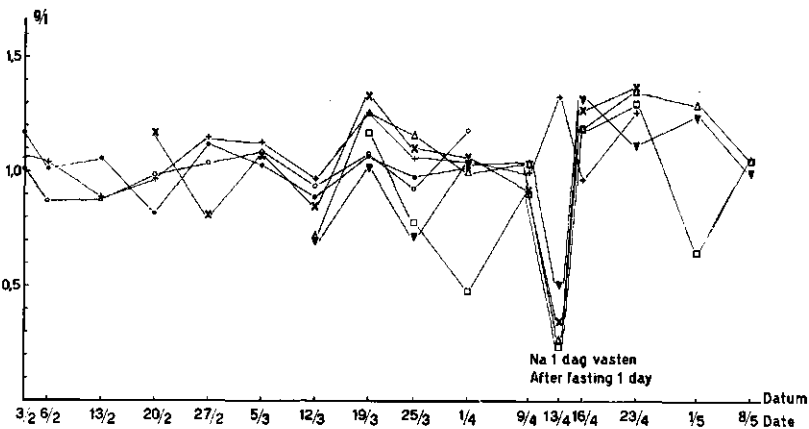


FIG. 25 Butyric acid concentration of the rumen fluid samples indicated in the caption to fig. 23.

FIG. 26 Azijnzuurgehalten in monsters bloed van dezelfde koeien en op overeenkomstige tijden verkregen als de monsters pensvocht, waarvan de azijnzuurgehalten zijn weergegeven in fig. 23. Zie voor de betekenis der figuurtjes aldaar.

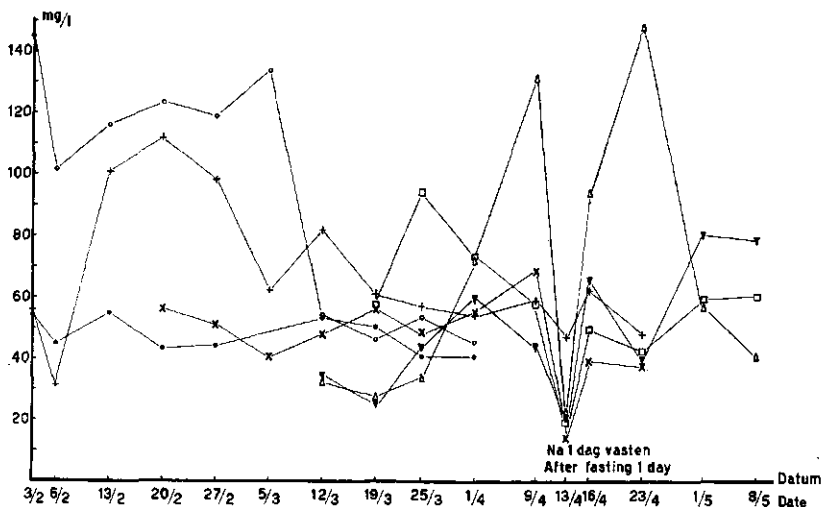


FIG. 26 Acetic acid concentration in blood samples obtained from the same cows and at corresponding times as the rumen fluid samples indicated in the caption to fig. 23.

FIG. 27 Propionzuurgehalten in de monsters bloed, waarvan de azijnzuurgehalten zijn weergegeven in fig. 26.

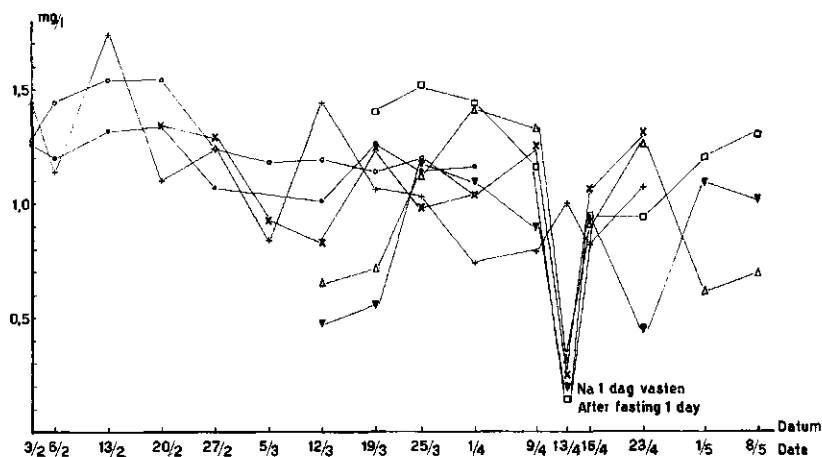


FIG. 27 Propionic acid concentration in the blood samples indicated in the caption to fig. 26.

FIG. 28 Boterzuurgehalten in de monsters bloed, waarvan de azijnzuurgehalten zijn weergegeven in fig. 26.

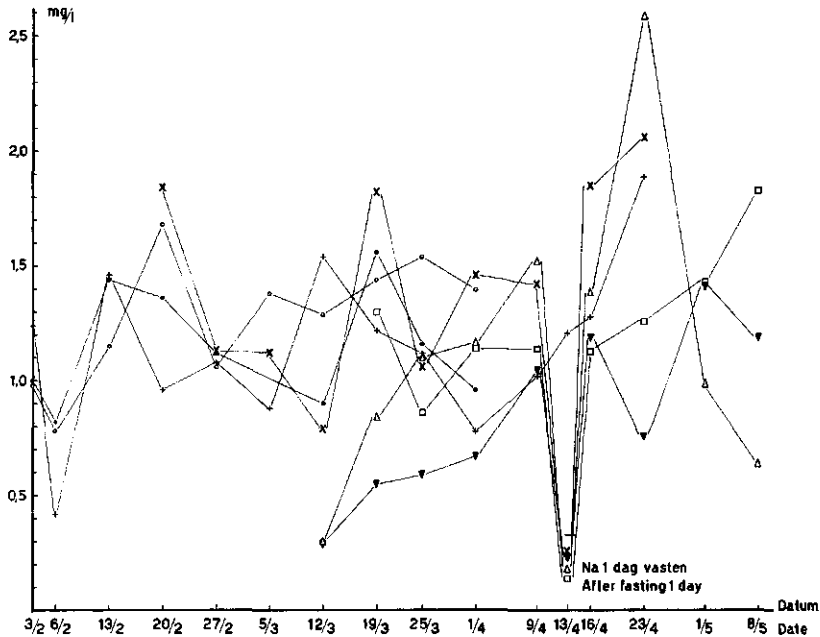


FIG. 28 Butyric acid concentration in the blood samples indicated in the caption to fig. 26.

Voorts valt het op, dat de gehalten van het azijnzuur in het bloed (fig. 26) bij sommige koeien nog al grote verschillen tonen in het verloop van de tijd. Dit is vooral het geval bij Betsy en Zwartschoft 5, twee der ondervoede koeien die een duidelijk verhoogd acetongehalte in haar bloed hadden.

De hoeveelheden vvv in het bloed van deze dieren zijn daarom nogmaals weergegeven, te zamen met de acetongehalten, in fig. 29 voor Betsy en in fig. 30 voor Zwartschoft 5. Ter vergelijking zijn tevens de overeenkomstige gegevens, verkregen bij Roosje, een ondervoede koe waarbij het acetongehalte in het bloed niet verhoogd was, opgenomen in fig. 29. In deze figuren valt een verband tussen de azijnzuur- en acetongehalten waar te nemen. Hoge acetongehalten gaan gepaard met hoge azijnzuurgehalten en omgekeerd. Dat dit niet samenhangt met afwijkingen in het pensvocht, blijkt uit fig. 31 en 32, waarin de gehalten der vvv in de terzelfder tijd als de bloedmonsters verzamelde pensvochten van Roosje en Betsy, resp. Zwartschoft 5, zijn opgenomen.

Van de koeien Roosje en Betsy waren op 24-I-1964, ruim 14 dagen na het kalven, in de loop van de dag vier maal monsters bloed en pensvocht genomen. De analyse-uitkomsten hiervan zijn weergegeven in tabel 12. Hieruit blijkt, dat, hoewel het azijnzuurgethalte van het bloed in de loop van de dag daalde, er voortdurend een hoger azijnzuurgethalte was bij de koe met de hoogste acetoncijfers.

FIG. 29 Vvz- en acetongehalten in het bloed van Roosje en Betsy op de vermelde data. C<sub>2</sub> is azijnzuur, C<sub>3</sub> is propionzuur en C<sub>4</sub> is boterzuur.

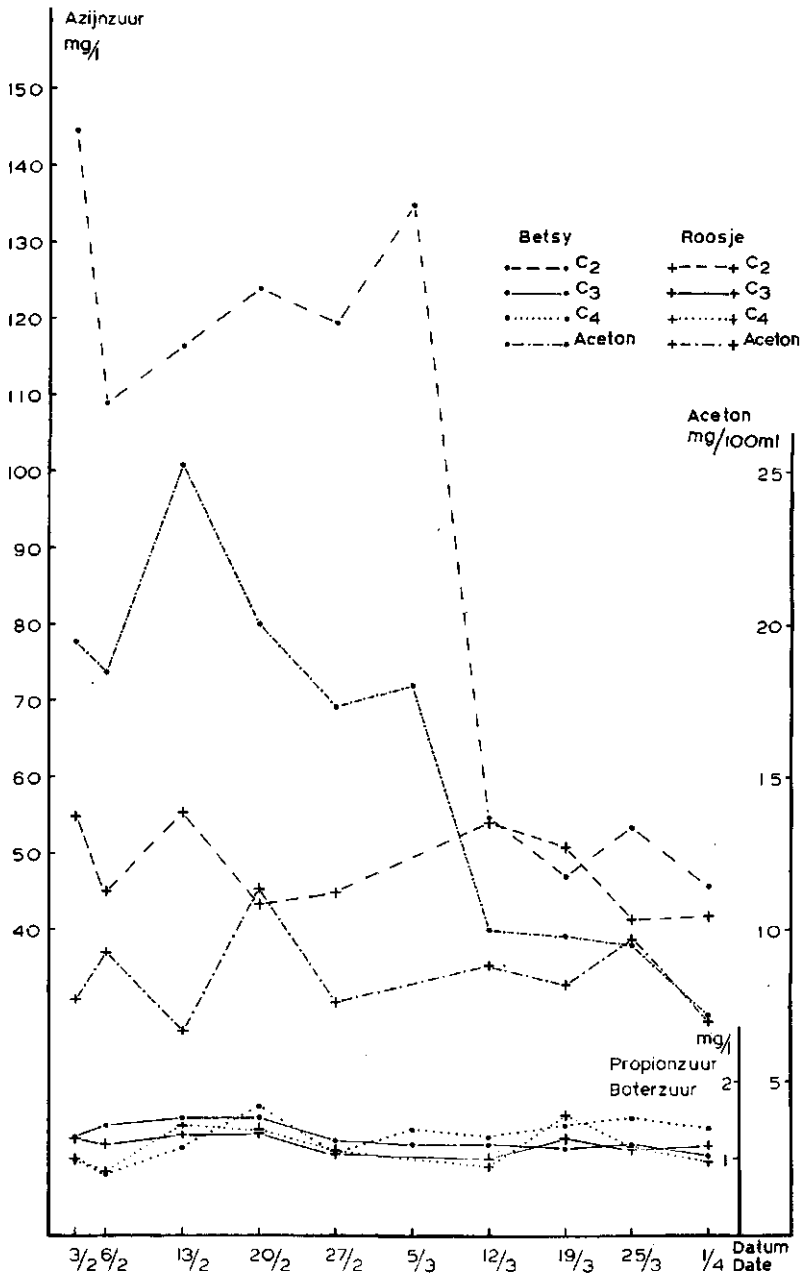


FIG. 29 Vfa- and ketone bodies concentrations in the blood of Roosje and Betsy on the indicated dates. C<sub>2</sub>= acetic acid, C<sub>3</sub>= propionic acid and C<sub>4</sub>= butyric acid.

FIG. 30 Vvz- en acetongehalten in het bloed van Zwartschoft 5 op de vermelde data. C<sub>2</sub> is azijnzuur, C<sub>3</sub> is propionzuur en C<sub>4</sub> is boterzuur.

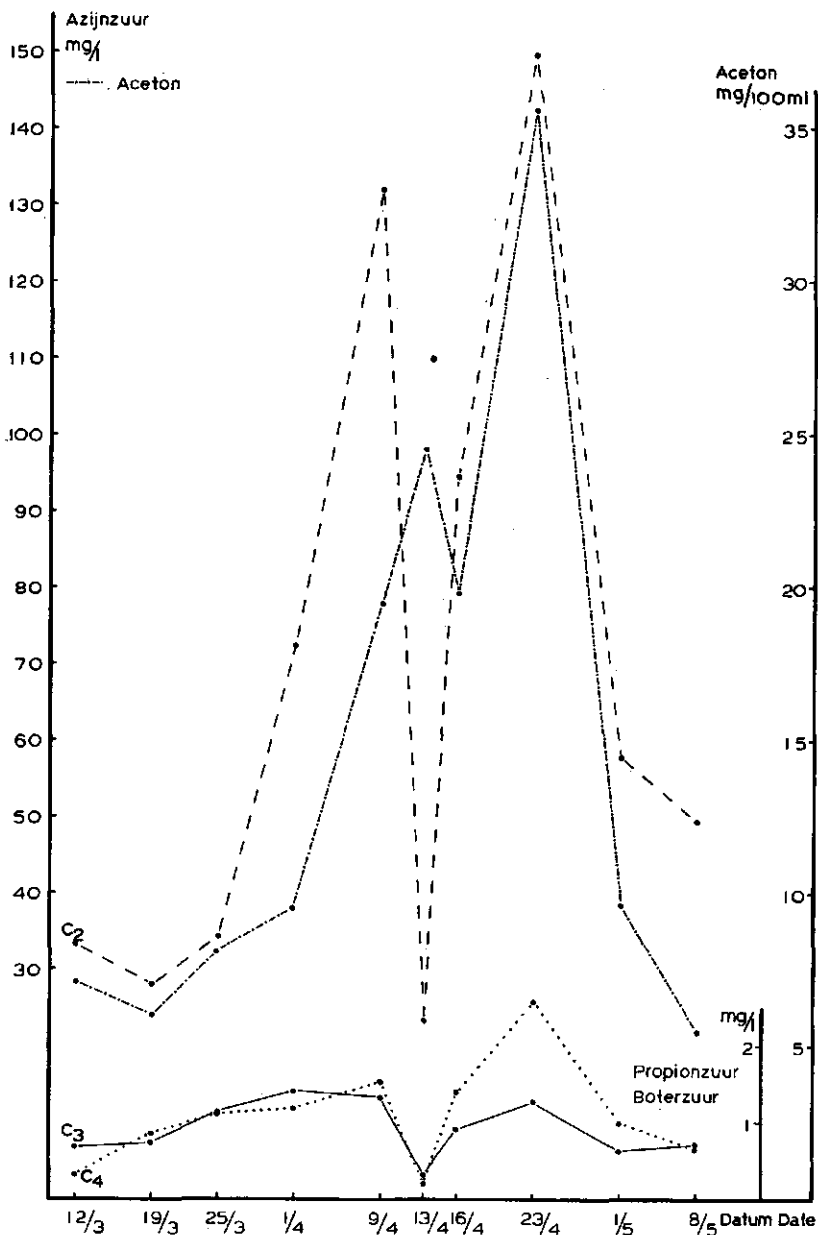


FIG. 30 Vfa- and ketone bodies concentrations in the blood of Zwartschoft 5 on the indicated dates, C<sub>2</sub>= acetic acid, C<sub>3</sub>=propionic acid and C<sub>4</sub>= butyric acid.



FIG. 31 Vvz-gehalten in monsters pensvocht van Roosje en Betsy, op overeenkomstige tijden verkregen als de monsters bloed, waarvan de vvz-gehalten zijn weergegeven in fig. 29. C<sub>2</sub> is azijnzuur, C<sub>3</sub> is propionzuur en C<sub>4</sub> is boterzuur.

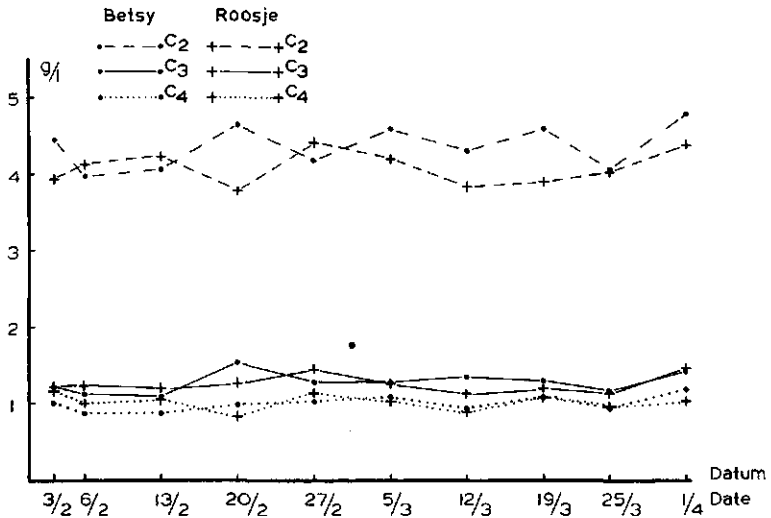


FIG. 31 Vfa-concentrations in rumen fluid samples of Roosje and Betsy obtained at corresponding times as the blood samples indicated in the caption to fig. 29. C<sub>2</sub>= acetic acid, C<sub>3</sub>=propionic acid and C<sub>4</sub>= butyric acid.

FIG. 32 Vvz-gehalten in monsters pensvocht van Zwartschoft 5, op overeenkomstige tijden verkregen als de monsters bloed, waarvan de vvz-gehalten zijn weergegeven in fig. 30. C<sub>2</sub> is azijnzuur, C<sub>3</sub> is propionzuur en C<sub>4</sub> is boterzuur.

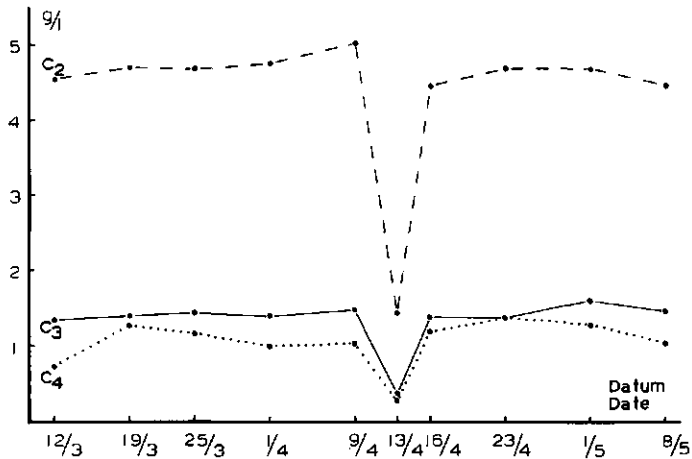


FIG. 32 Vfa-concentrations in rumen fluid samples of Zwartschoft 5 obtained at corresponding times as the blood samples indicated in the caption to fig. 30.

TABEL 12. Azijnzuur- (C<sub>2</sub>), propionzuur- (C<sub>3</sub>), boterzuur- (C<sub>4</sub>), aceton-, en glucosegehalten in het bloed en C<sub>2</sub>-, C<sub>3</sub>- en C<sub>4</sub>-gehalten in het pensvocht van Roosje en Betsy op 4 verschillende tijdstippen

Koe	Tijd	Bloed				Pensvocht			
		C <sub>2</sub> (mg/l)	C <sub>3</sub> (mg/l)	C <sub>4</sub> (mg/l)	Aceton (mg/100 ml)	Glucose (mg/100 ml)	C <sub>2</sub> (g/l)	C <sub>3</sub> (g/l)	C <sub>4</sub> (g/l)
Roosje	9.50	78,8	2,72	1,34	6,9	45,7	4,02	1,34	0,98
	12.—	42,1	1,00	0,72	6,0	44,7	4,13	1,29	1,02
	14.—	44,2	0,84	0,54	9,4	46,5	3,44	0,98	0,94
	16.—	24,9	0,48	0,28	6,2	49,4	3,26	0,90	0,87
Betsy	10.—	157,2	3,04	1,52	24,8	41,2	4,28	1,31	0,98
	12.—	136,7	1,42	0,92	25,8	39,3	3,94	1,11	1,02
	14.—	77,9	1,01	0,53	21,5	42,3	3,72	0,96	0,98
	16.—	78,0	0,88	0,40	21,2	42,0	2,36	0,56	0,60

TABEL 12. Acetic acid (C<sub>2</sub>), propionic acid (C<sub>3</sub>), butyric acid (C<sub>4</sub>), acetone and glucose concentration in blood samples and C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> concentration in rumen fluid samples obtained at the corresponding times from Roosje and Betsy.

Om de betrekking tussen aceton- en azijnzuurwaarden van het bloed der ondervoede koeien nader te bezien, werd een puntendiagram gemaakt van alle verzamelde gegevens met op de X-as de acetongehalten in mg/100 ml en op de Y-as de azijnzuurgehalten in mg/l. Ook hieruit blijkt, dat hoge acetongehalten over het algemeen te zamen voorkomen met hoge azijnzuurwaarden (fig. 33).

Wellicht is het van belang hierbij nog op te merken, dat deze 'ondervoedings-acetonaemie' niet gepaard ging met een duidelijke hypoglycaemie.

Ook bij koeien met een klinische acetonaemie werd in een aantal gevallen een duidelijk verhoogd azijnzuurgehalte in het bloed gevonden (AAFJES, 1964).

Min of meer vooruitlopend op de definitieve vaststelling van dit verband tussen azijnzuur en aceton in het bloed, werd getracht bij de niet ondervoede fistelkoe Ina door middel van een infusie van azijnzuur en boterzuur in de pens verschijnselen van acetonaemie op te wekken.

Zoals eerder vermeld, kalfde deze koe op 10-X-1963. Op 4-XI-1963 werd om 17 uur begonnen met behulp van een doseerpomp 35 l water per 24 uur door de fistel in de pens te pompen. Het rantsoen bestond per dag uit:

- 8 kg goed hooi,
- 7 kg A-brok en
- 3,5 kg gedroogde pulp.

FIG. 33 Betrekking tussen de aceton- en azijnzuurgehalten in monsters bloed van zeven koeien, waarvan enkele een 'ondervoedings acetonaemie' hadden.

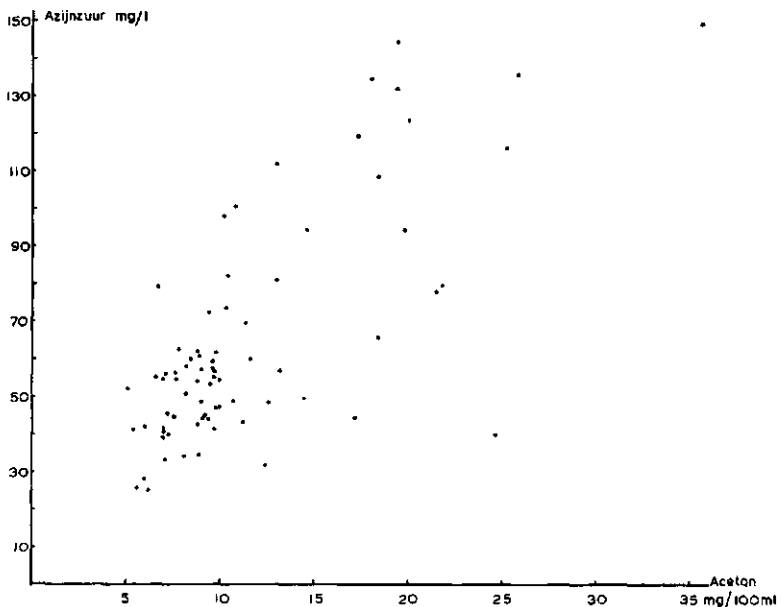


FIG. 33 Relationship between the ketone bodies and acetic acid concentrations in blood samples of seven cows, some of which had a 'hunger ketosis'.

Gevoerd werd om 6 en 16 uur. De melkgift was bijna 25 kg per dag. Iedere morgen, behalve op 10-XI-1963, werden er om ongeveer 9 uur monsters bloed en pensvocht genomen.

De bedoeling was nu om 3,5 kg pulp, een goede koolhydraat-bron, te vervangen door een zodanige hoeveelheid azijnzuur en boterzuur, dat geen ondervoeding zou kunnen ontstaan. De zetmeelwaarde van 3,5 kg gedroogde pulp bedraagt ongeveer 2000 zetmeleenheden, die ook kunnen worden geleverd door 2 kg verteerbaar zetmeel met 8400 kcal in het voeder. Rekenende met een calorische waarde van 3468 voor het azijnzuur en 5954 voor het boterzuur, werd gevonden, dat deze 8400 kcal kunnen worden geleverd door 1,695 kg azijnzuur plus 0,424 kg boterzuur, waarbij gerekend is met 4 delen azijnzuur tegen 1 deel boterzuur, zoals normaal in de pens voorkomt, derhalve in totaal ongeveer 1,6 l azijnzuur en 0,4 l boterzuur. Het is evenwel duidelijk, dat uit 3,5 kg pulp in de pens minder v.v.z. ontstaat dan de hier berekende hoeveelheid.

Op 7 november werd om 18 uur begonnen in plaats van water elke dag een oplossing, bestaande uit 800 ml ( $\pm$  848 g) azijnzuur + 200 ml ( $\pm$  192 g) boterzuur gedeeltelijk geneutraliseerd tot pH 4,2 met 15 ml KOH 50% + 150 ml NaOH 50% en verdund met 34 l water, in de pens te pompen. Tegelijkertijd werd de hoeveelheid pulp in het rantsoen gehalveerd.

Door het inpompen van deze hoeveelheden zuur bleek het percentage boterzuur in het pensvocht verlaagd te worden. Op 5 en 6 november, nog voor het toedienen der zuren begon, was de verhouding  $C_2 : C_3 : C_4 = 70 : 16,6 : 13,4$ , resp.  $70,2 : 16,6 : 13,2$ , op 8 november was de verhouding  $73,9 : 14,7 : 11,4$  en op 12 november  $73,5 : 16,9 : 9,6$ , berekend op mEq. Daarom werd op 12 november om 17.30 uur de infusievloeistof door verhoging van de hoeveelheid boterzuur gewijzigd in 800 ml ( $\pm$  848 g) azijnzuur + 400 ml ( $\pm$  384 g) boterzuur per 24 uur, gedeeltelijk geneutraliseerd tot pH 4,2 met 20 ml KOH 50% + 300 ml NaOH 50% en verdund met 34 l water, waardoor op 13 november de verhouding der penszuren  $70,1 : 15,4 : 14,5$  was. De daling van het boterzuurpercentage was dus weer te niet gedaan.

De toediening van deze hoeveelheden zuur gaf geen duidelijke stoornissen te zien; de koe bleef haar rantsoen opnemen en gaf goed melk. Daarom werd op 15 november om 17 uur de infusievloeistof door verhoging van de hoeveelheid azijnzuur veranderd in 1600 ml ( $\pm$  1696 g) azijnzuur + 400 ml ( $\pm$  384 g) boterzuur per 24 uur, gedeeltelijk geneutraliseerd tot pH 3,8 met 60 ml KOH 50% + 300 ml NaOH 50% en verdund met 34 l water. Tegelijkertijd werd alle pulp uit het rantsoen weggelaten. Dit had tot gevolg, dat de melkgift begon te dalen, dat 's avonds 16 november geen krachtvoer meer werd gegeten en de koe naar aceton begon te rieken. Op 17 november at Ina alleen nog wat hooi en stro; zij was suf, had een wat ruig en dof haarkleed, gaf slechts 13 kg melk en rook naar aceton; kortom zij had alle symptomen van een klinische acetonaemie, zelfs met het verschijnsel van de wat droge mest dat hierbij als regel voorkomt.

Nadat om 17.30 uur nog monsters bloed en pensvocht waren genomen, werd de infusievloeistof gewijzigd in 800 ml ( $\pm$  848 g) azijnzuur + 400 ml ( $\pm$  396 g) propionzuur + 200 ml ( $\pm$  192 g) boterzuur, gedeeltelijk geneutraliseerd tot pH

4,2 met dezelfde hoeveelheid loog als hiervoor en aangevuld met 34 l water. De hoeveelheden azijnzuur en boterzuur werden dus gehalveerd en bovendien werd propionzuur toegevoegd.

Hierdoor veranderde de toestand de volgende dag reeds duidelijk; de koe werd minder suf, wilde weliswaar nog geen krachtvoer eten, maar wel pulp, die nu weer werd verstrekt, en hooi, terwijl de melkgift weer toenam.

's Avonds, 18 november, werd de hoeveelheid propionzuur in de infusievloeistof gehalveerd tot 200 ml ( $\pm$  198 g). Op 19 november was Ina vrijwel hersteld; ze at nu ook weer A-koek, hoewel nog niet de hoeveelheid van het oorspronkelijke rantsoen en ook niet in korrelvorm; de infusie werd daarom 's avonds geheel gestaakt. Hierna trad zonder verdere maatregelen algeheel herstel in.

De uitkomsten van de analyses van het pensvocht zijn weergegeven in fig. 34, die van het bloed in fig. 35. In de periode van 13-20 november werden tevens

FIG. 34 Vvz-gehalten in het pensvocht van Ina op verschillende data. Er werden zuren aan de pensinhoud toegevoegd als in de figuur aangegeven.  $C_2$  is azijnzuur,  $C_3$  is propionzuur en  $C_4$  is boterzuur.

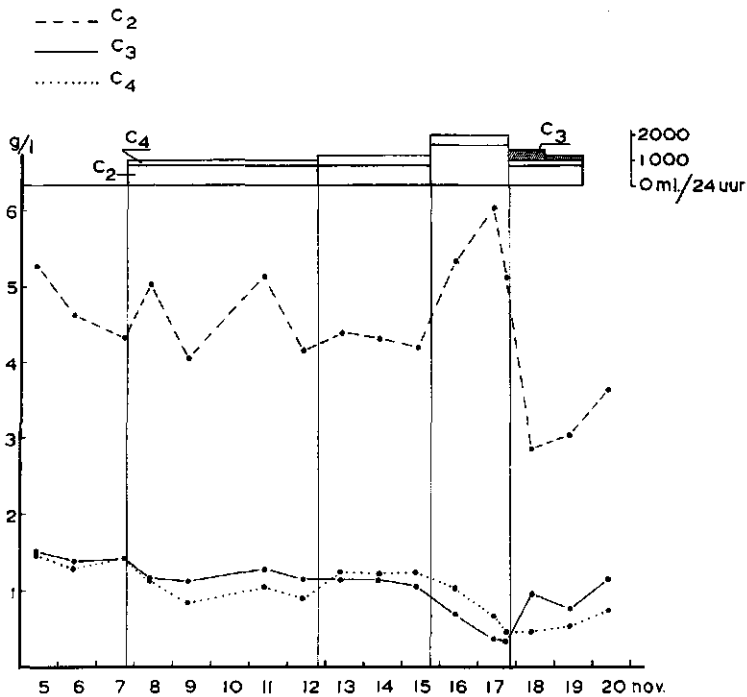


FIG. 34 Vfa-concentrations in the rumen fluid of Ina on different dates. Solutions of vfa were continually pumped into the rumen as indicated in the figure.  $C_2$ =acetic acid,  $C_3$ = propionic acid and  $C_4$ = butyric acid.

FIG. 35 Vvz-, aceton-, aceton + bèta-hydroxy-boterzuur ( $\beta$  hydr. boterzuur)- en glucosegehalten in monsters bloed van Ina, op overeenkomstige tijden verkregen als de monsters pensvocht waarvan de vvz-gehalten zijn weergegeven in fig. 34. In figuur 35 is ook de melkgift opgenomen.  $C_2$  is azijnzuur,  $C_3$  is propionzuur en  $C_4$  is boterzuur.

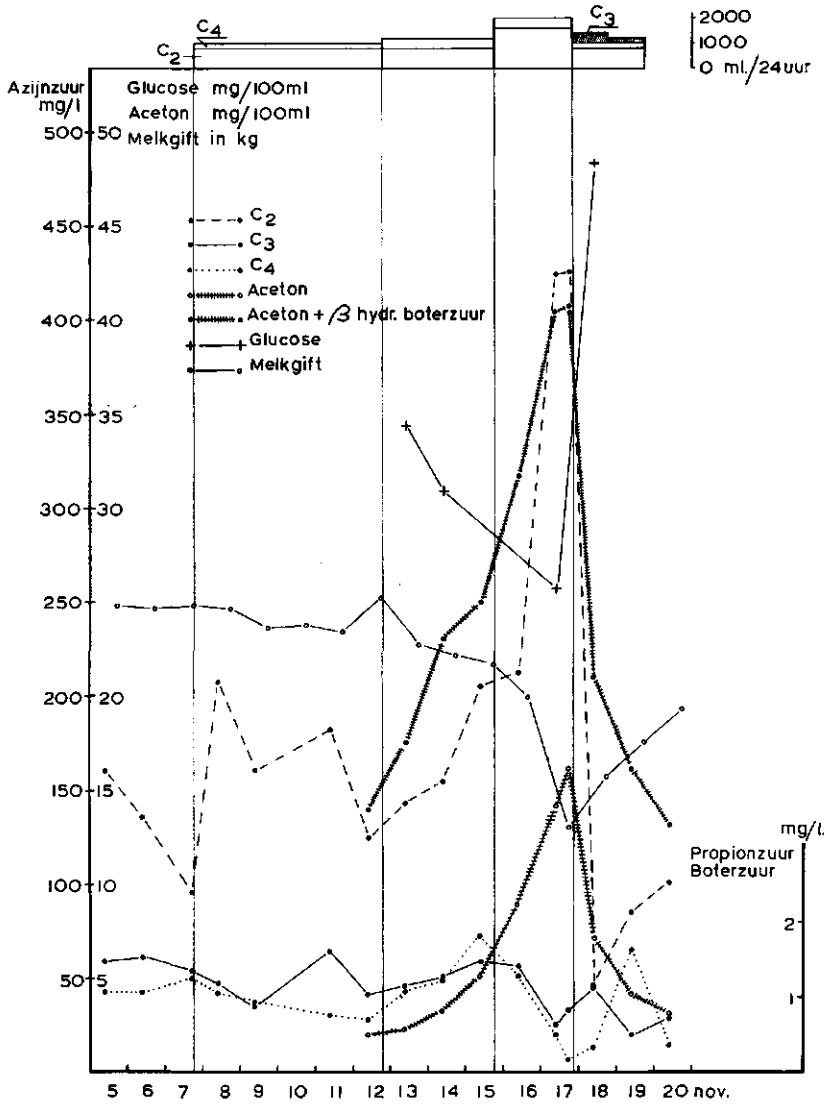


FIG. 35 Vfa-, ketone bodies and glucose concentrations in blood samples of Ina obtained at corresponding times as the rumen fluid samples used for fig. 34. The milk production is also indicated.  $C_2$ = acetic acid,  $C_3$ = propionic acid and  $C_4$ = butyric acid.

enkele monsters bloed genomen voor glucose- en acetonbepaling; de uitkomsten hiervan zijn eveneens weergegeven in fig. 35.

Uit deze figuren blijkt, dat ook nu weer het acetongehalte steeg bij een toenemende hoeveelheid azijnzuur in het bloed. De klinische verschijnselen traden tegelijk hiermee op. Zoals te verwachten was, werd de hoeveelheid propionzuur in het bloed lager; maar ook met het boterzuur was dit het geval. In hoeverre een verandering van de pensgisting hiervoor verantwoordelijk is geweest, valt niet te zeggen.

Verondersteld zou kunnen worden, dat als gevolg van een verstoring der pensgisting een vermindering van de voedselopneming was opgetreden, zodat eigenlijk gesproken zou moeten worden van een ondervoedings-acetonaemie. Dit lijkt echter niet waarschijnlijk. Eerst op 16 november 'savonds wilde Ina het krachtvoer nl. niet meer eten; tot die tijd werd het rantsoen volledig opgenomen. Bovendien daalde de melkgift, zodat calorieëntekort waarschijnlijk niet de oorzaak van de verschijnselen is geweest.

Dat de pensgisting niet ernstig gestoord geweest is, mogelijk alleen geremd, mag misschien afgeleid worden uit het snelle herstel van de eetlust na het staken der azijnzuurtoediening, ja zelfs al na het verminderen daarvan.

In hoeverre het hier vermelde kan worden gezien als een beschrijving van het kunstmatig opwekken van acetonaemie zal nader onderzoek moeten uitmaken. De belangrijkste symptomen kwamen weliswaar overeen met die van slepende melkziekte, het prompte herstel wijst er echter op, dat de eigenlijke oorzaak van de echte acetonaemie elders ligt. Wel kan worden vastgesteld, dat ook deze uitkomsten wijzen op een nauwe samenhang tussen azijnzuur- en acetongehalte van het bloed.

## 4. BESPREKING DER UITKOMSTEN

'It might almost be suggested that man's mind has been constructed in such a manner that he tends to see all process in the world in terms of cycles, as did the early cosmologists; and hence there is an overwhelming tendency for men to think in circles.'

B. C. GOODWIN, 1963 Temporal organisation in cells, blz. 21

### 4.1. BETREKKING TUSSEN DE VVZ-GEHALTEN VAN PENSVOCHT EN BLOED

Zoals in de inleiding schematisch is aangegeven, ontstaan in de voormagen der herkauwers grote hoeveelheden vvz. De belangrijkste stoffen, waaruit deze vvz door de pensflora en fauna worden gevormd, zijn de ruwe celstof en de overige koolhydraten van het opgenomen voeder. Een deel van de voedereiwitten wordt echter eveneens omgezet in vvz, waarbij zuren met vertakte koolstofketen kunnen ontstaan (EL SHAZLY, 1952). Het is waarschijnlijk, dat op deze wijze 70–80% der beschikbare energie van het voedsel aan het dier ten goede komt (WARNER, 1964). Resorptie van de gevormde vetzuren geschiedt voor het grootste deel via de penswand, waarbij een gedeelte, vooral van het boterzuur, wordt omgezet in ketonlichamen (PENNINGTON, 1952). Hoe groot dit gedeelte is, staat nog onvoldoende vast.

Behalve in de pens, ontstaan ook nog vvz in de dikke darm. Waarschijnlijk echter is de hoeveelheid die hier gevormd wordt maar gering; de concentratie in het coecum is namelijk ongeveer  $\frac{1}{4}$  van die in de pens, terwijl de coecuminhoud slechts  $\frac{1}{10}$  deel van de pensinhoud bedraagt (ANNISON e.a., 1957).

#### 4.1.1. De onderlinge betrekkingen tussen de vluchtige vetzuren in het pensvocht

Op rantsoenen van gemiddelde samenstelling zijn de verhoudingen, waarin de vvz in het pensvocht voorkomen, gewoonlijk zeer gelijkmatig. Dit komt ook tot uiting in de fig. 36, 37 en 38, waarin een aantal pensvochtgehalten van Ina en alle pensvochtgehalten van de zeven ondervoede koeien, vermeld in hoofdstuk 3, als volgt tegen elkaar zijn uitgezet:

fig. 36: X-as boterzuur in g/l, Y-as azijnzuur in g/l,

fig. 37: X-as propionzuur in g/l, Y-as azijnzuur in g/l,

fig. 38: X-as propionzuur in g/l, Y-as boterzuur in g/l.

Van Ina zijn alleen de gegevens gebruikt van de pensvochten, die waren verkregen zonder dat zuren aan de pensinhoud waren toegevoegd. Van Zwartschoft 5, Lampkje 7, Zwartschoft 8 en Witschoft zijn ook de gehalten in de pensvochten van 13-III-1964, nadat de dieren 24 uur geen voeder hadden gehad, opgenomen in de figuren. De lage concentraties van deze pensvochten geven punten, die duidelijk buiten de meerderheid liggen.

Bij het beschouwen van de figuren is het van belang te bedenken, dat de gegevens van de ondervoede koeien zijn verkregen uit monsters, die gedurende enkele



FIG. 36 Betrekking tussen de boterzuur- en de azijnzuurgehalten van monsters pensvocht, verkregen bij Ina en bij zeven koeien die een rantsoen ontvingen waarvan de zetmeelwaarde 10% onder de behoefte lag.

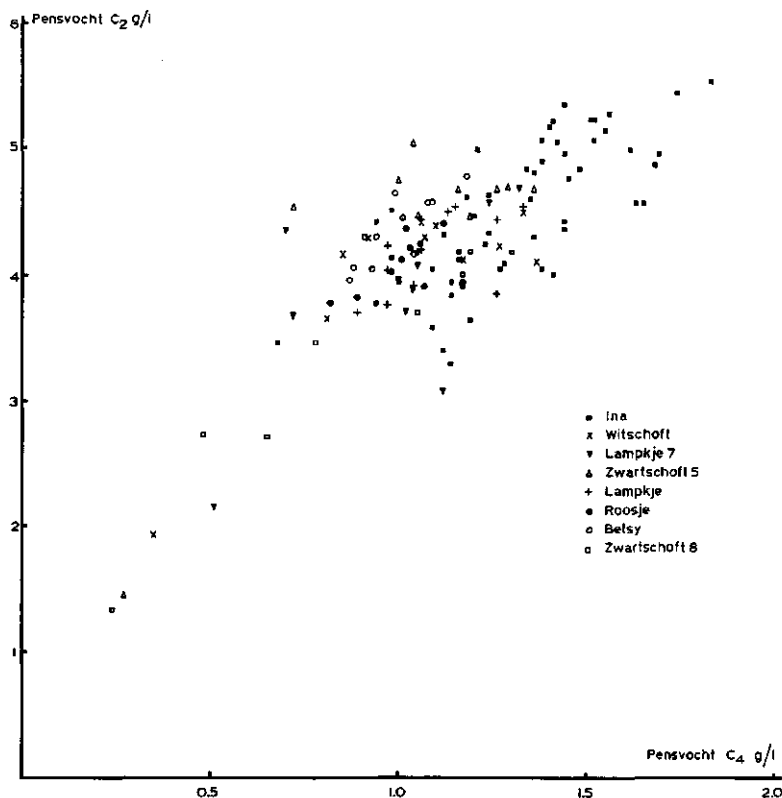


FIG. 36 Relationship between the butyric and acetic acid concentrations in rumen fluid samples obtained from Ina and seven cows which received a ration with a starch value that was 10% too low.

le weken na het kalven waren genomen, steeds op hetzelfde tijdstip, twee uur nadat gevoerd werd. De monsters van Ina daarentegen werden verzameld gedurende een periode van ongeveer een half jaar, terwijl de uren van de dag, waarop ze verzameld werden, sterk varieerden. Dit laatste heeft tot gevolg, dat de vgz-gehalten in het pensvocht verschillen kunnen tonen, naar aangenomen mag worden tengevolge van meer of minder snelle gisting van het opgenomen voer (fig. 7 en 21).

Voorts zijn de monsters van de ondervoede koeien verkregen met een sonde door de bek. Het is mogelijk, dat hierbij 'besmetting' met speeksel optreedt (VAN ADRICHEM, 1962), waardoor de vgz-gehalten worden verlaagd. Wellicht zijn enkele lage pensvochtgehalten bij de ondervoede dieren hierdoor veroorzaakt (Zwartschoff 8, fig. 23, 24 en 25).

FIG. 37 Betrekking tussen de propionzuur- en azijnzuurgehalten in dezelfde monsters pensvocht als vermeld bij fig. 36. Zie voor de betekenis der figuurtjes fig. 36.

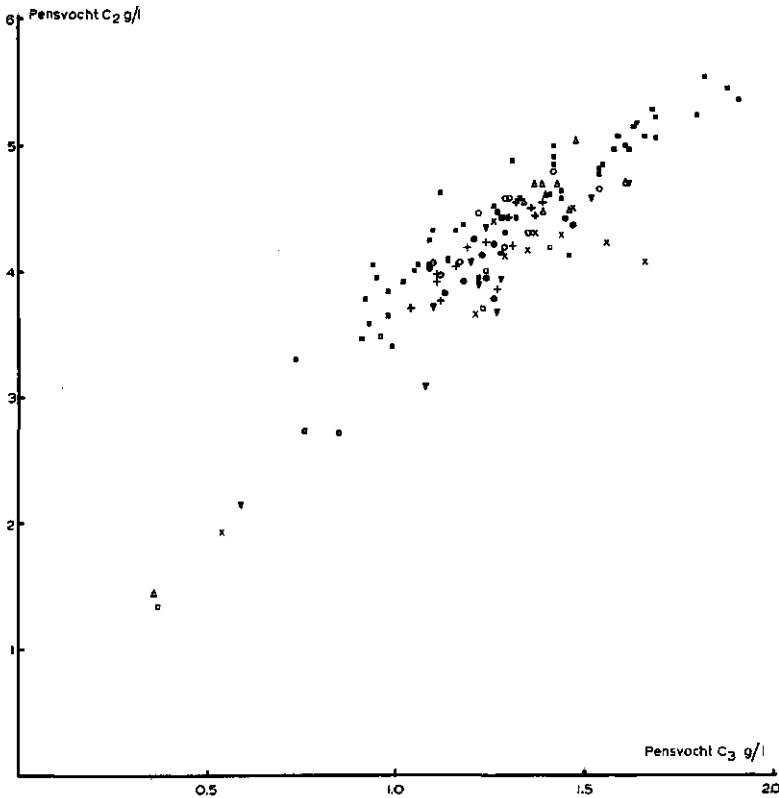


FIG. 37 Relationship between the propionic and acetic acid concentrations in the rumen fluid samples mentioned in the caption to fig. 36.

Door deze invloeden zullen de vvz-concentraties vrij grote verschillen kunnen tonen, zoals ook uit de figuren blijkt.

De verhouding, waarin de zuren in de onderzochte pensvochten voorkwamen, tonen een duidelijk positieve correlatie. Vooral de betrekking tussen azijnzuur en propionzuur is zeer nauw en overeenkomstig bij de verschillende dieren. Wat het boterzuur betreft, dit is zowel ten opzichte van het azijnzuur als ten opzichte van het propionzuur wat lager bij de ondervoede koeien dan bij Ina. Het is mogelijk, dat een verschil in rantsoen hierbij een rol heeft gespeeld; de ondervoede koeien kregen bijvoorbeeld kuilvoer en Ina niet. Voorts kan ook de ondervoeding als zodanig van belang zijn geweest. WILLIAMS en CHRISTIAN (1956) stelden n.l. vast, dat er een positieve correlatie bestaat tussen de opgenomen hoeveelheid voer en de vvz-gehalten van het pensvocht. Bij onvoldoende voederopname worden de gehalten van de verschillende zuren lager, waarbij het percentage

FIG. 38 Betrekking tussen de propionzuur- en boterzuurgehalten in dezelfde monsters pensvocht als vermeld bij fig. 36. Zie voor de betekenis der figuurtjes fig. 36.

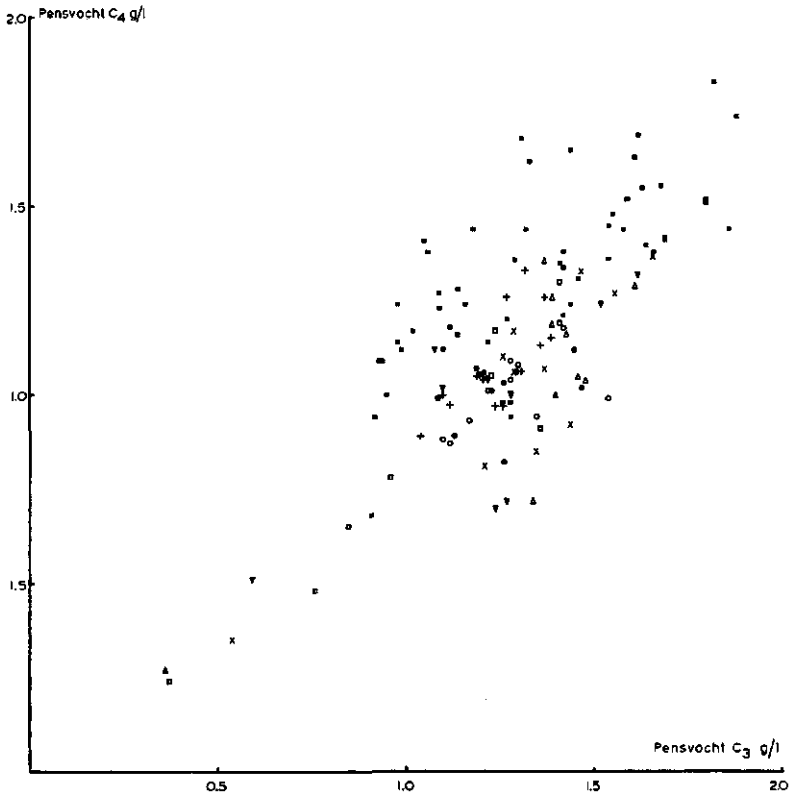


FIG. 38 Relationship between the propionic and butyric acid concentrations in the rumen fluid samples mentioned in the caption to fig. 36.

azijnzuur stijgt ten opzichte van het percentage propionzuur. Dit laatste blijkt niet uit onze bevindingen; maar wellicht is de ondervoeding van onze koeien daartoe niet ernstig genoeg geweest. Wel blijkt uit figuur 37, dat na 24 uur vasten het azijnzuurgehalte ten opzichte van het propionzuurgehalte in het pensvocht verhoogd was, zoals ook door BROWN en SHAW (1957) werd gevonden.

#### 4.1.2. De onderlinge betrekkingen tussen de vluchtige vetzuren in het bloed

Bepalingen van vvz-gehalten in het bloed dienen met het nodige voorbehoud te worden gezien. WARNER (1964), die een overzicht geeft van de verschillende bepalingsmethoden, die zijn gebruikt om de produktie van vvz in de pens te meten, zegt over azijnzuur in het bloed het volgende: 'Mixing in the blood, though more rapid than in the rumen, may have to be considered. The half-life in the blood of labelled acetate ranges from 1.5 to 4 minutes (ANNISON and

LINDSAY, 1961; ESSIG, NORTON and JOHNSON, 1961; LEE and WILLIAMS, 1962), which is of the same order as the mixing time for substances injected into the blood. That would suggest that there must be considerable error in the estimation of the instantaneous specific activity of acetate in the blood, and hence of the half-life and of all values derived from it. Indeed, since acetate is utilised by a number of organs or tissues (BLAXTER, 1962) and produced by others at rates that can be expected to vary with time, and since mixing could be delayed by the occurrence of laminar (streamline) flow in the blood vessels (see discussion in LEWIS, HILL and ANNISON, 1957), it is probable that acetate would not be evenly distributed in the blood at any time. Hence measurements of concentration or specific activity in blood taken at one point may not be reliable guides to conditions throughout the body. Similarly, concentration and specific activity of acetate at any one point might be expected to fluctuate rapidly. This has, in fact, been observed by ANNISON and LINDSAY (1961), ESSIG et al. (1961), ANNISON and WHITE (1962) and LEE and WILLIAMS (1962), who found variations of 20 to 50 per cent within periods as short as 5 minutes'.

Gezien deze reserve ten opzichte van de absolute hoogte der vvz-gehalten, is het van belang te zien hoe de onderlinge verhoudingen van de door ons bepaalde vvz-concentraties in het bloed zijn. Daartoe werden op de wijze als voor pensvochtmonsters in de vorige paragraaf gedaan is, de gehalten aan vvz in bloedmonsters, die tegelijkertijd met deze pensvochtmonsters waren verkregen, als volgt uitgezet:

fig. 39: X-as boterzuur in mg/l, Y-as azijnzuur in mg/l,

fig. 40: X-as propionzuur in mg/l, Y-as azijnzuur in mg/l,

fig. 41: X-as propionzuur in mg/l, Y-as boterzuur in mg/l.

Uit deze figuren blijkt, dat de vvz-gehalten van het bloed onderling minder nauw samen hingen dan die van het pensvocht. Bovendien is er een verschil te zien tussen de punten, die de bepalingen bij Ina vertegenwoordigen en een aantal punten betreffende de bepalingen bij de ondervoede koeien. Sommige van deze laatste koeien hadden een ondervoedingsacetonæmie, welke gepaard ging met hoge azijnzuurgehalten van het bloed (hoofdstuk 3, fig. 33). Door deze hoge azijnzuurgehalten worden ten opzichte van boterzuur en propionzuur punten veroorzaakt in fig. 39 en 40, die liggen boven de punten afkomstig van de overige ondervoede dieren. Iets dergelijks is ook te zien in fig. 41, waarin ten gevolge van hoge boterzuurgehalten ten opzichte van de bijbehorende propionzuurgehalten in het bloed van enkele ondervoede koeien punten worden gezien, die hoger liggen, dan het merendeel der andere punten afkomstig van deze dieren. De koeien met deze hoge boterzuurgehalten waren over het algemeen niet dezelfde als die met de hoge azijnzuurgehalten. Wat de propionzuurgehalten betreft, deze toonden bij de ondervoede dieren, in tegenstelling tot de azijnzuur- en boterzuurgehalten, maar weinig verschillen. Van belang is in verband hiermee nog, dat in de fig. 37 en 38, die de betrekkingen van het propionzuur tot azijnzuur en tot boterzuur in het pensvocht weergeven, van de afwijkingen in het bloed niets terug te vinden is. Dit betekent, dat de afwijkingen in het bloed van

FIG. 39 Betrekking tussen de boterzuur- en de azijnzuurgehalten van monsters bloed, die ongeveer tegelijkertijd en bij dezelfde dieren verkregen werden als de monsters pensvocht gebruikt voor fig. 36.

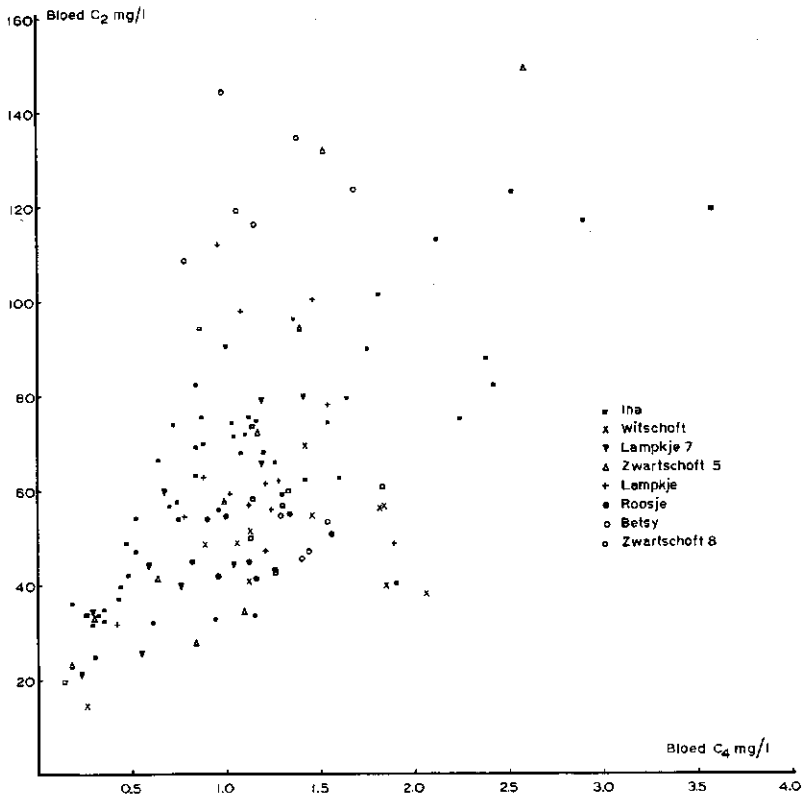


FIG. 39 Relationship between the butyric and acetic acid concentrations in blood samples obtained at corresponding times and from the same cows as the rumen fluid samples mentioned in the caption to fig. 36.

enkele der ondervoede koeien waarschijnlijk niet een gevolg zijn geweest van afwijkingen in het pensvocht.

Worden de ondervoede koeien om de hierboven beschreven vermoedelijke gevolgen van het tekort aan voer buiten beschouwing gelaten, dan blijkt, dat er in het bloed van Ina een vrij nauwe positieve correlatie bestaat vooral tussen de propionzuur- en boterzuurgehalten, minder tussen de gehalten aan propionzuur en azijnzuur en nog iets minder tussen die van boterzuur en azijnzuur. Dit verschil in onderlinge samenhang zal waarschijnlijk veroorzaakt zijn doordat de vvz uit de pens, die toch als de belangrijkste bron van de vvz in het bloed moeten worden beschouwd, op verschillende wijze worden verwerkt. Zoals al in het begin van dit hoofdstuk werd gezegd, wordt een deel van het boterzuur al in

FIG. 40 Betrekking tussen de propionzuur- en de azijnzuurgehalten in dezelfde monsters bloed als vermeld bij fig. 39. Zie voor de betekenis der figuurtjes fig. 39.

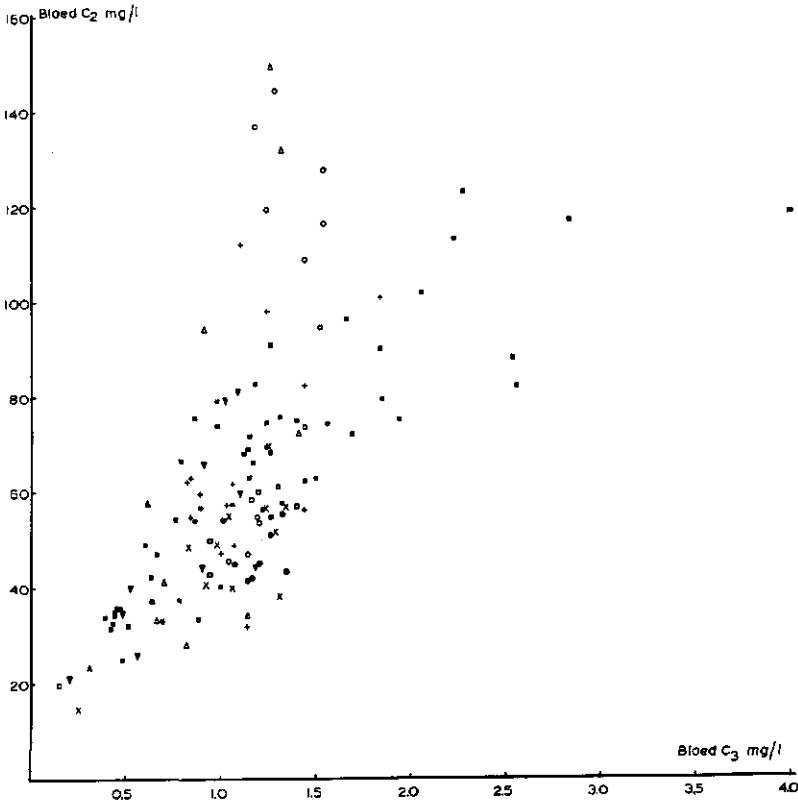


FIG. 40 Relationship between the propionic and acetic acid concentrations in blood samples mentioned in the caption to fig. 39.

de penswand omgezet tot ketonlichamen. Het overblijvende boterzuur en de overige vvz, die via de penswand worden opgenomen, bereiken met het poortaderbloed de lever, waar ze, behoudens het azijnzuur, voor het grootste deel worden verwijderd. Het azijnzuur, dat maar voor een (klein?) deel in de lever wordt opgenomen (SHAW, 1959), vormt het grootste deel van de vvz, die normaal in het perifere bloed voorkomen. Het kan door zeer veel weefsels als energiebron worden gebruikt en het wordt in grote hoeveelheden door de melkgevendende uier opgenomen (McClymont, 1951).

Dat er onder normale omstandigheden tussen de vvz-gehalten van het bloed toch een duidelijk onderling verband blijkt te bestaan, moet naar onze mening samenhangen met het feit, dat deze gehalten in belangrijke mate afhankelijk zijn van de opname uit de pens. Hierop wordt in de volgende paragraaf nader ingegaan.

FIG. 41 Betrekking tussen de propionzuur- en boterzuurgehalten in dezelfde monsters bloed als vermeld bij fig. 39. Zie voor de betekenis der figuurtjes fig. 39.

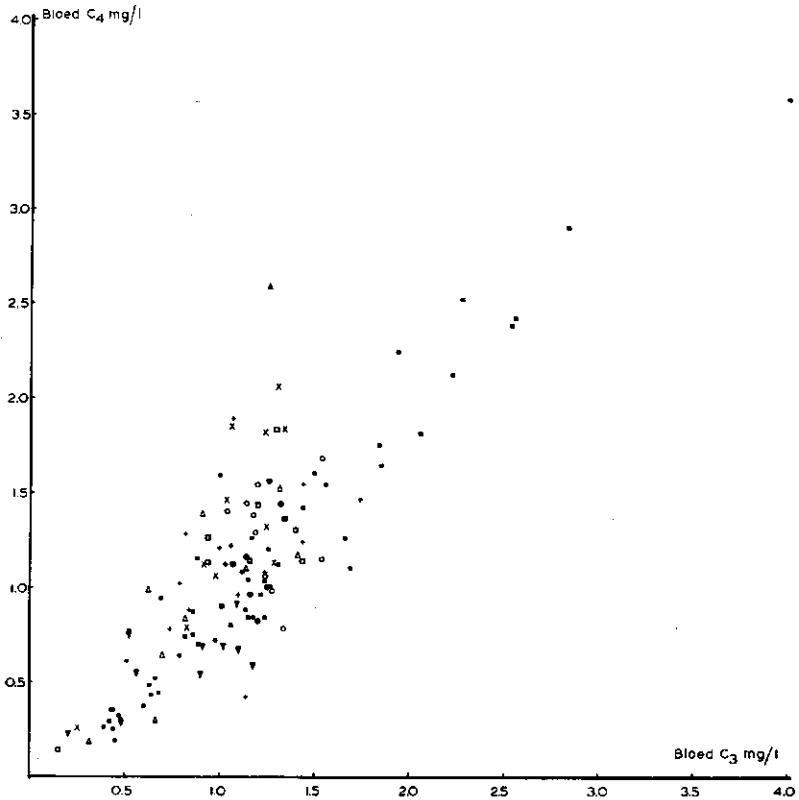


FIG. 41 Relationship between the propionic and butyric acid concentrations in the blood samples mentioned in the caption to fig. 39.

Naast de vvz in de pens zijn ook andere factoren van belang voor de vvz-gehalten in het bloed. Eén van de belangwekkendste daarvan is de stijging der vvz-gehalten onder invloed van 'emoties', beschreven in paragraaf 2.3.2. Uit de proeven met bijniermerghormonen bleek ons niet, dat deze daarvoor verantwoordelijk zijn. De ingespoten hoeveelheden hormoon gaven immers wél hogere bloedsuikergehalten en deze laatste kwamen overeen met die, welke werden gezien, enkel bij het punteren en zonder daarbij te injiciëren. Naar dit criterium gemeten zou de hoeveelheid ingespoten hormoon dus overeen moeten komen met die, welke de bijnieren zouden afgeven bij enkel punteren. Toch steeg het gehalte aan vvz van het bloed door hormoontoediening via een lang te voren ingebrachte catheter weinig of niet; soms werd zelfs een verlaging opgemerkt.

Gezien het feit, dat de gehalten der verschillende vvz alle verhoogd werden – ook de iso-zuren die in het bloed voorkomen toonden hogere gehalten –, moet

het wel haast zó zijn, dat er enkel door de punctie een invloed op de resorbtie uit de pens wordt uitgeoefend. Dit zou kunnen zijn door verschillen in doorbloeding, c.q. doorlaatbaarheid van de penswand. Een invloed op het verdwijnen van de vvz uit het bloed lijkt, gezien de verschillen die er wat dit betreft tussen de onderscheiden zuren bestaan, minder waarschijnlijk.

Hoe dit ook zij, de invloed van 'emoties' blijft voorshands onverklaard. Verder onderzoek hiernaar is zeker gewenst, vooral omdat het zeer wel mogelijk is, dat de merkwaardige stijging van alle vvz in het bloed na ingieten van enkel boterzuur in de pens (fig. 10 en 12) hiermee op één of andere wijze samenhangt (zie paragraaf 4.1.3.2).

#### 4.1.3. *Onderlinge betrekkingen tussen de vetzuren in het bloed en die in het pensvocht*

##### 4.1.3.1. *Zonder toevoeging van zuren aan de pensinhoud*

De vvz in het bloed zijn, zoals al verschillende malen is opgemerkt, voor het grootste deel afkomstig uit de pens. Het ligt derhalve voor de hand de concentraties in pensvocht en bloed met elkaar te vergelijken. Daartoe werden de in paragraaf 4.1.2 en 4.1.1 besproken vvz-gehalten in bloed en pensvocht respectievelijk op de X- en Y-as van grafieken uitgezet, in fig. 42 voor azijnzuur en in fig. 43 voor propionzuur. Voor het boterzuur werden twee figuren gemaakt, omdat de gehalten hiervan in het pensvocht van Ina iets hoger waren dan die bij de ondervoede dieren (paragraaf 2.1.1). In fig. 44 zijn de gegevens van deze laatste opgenomen, in fig. 45 die van Ina.

Uit de figuren blijkt, dat de betrekkingen tussen de gehalten in het bloed en het pensvocht niet rechtlijnig zijn, maar een kromming tonen. Dit wordt vooral veroorzaakt door de lage gehalten, zowel in het bloed als in het pensvocht, van de vastende dieren. Laten wij deze buiten beschouwing, dan blijkt, dat er ondanks tamelijk constante gehalten van de vvz in het pensvocht, niettemin aanzienlijke verschillen in de gehalten dezer zuren in het bloed voorkomen. Daaruit volgt, dat onder niet te sterk van normaal afwijkende omstandigheden de gehalten der vvz in het bloed sterker afhankelijk zijn van andere factoren dan van de concentraties in het pensvocht.

Het feit, dat er, ondanks de tamelijk constante gehalten in het pensvocht, toch aanzienlijke verschillen in de gehalten dezer zuren in het bloed voorkomen, schijnt in strijd met onze opvatting van paragraaf 4.1.2, dat de gehalten der vvz in het bloed voornamelijk bepaald worden door de hoeveelheden, die uit de pens worden geresorbeerd. Anderzijds is het naar onze mening niet goed denkbaar, dat er een vrij nauwe betrekking tussen de gehalten der onderscheiden vluchtige vetzuren zou bestaan, als de hoogte dezer gehalten bepaald zou worden door de verdwijning dezer zuren uit het bloed, die immers op zo verschillende wijze plaats vindt. Wij zullen ons daarom afvragen of verschillen in *snelheid* van resorbtie mogelijk zijn bij eenzelfde concentratie in de pens.

In de eerste plaats kan dan gedacht worden aan een verschil in pensinhoud. Een grotere pensinhoud zal bij een zelfde gehalte meer vvz kunnen leveren dan een kleine.



FIG. 42 Betrekking tussen de azijnzuurgehalten in dezelfde monsters bloed en pensvocht als vermeld bij fig. 39 en 36.

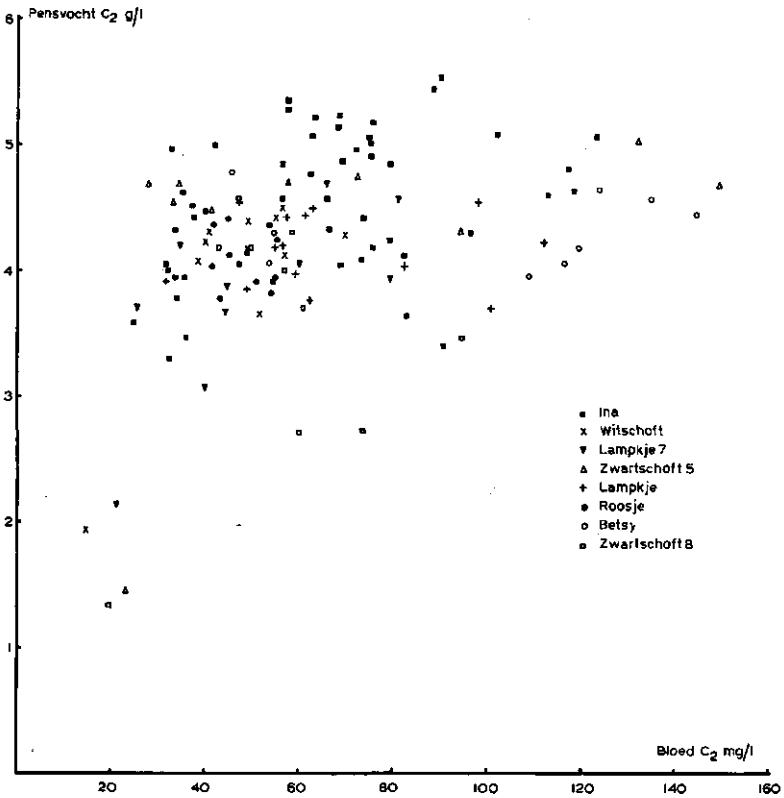


FIG. 42 Relationship between the acetic acid concentrations in blood and rumen fluid samples indicated in the caption to fig. 39 and 36.

Een tweede mogelijkheid is sneller productie van vvz, gepaard gaande met snellere opname. Een versnelde opname zou bijv. kunnen ontstaan door vergroting van de doorbloeding der penswand (BENSADOUN, 1960). Ook verschillen in watertransport (speekselsecretie, water drinken en daarbij aansluitende resorptie) zouden hierbij een rol kunnen spelen.

De hier geopperde mogelijkheden kunnen naar onze mening een verklaring geven voor de volgende waarnemingen. Of, omgekeerd, kunnen de waarnemingen worden opgevat als steun voor de veronderstellingen.

In de eerste plaats willen wij dan wijzen op de hoge gehalten in het bloed van Ina op 8-IV-1964, zes maanden na het kalven (fig. 22), vergeleken met de veel lagere gehalten op 26-IX-1963 nog vóór het kalven (fig. 8). Dit zou een gevolg kunnen zijn van de grotere hoeveelheid voer, die na het kalven werd opgenomen,

FIG. 43 Betrekking tussen de propionzuurgehalten in dezelfde monsters bloed en pensvocht als vermeld bij fig. 39 en 36. Zie voor de betekenis der figuurtjes fig. 42.

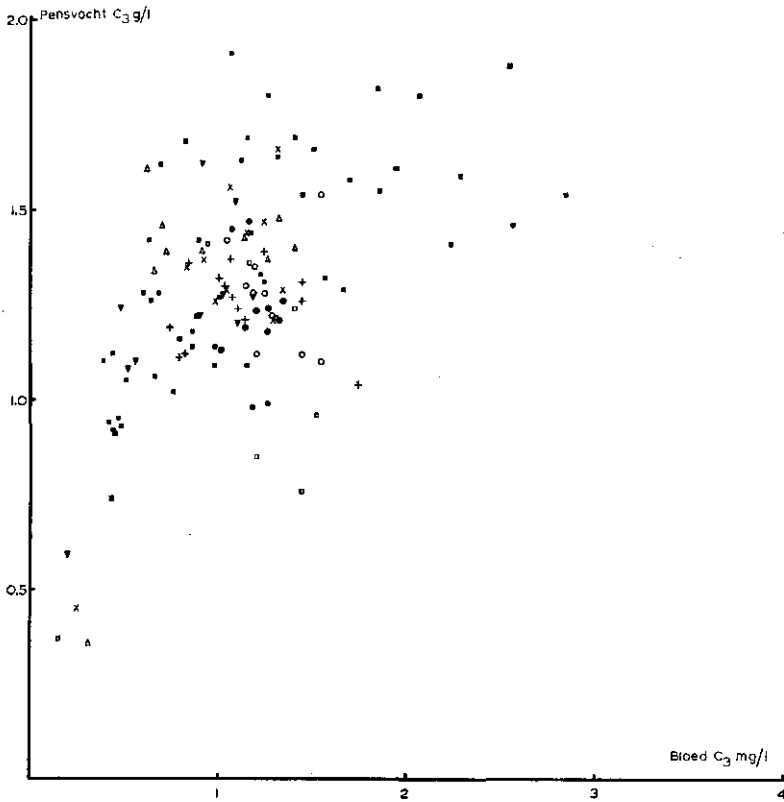


FIG. 43 Relationship between the propionic acid concentrations in the blood and rumen fluid samples indicated in the caption to fig. 39 and 36. See fig. 42 for the symbols used.

wat zal resulteren in een grotere hoeveelheid en waarschijnlijk ook snellere vorming van vvv in de pens. Toch waren de gehalten van deze zuren in het pensvocht op deze data weinig verschillend (fig. 21 en 7).

Een zelfde 'verklaring' kan worden gegeven voor de hogere vvv-gehalten in het bloed van Zwartschoft 5 en Lampkje 7 ná het kalven ten opzichte van deze gehalten vóór het kalven (fig. 26, 27 en 28). Na het kalven werd immers een weliswaar niet geheel voldoende, maar toch aanzienlijk groter rantsoen opgenomen dan voor het kalven. Toch waren ook bij deze dieren de gehalten in het pensvocht vóór en na het kalven niet duidelijk verschillend (fig. 23, 24 en 25).

Mogelijk hangen ook de lagere gehalten in het bloed van kalveren (tabel 10), waarvan wel het bloed, maar niet het pensvocht door ons werd onderzocht, hiermee samen. Volgens MCCARTHY en KESLER (1956) hebben kalveren reeds

FIG. 44 Betrekking tussen de boterzuurgehalten in ongeveer tegelijkertijd verkregen monsters bloed en pensvocht van zeven koeien, die een rantsoen ontvingen, waarvan de zetmeelwaarde ongeveer 10% onder de behoefte lag. Zie voor de betekenis der figuurtjes fig. 42.

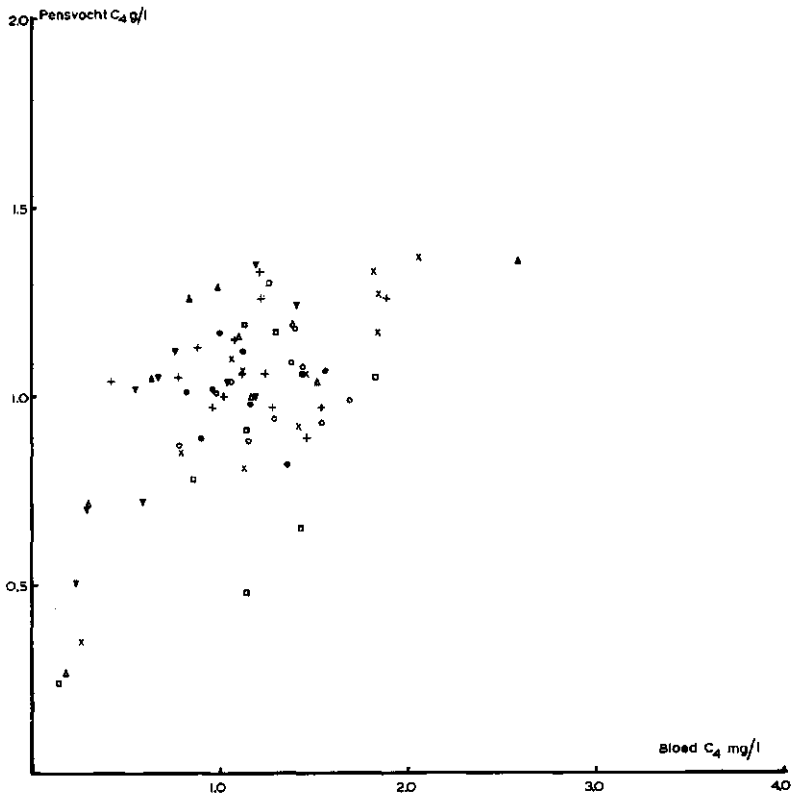


FIG. 44 Relationship between the butyric acid concentrations in blood and rumen fluid samples obtained at corresponding times from seven cows which received a ration with a starch value that was 10% too low. See fig. 42 for the symbols used.

op een leeftijd van 7 weken in hun pensvocht gehalten aan vvz, welke overeenkomen met die bij volwassen runderen. Naar alle waarschijnlijkheid echter, zal de hoeveelheid vvz, die in hun pens gevormd wordt, betrekkelijk gering zijn, omdat een groot deel van het opgenomen voer niet wordt vergist.

Naast deze bevindingen, die gezien kunnen worden als een gevolg van veranderingen in de hoeveelheid geresorbeerd vetzuur zonder concentratieverschillen in het pensvocht, zijn ook de afwijkingen in de onderlinge verhoudingen der vvz in het bloed van enkele der ondervoede koeien van belang, omdat deze waarschijnlijk een aanwijzing zijn, dat er bij stoornissen in het verdwijnen der vvz uit het bloed inderdaad andere verhoudingen tussen de gehalten dezer zuren ontstaan. Het is immers niet goed aan te nemen, dat de relatief hoge gehalten

FIG. 45 Betrekking tussen de boterzuurgehalten in ongeveer tegelijkertijd verkregen monsters bloed en pensvocht van Ina, zonder dat zuren aan de pensinhoud waren toegevoegd.

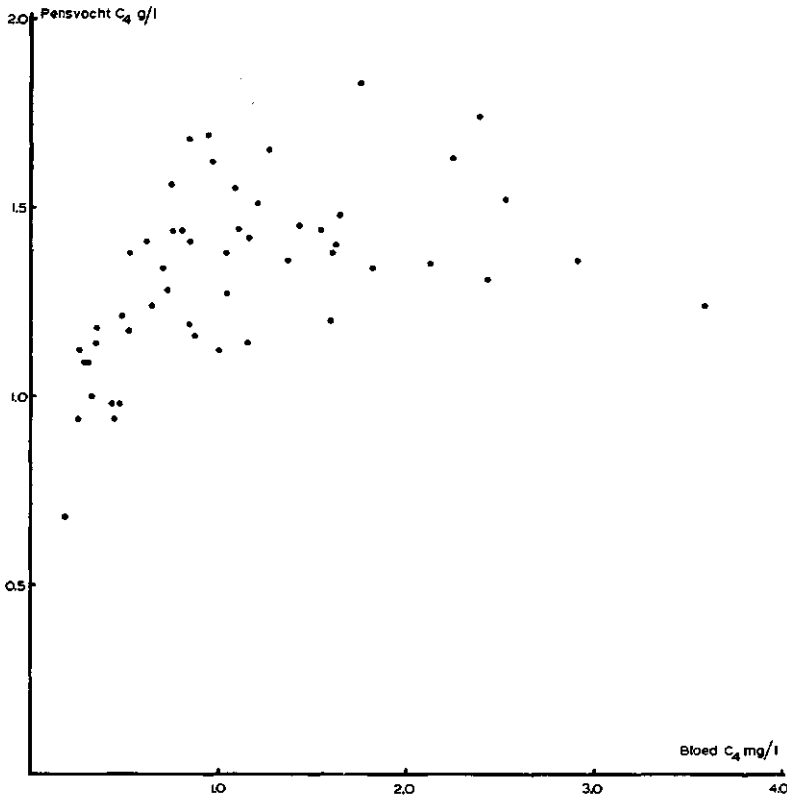


FIG. 45 Relationship between the butyric acid concentrations in blood and rumen fluid samples obtained at corresponding times from Ina, without introduction of acids into the rumen

aan boterzuur en de zeker niet alleen relatief hoge azijnzuurgehalten in het bloed van enkele der ondervoede dieren ontstaan zijn door verhoogde vorming in, of opname uit de pens tengevolge van de onvoldoende hoeveelheid voer. Veeleer moet gedacht worden aan een wijziging in de samenstelling van de vvz in het bloed als secundair gevolg van het voedseltekort, dat een relatief propionzuurtekort doet ontstaan, en aldus een stoornis in de stofwisseling van het dier veroorzaakt.

Tenslotte een enkel woord over de lage gehalten in het bloed van de koeien, die 24 uur geen voedsel hadden gehad (fig. 26, 27 en 28). Deze lage gehalten zullen een gevolg zijn van een geringe opname van vvz uit de pens, waarin de gehalten eveneens verlaagd waren (fig. 23, 24 en 25). Of er bij deze lage gehalten in bloed en in pensvocht wel sprake is van een duidelijke correlatie tussen deze

twee grootheden, kon door het geringe aantal waarnemingen niet zeker worden vastgesteld, maar lijkt zeer wel mogelijk.

#### 4.1.3.2. Met infusie van vetzuren

De toevoegingen van vetzuren aan de pensinhoud hebben ons geleerd, dat verandering van de concentratie van een zuur in de pens zeer snel aanleiding geeft tot verandering van de concentraties van ditzelfde zuur in het bloed, naar aangenomen mag worden door opname van zuur via de penswand. Soms werden daarbij ook de gehalten van de overige vvz in het bloed hoger, wat vooral het geval was na toediening van boterzuur (fig. 10 en 12). Het is verleidelijk een invloed op de doorlaatbaarheid van de penswand hiervoor aansprakelijk te stellen, een invloed, die eventueel ook door 'emotie' zou kunnen worden uitgeoefend.

De toevoegingen van zuren aan de pensinhoud hebben voorts aangetoond, dat onder deze omstandigheden wél een vrij duidelijke samenhang bestaat tussen de gehalten van het toegediende zuur in pensvocht en in bloed. Dit is te zien in fig. 46, waarin 60 waarnemingen van het boterzuurgehalte in het pensvocht (g/l) van Ina zijn uitgezet tegen de boterzuurgehalten in het bloed (mg/l). Hiervoor werden waarnemingen gebruikt, waarbij tengevolge van toevoegingen van boterzuur aan de pensinhoud het boterzuurgehalte in de pens was verhoogd.

Belangwekkend is, dat na een aanvankelijk snelle daling van het door toe-

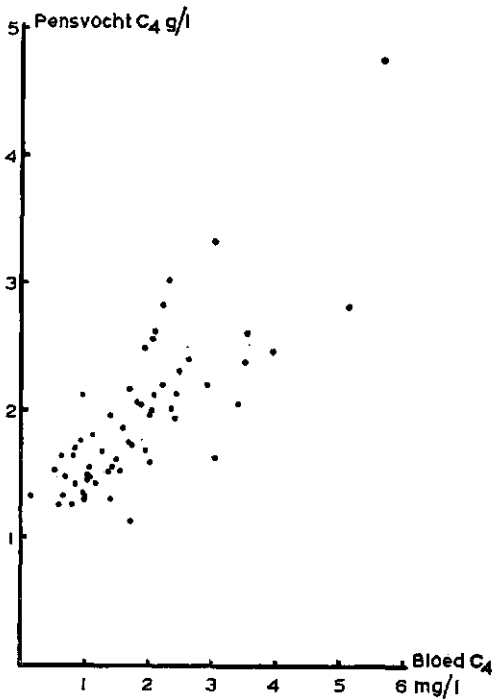


FIG. 46 Betrekking tussen de boterzuurgehalten in ongeveer tegelijkertijd verkregen monsters bloed en pensvocht van Ina, nadat boterzuur aan de pensinhoud was toegevoegd.

FIG. 46 Relationship between the butyric acid concentrations in blood and rumen fluid samples obtained at corresponding times from Ina, after introduction of butyric acid into the rumen.

voeging van zuren verhoogde gehalte soms een vrij lange periode volgde, waarin het betreffende zuur in een ietwat verhoogde concentratie in het pensvocht aanwezig scheen te blijven (zie bijv. fig. 11 en 15). Door de inhomogeniteit van het pensvocht, vooral na toediening van vrij geconcentreerde oplossingen van vvz, dient tegenover deze waarnemingen wel enige reserve in acht te worden genomen. Indien zij juist is, wijst ook deze waarneming er op, dat, behalve de concentratie, ook andere factoren van belang zijn voor de opname der zuren uit de pensinhoud.

#### 4.1.4. Evenwicht tussen vorming en afvoer van vluchtige vetzuren

De vvz-gehalten in het pensvocht zijn de resultanten van vorming, verdunning en verdwijning dezer zuren. De vorming is afhankelijk van de hoeveelheid en de aard van het opgenomen voer. De verdwijning van zuren uit de pens vindt plaats òf door resorbtie direct via de penswand òf door afvloeien met de spijsbrij. Volgens PHILLIPSON (1962) kan bij koeien per 24 uur wel 150–170 liter pensinhoud naar de boeckmaag worden gevoerd. Als de spijsbrij in het duodenum komt, is het grootste deel van de vvz geresorbeerd.

De verdwijning van vvz uit de pens langs deze twee wegen zal, naast de vorming, enerzijds de belangrijkste bepalende factor voor de pensgehalten zijn, anderzijds echter tegelijkertijd de gehalten van het bloed aanzienlijk beïnvloeden, zo niet eveneens voornamelijk bepalen.

Al naarmate de resorbtie van vvz uit de pens sterker of zwakker is, zullen de gehalten van het bloed hoger of lager worden. Wat er door deze verschillen in resorbtie met de concentraties der vetzuren in het pensvocht gebeurt, is echter zonder meer niet te zeggen. Zeker is het niet zo, dat toegenomen resorbtie gepaard gaat met verlaging van het pensvochtgehalte; veeleer gaat verhoging van het pensvochtgehalte gepaard met vermeerderde resorbtie.

Toch menen wij op grond van de wisselende gehalten in het bloed bij betrekkelijk gelijk blijvende gehalten in het pensvocht, dat het gehalte in het pensvocht niet de enige factor is, die de resorbtie regelt. Veeleer lijkt het er op, dat juist de gehalten in het pensvocht 'geregeld' worden, dat wil zeggen op een min of meer constant niveau worden gehouden.

Waardoor dit 'regelmechanisme' gestuurd wordt, is zonder meer niet duidelijk. Het zou kunnen zijn, dat de pH daarbij een rol speelt, omdat bekend is, dat deze factor een grote invloed heeft op de opname van vvz uit de pens (GRAY, 1948), terwijl VAN ADRICHEM (1962) vond, dat de pH van het pensvocht nauw samenhangt met de in totaal per liter aanwezige hoeveelheid vvz.

Voor de in paragraaf 4.1.1 besproken pensvochten der ondervoede koeien (zonder de vier vastende dieren) berekenden wij de volgende gemiddelde gehalten uit 70 waarnemingen; de standaardafwijkingen hebben betrekking op de enkele waarneming:

Azijnzuur	$4,18 \pm 0,44$ g/l,
Propionzuur	$1,29 \pm 0,16$ g/l,
Boterzuur	$1,04 \pm 0,18$ g/l.

Voor Ina na het kalven werd uit 44 waarnemingen berekend:

Azijnzuur	$4,58 \pm 0,60$ g/l,
Propionzuur	$1,39 \pm 0,29$ g/l,
Boterzuur	$1,39 \pm 0,18$ g/l.

De verschillen tussen de gehalten der pensvochten van de ondervoede koeien en Ina zijn significant:

Azijnzuur	$p < 0,001$ ,
Propionzuur	$p < 0,05$ ,
Boterzuur	$p < 0,001$ .

Dat de spreiding in de waarnemingen van de ondervoede koeien over het algemeen kleiner is dan bij Ina, hangt waarschijnlijk samen met het feit, dat de monsters der ondervoede koeien steeds ongeveer ter zelfder tijd, 2 uur na de voeding werden verzameld in een tijdsbestek van enkele weken, die van Ina echter over de gehele dag verdeeld en gedurende een veel langere periode van ongeveer een half jaar. De lagere gehalten in het pensvocht van de ondervoede koeien kunnen veroorzaakt zijn door het tekort aan voer (WILLIAMS en CHRISTIAN, 1956).

Ter vergelijking volgen hierna de gehalten in de monsters bloed, besproken in paragraaf 4.1.2, die ongeveer tegelijkertijd waren verkregen als bovenstaande pensvochten. Voor de ondervoede koeien werden de volgende gemiddelden berekend:

Azijnzuur	$64,3 \pm 29,3$ mg/l,
Propionzuur	$1,11 \pm 0,26$ mg/l,
Boterzuur	$1,19 \pm 0,41$ mg/l.

Voor Ina waren deze gemiddelden:

Azijnzuur	$70,5 \pm 23,6$ mg/l,
Propionzuur	$1,37 \pm 0,71$ mg/l,
Boterzuur	$1,27 \pm 0,71$ mg/l.

De verschillen tussen de gemiddelde gehalten van de ondervoede koeien en van Ina, waren alleen voor het propionzuur significant  $p < 0,01$ , waaruit volgt, dat er niet alleen een relatief propionzuurtekort was in het bloed van enkele der ondervoede dieren (paragraaf 4.1.3.1), maar dat ook het absolute gehalte van dit zuur in het bloed van deze koeien lager was dan dat van Ina. De gehalten in het bloed tonen voorts een grote spreiding, waarvoor in paragraaf 4.1.2 verschillende gronden zijn aangevoerd.

Alles samenvattend, menen wij te mogen zeggen, dat de hoeveelheid vvz, die uit de pens wordt opgenomen, voornamelijk bepaald wordt door de per tijds-eenheid in totaal geproduceerde hoeveelheid vvz, een uitspraak, die ook zonder enig onderzoek gemaakt had kunnen worden, maar die nu nog aangevuld kan worden met: dit behoeft niet gepaard te gaan met duidelijke concentratieverschillen in de pens; integendeel, het heeft er alle schijn van, dat deze juist zo klein mogelijk worden gehouden.

## 4.2. ACETONAEMIE

'Les particularités de la digestion chez les ruminants sont à l'origine de conséquences métaboliques multiples qui leur sont propres et qui résultent essentiellement des modalités de l'absorption des matériaux nutritifs et de l'utilisation des acides gras à courte chaîne.'

H. LE BARS, H. SIMONNET, 1954

De bevinding, dat acetonaemie gepaard gaat met een verhoging van het azijnzuurgehalte van het bloed, sluit aan bij andere waarnemingen.

Zo vonden BROUWER en NIJKAMP (1950) bij een onderzoek naar het voorkomen van vvz in urine, dat urines van koeien met hoge acetongehalten méér azijnzuur bevatten dan normale koeienurines. In 1957 meldden JARRET en POTTER, dat bij schapen met alloxaan-diabetes intraveneus ingespoten azijnzuur langzamer verdwijnt dan bij normale controledieren. Dit laatste werd ook gevonden bij koeien met acetonaemie (BOUCKAERT e.a., 1958).

Daarvóór hadden HORROCKS en PATERSON (1957) reeds meegedeeld, dat enkele door hen onderzochte koeien met acetonaemie hoge vvz-gehalten in haar bloed hadden. Deze onderzoekers bepaalden echter alleen de in totaal aanwezige hoeveelheid vvz. In overeenstemming hiermee vermeldde SHAW, die veel onderzoek omtrent acetonaemie bij koeien heeft verricht, in 1959, dat hij bij een koe met acetonaemie zelfs 600 mg/l azijnzuur in het bloed had gevonden.

Afwijkend van het voorgaande is echter de mededeling van LUICK en SMITH (1963), dat er 'an apparent shortage of acetate as determined by blood acetate levels' bij acetonaemie bestaat (LUICK, unpublished results).

Van belang hierbij is mogelijk, dat bij koeien met acetonaemie niet onder alle omstandigheden hoge azijnzuurgehalten in het bloed worden gevonden (AAFJES, 1964). Waarschijnlijk hangt dit samen met de vorming van azijnzuur in de pens. In verband hiermee is fig. 30 van belang. Hieruit blijkt, dat hoge acetongehalten gepaard gingen met hoge azijnzuurgehalten, behalve op 13-IV-1964 toen Zwartschoft 5 gedurende 24 uur had gevast. Op die dag was het acetongehalte van het bloed 24,6 mg/100 ml; het azijnzuurgehalte was echter slechts 23,2 mg/l, even laag als bij de overige vastende koeien.

REID e.a. (1963) vonden ditzelfde bij drachtige schapen met alloxaan-diabetes. Deze dieren hadden hoge azijnzuurgehalten in hun bloed, zolang ze voldoende voer opnamen. Daalde de eetlust echter, dan nam ook hier het azijnzuurgehalte van het bloed af.

De eenvoudigste verklaring voor deze bevindingen is, dat er een stoornis bestaat in de verwerking van azijnzuur, die tot hoge azijnzuurgehalten in bloed en urine leidt als voldoende azijnzuur uit de pens wordt opgenomen. Daalt de voedselopname en dus ook de vorming van vvz in de pens, dan zal dit tot gevolg hebben, dat ook het gehalte in het bloed lager wordt. Dat wil niet zeggen dat dan de gestelde stoornis in de azijnzuurverwerking niet meer zal bestaan; deze open-



baart zich echter niet langer in een abnormaal hoog azijnzuurgehalte van het bloed.

Wat gebeurt er nu na het kalven?

Zoals in de inleiding naar voren kwam, is de fermentatie in de pens van groot belang voor de voeding der herkauwers. De koolhydraten komen door deze fermentatie voornamelijk als vyz ter beschikking van het metabolisme. Met deze vyz en de overige uit het darmkanaal geresorbeerde bestanddelen, zoals eiwitten en geringe hoeveelheden vet en koolhydraat, moeten melkproductie en lichaamsprocessen worden onderhouden.

Voor de melkproductie is veel koolhydraat nodig, terwijl ook de overige levensprocessen niet geheel zonder verbruik van glucose kunnen verlopen. Daar slechts weinig koolhydraat wordt geresorbeerd, moet in de lever uit de ter beschikking staande substraten zóveel glucose worden gevormd, dat deze behoeften kunnen worden gedekt. Na het kalven stijgt de melkgift snel, waardoor de behoefte aan glucose en de andere grondstoffen voor de melkproductie eveneens snel toeneemt. Aan deze toegenomen behoefte wordt meer of minder tegemoet gekomen door vergroting van de voedergift.

De toegenomen melkproductie enerzijds en de grotere hoeveelheid opgenomen voer tezamen met de lichaamsreserves anderzijds, zullen op elkaar moeten worden afgestemd.

Het is verwonderlijk, dat dit over het algemeen voor onze hoog-producerende koeien onder vaak zeer verschillende praktijkomstandigheden mogelijk blijkt te zijn. Slechts in een betrekkelijk klein aantal gevallen treden stofwisselingsstoornissen op en daarvan is acetonaemie een der belangrijkste. Zoals eerder is meegedeeld, is dit een stofwisselingsstoornis, die niet experimenteel kan worden opgewekt, hoewel vele pogingen daartoe werden ondernomen. Deze pogingen waren er vooral op gericht door vermindering van de hoeveelheid of wijziging van de samenstelling van het voeder voor of na de partus het syndroom te doen ontstaan. Mogelijk echter moet meer aandacht worden geschonken aan de hormonale factoren, die de melkgift mede bepalen.

Over de invloed van hormonen op de lactatie is reeds veel onderzoek verricht, waarbij gebleken is, dat een vrij groot aantal hormonen een rol speelt, omdat voor de melkgift naast de uier ook andere organen van belang zijn (HAMMOND, 1957; SMITH, 1959; KON en COWIE, 1961). Dit wordt bijvoorbeeld ook geïllustreerd door enkele recente publicaties. Zo berichten COWIE e.a. (1964), dat zij in staat waren de lactatie van gehypophysectomeerde geiten geheel te herstellen door toediening van bepaalde hoeveelheden prolactine van schapen, somatotrophine van koeien, een corticosteroid (dexamethasone), trijood-thyronine en insuline. Voorts konden TURNER e.a. (1963) door injecties van oestrogenen en progesteron lactaties bij onbevruichte kalveren opwekken.

Van veel gewicht is in dit verband echter niet alleen de vraag wélke hormonen een rol spelen maar ook, waardoor de hoeveelheden en de verhoudingen waarin deze hormonen worden afgescheiden, bepaald worden.

Omtrent deze, wat men zou kunnen noemen 'metaregulaties', is echter nog maar weinig bekend. Wel is reeds tamelijk veel inzicht verworven in de proces-

sen die de stofwisseling van eencelligen (vooral bacteriën) regelen (COLD SPRING HARBOR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY, 1961, 1963); maar omtrent het belang van deze regelmechanismen voor de gebeurtenissen in hogere organismen kunnen in de meeste gevallen alleen nog maar speculaties worden gemaakt, hoe belangrijk deze overigens ook mogen zijn (UMBARGER, 1964). Toch moet o.i. de stimulerende werking op de melkgift, die azijnzuurtoediening aan lacterende runderen waarschijnlijk heeft (ZELTER, 1952, 1953; ROOK en BALCH, 1961), hiermee samenhangen.

Anderzijds is echter ook bekend, dat azijnzuur wellicht de eetlust vermindert; DOWDEN en JACOBSON (1960) toonden dit aan met intraveneuse toediening van azijnzuur. MONTGOMERY e.a. (1963) zagen hetzelfde als zij azijnzuur intra-ruminaal gaven; merkwaardigerwijze echter had een zelfde hoeveelheid azijnzuur, met NaOH geneutraliseerd tot pH 5, vrijwel geen effect. Voorts berekenden BAUMGARDT e.a. (1964), dat op bepaalde rantsoenen de eetlust waarschijnlijk niet door de vulling van het maagdarkanaal bepaald werd. Zij menen daarom, dat een chemostatische beïnvloeding van de eetlust een rol kan spelen, waarbij zij opmerken dat: 'A significant correlation ( $r = 0,63$ ) was obtained between total feed intake by an individual animal and concentration of acetate in venous blood'.

Deze twee vrij goed onderzochte invloeden van azijnzuur zullen waarschijnlijk langs verschillende wegen tot stand komen. Hun samenspel zal nog door andere factoren, zoals genetische structuur, voedingstoestand van het dier en andere opgenomen nutriënten beïnvloed kunnen worden. Of de invloed op de melkgift dan wel die op de eetlust voorop zal staan, zal mede hierdoor bepaald worden.

Het lijkt niet onmogelijk, dat wanneer bij snelle fermentatie van veel krachtvoer in de pens grote hoeveelheden vvz worden gevormd, die snel worden opgenomen in het bloed, dit de melkgift door middel van het azijnzuur zal kunnen stimuleren. De samenstelling van het voer zal hierbij een belangrijke rol spelen, omdat de verhouding, waarin de vvz in de pens gevormd worden en wellicht ook de gevormde hoeveelheid, hierdoor worden beïnvloed.

Zolang deze aanzetting van de melkgift niet leidt tot een zodanig hoge melkproductie dat een stoornis van de azijnzuurverwerking intreedt, is zij gunstig voor de veehouder. Wordt de melkproductie echter iets 'te groot', dan leidt dit tot een glucosetekort met alle gevolgen van dien, omdat de uier ook bij lage glucosegehalten van het bloed doorgaat met glucose weg te nemen (SHAW, 1943). Belangwekkend is in dit verband, dat EMERY en WILLIAMS (1964) meedelen, dat ketose-koeien in de eerste twee maanden der lactatie 10% méér melk gaven dan vergelijkbare koeien die niet ziek werden.

Bedacht moet worden, dat als azijnzuur inderdaad een rol speelt bij de bepaling van de hoogte der melkgift, er als het ware een sommatie van de azijnzuuropneming moet worden gemaakt, omdat immers bekend is en ook in het eerste deel van dit proefschrift is gebleken, dat de azijnzuuropneming uit de pens niet een gelijkmatig gebeuren is, zulks in tegenstelling tot de melkvorming, die vrijwel continu plaats heeft.

Op een stalrantsoen met zijn piekvormige vyz-producties zal aan deze 'sommatie' hoge eisen worden gesteld, omdat bij een iets te grote melkgift-stimulatie een glucosetekort zal ontstaan. Dit zal kunnen leiden tot ophoping van azijnzuur in het bloed, zodra de verhoogde azijnzuurgehalten tot de volgende voeding blijven bestaan. Dan zal hierdoor de eetlust tenslotte kunnen worden beïnvloed en ontstaat het volledig ontwikkelde ziektebeeld der acetonaemie.

## SAMENVATTING

Vluchtige vetzuren (vvz), die in grote hoeveelheden in de pens van herkauwers door fermentatie van het opgenomen voer ontstaan, vormen, wat de energievoorziening betreft, belangrijke, zo niet de belangrijkste nutriënten voor deze dieren.

Bepalingen van deze zuren in de pensvloeistof zijn eenvoudig, omdat de concentraties hierin aanzienlijk zijn; bepalingen in het bloed, waarin de gehalten veel lager zijn, stuiten echter op moeilijkheden. Deze werden echter overwonnen.

De analyses van het pensvocht, aangezuurd met fosforzuur, werden uitgevoerd met behulp van gaschromatografie zonder verdere voorbereiding (paragraaf 2.2.2). Daarbij werden alleen de gehalten aan azijnzuur, propionzuur en boterzuur bepaald, omdat dit verreweg de belangrijkste vluchtige zuren zijn, die in het pensvocht voorkomen. Op moleculaire basis berekend vormen zij ongeveer 95% van de in totaal aanwezige hoeveelheid vvz; de overige 5% wordt voornamelijk gevormd door iso-boterzuur, iso-valeriaanzuur en valeriaanzuur.

Uit het bloed, dat vrij veel azijnzuur, weinig propionzuur en boterzuur en zeer weinig van de overige zuren bevat, werden de vvz na onteiwitten met meta-fosforzuur, door middel van stoomdestillatie geïsoleerd. Na droogdampen van de natriumzouten en aanzuren met 10% ortho-fosforzuur werd een oplossing verkregen, waarin de azijnzuur-concentratie van dezelfde orde was als die van pensvocht. Hierin werd eveneens met behulp van gaschromatografie het gehalte aan azijnzuur, propionzuur en boterzuur bepaald (paragraaf 2.2.1).

Dit bleek na enige mislukkingen mogelijk door *a*) vervuiling van de injectieplaats te voorkomen met behulp van een speciaal aanvoerpipje naar de kolom, dat regelmatig werd schoongemaakt, en *b*) adsorptie aan de kolom te verminderen door mierenzuur in het draaggas op te nemen (ACKMANN en BURGHER, 1963) (paragraaf 2.2.5).

Met de beschreven methode werd een aantal monsters bloed en pensvocht onderzocht om het verband tussen de gehalten aan vvz van deze twee vloeistoffen te kunnen bestuderen. Bij het verzamelen van deze monsters werd er naar gestreefd, steeds een monster pensvocht van het proefdier te verkrijgen kort na het nemen van een monster bloed. Veel gebruik werd voor dit onderzoek gemaakt van Ina, een koe waarbij enkele jaren tevoren een pensfistel was aangebracht, zodat gemakkelijk pensvocht kon worden verkregen. Bovendien was het mogelijk door deze fistel oplossingen van vvz in de pens te brengen om te zien, welke invloed dit had op de vvz-gehalten van bloed en pensvocht. De monsters bloed werden verkregen met behulp van een catheter in één der venae jugulares, waardoor zonder noemenswaardige hinder voor het dier gedurende een gehele dag bloedmonsters konden worden verzameld. Van de uitkomsten die werden verkregen, zijn figuren gemaakt, die in paragraaf 2.3.1 zijn opgenomen.

Het bleek, dat een vluchtig vetzuur, dat in de pens werd gebracht, zeer snel een toeneming der concentratie van dit zelfde zuur in het bloed ten gevolge had. Deze

concentratie steeg in ongeveer vijf minuten tot een hoogtepunt en daalde daarna vrij snel. Ook het verhoogde gehalte in de pens daalde aanvankelijk snel, maar bereikte meestal toch pas na verloop van langere tijd (enkele uren) zijn oorspronkelijke niveau. Bij toevoeging van boterzuur aan de pensinhoud werd niet alleen stijging van het boterzuurgehalte van het bloed waargenomen, maar ook van de gehalten der overige zuren; vooral het azijnzuur toonde soms een aanzienlijke verhoging.

De uitkomsten verkregen bij deze proeven wezen er echter voorts op, dat de vvz-gehalten in het bloed ook nog door een andere factor dan de concentraties dezer zuren in de pens beïnvloed werd. Wij kregen namelijk de indruk, dat 'emotie', bijvoorbeeld door het inbrengen van de catheter, de gehalten in het bloed verhoogde.

Dit werd nader onderzocht door bij drie dieren een punctienaald in een der venae jugulares te brengen en kort na elkaar enkele monsters bloed te verzamelen. In deze monsters bloed bleken vrij sterk stijgende gehalten aan vvz voor te komen (paragraaf 2.3.2).

Gedacht werd, dat hier mogelijk een invloed van de bijniermerghormonen adrenaline en/of noradrenaline in het spel zou kunnen zijn. Dit kon echter niet worden aangetoond (paragraaf 2.3.3).

Bij kalveren werd voorts een aantal bepalingen in het bloed verricht om te zien of bij deze dieren, waarbij de pensgisting nog niet volledig ontwikkeld is, lagere gehalten voorkomen dan bij volwassen koeien. Dit bleek inderdaad het geval. Pensvochtgehalten werden hierbij niet bepaald (paragraaf 2.3.4).

Het onderzoek naar het voorkomen van vvz in het bloed was vooral ook opgezet om te zien of bij koeien met acetonaemie veranderingen in de gehalten van deze zuren voorkomen. Acetonaemie of slepende melkziekte is een aandoening, vooral van melkkoeien in het begin van de lactatie, die gepaard gaat met hypoglycaemie en het voorkomen van grote hoeveelheden ketonlichamen in bloed en urine. Daarnaast is de ziekte gekenmerkt door klinische verschijnselen, zoals slechte eetlust, verminderde melkgift, vermagering, lethargie (soms echter excitatie) en vaak indigestie, vooral constipatie. De oorzaak ervan is onbekend; vaak wordt onvoldoende of onjuiste voeding, eventueel gepaard gaand met afwijkende pensgisting (vorming van te weinig propionzuur), er voor aansprakelijk gesteld.

Door ondervoeding na het kalven heeft men getracht de ziekte experimenteel op te wekken. Dit is echter maar ten dele gelukt. Weliswaar ontstaan ketonaemie en hypoglycaemie; de typische klinische verschijnselen verkrijgt men echter niet, met name ontstaat géén slechte eetlust.

Bij ons onderzoek van 'n zevental koeien, die na het kalven een rantsoen ontvingen, waarvan de zetmeelwaarde 10% onder de behoefte lag, bleken enkele dieren inderdaad verhoogde gehalten aan ketonlichamen in haar bloed te krijgen (hoofdstuk 3). Dit ging gepaard met een verhoging van het azijnzuurgehalte in het bloed. De gehalten aan ketonlichamen en azijnzuur waren echter niet zo hoog als bij dieren, die aan slepende melkziekte leden (AAFJES, 1964). Verondersteld wordt, dat de verhoogde gehalten aan ketonlichamen en azijnzuur beide

veroorzaakt worden door het waarschijnlijk bestaande glucosetekort mede veroorzaakt door de secretie van lactose met de melk. Dit leidt enerzijds tot een verhoogde afbraak van vet met de vorming van een overmaat ketonlichamen, anderzijds tot een onvoldoende verwerking (in de uier?) van het uit de pens opgenomen azijnzuur.

De uitkomsten van de bepalingen der verkregen monsters bloed en pensvocht werden tenslotte aan een nadere analyse onderworpen in hoofdstuk 4. Tevens werd een aantal gemiddelde gehalten van deze monsters vermeld (paragraaf 4.1.4.). Het pensvocht der ondervoede koeien (70 bepalingen) bevatte de volgende hoeveelheden vetzuur; de standaardafwijkingen hebben betrekking op de enkele waarneming:

Azijnzuur	$4,18 \pm 0,44$ g/l,
Propionzuur	$1,29 \pm 0,16$ g/l,
Boterzuur	$1,04 \pm 0,18$ g/l.

Voor de niet ondervoede koe Ina werd na het kalven uit 44 waarnemingen berekend:

Azijnzuur	$4,58 \pm 0,60$ g/l,
Propionzuur	$1,39 \pm 0,29$ g/l,
Boterzuur	$1,39 \pm 0,18$ g/l.

De significant lagere gehalten in het pensvocht der ondervoede koeien zijn waarschijnlijk een gevolg van het tekort aan voer.

Ter vergelijking werden tevens de gehalten in de monsters bloed vermeld, die ongeveer tegelijkertijd met bovengenoemde monsters pensvocht waren verkregen. Voor de ondervoede koeien werden de volgende gemiddelden berekend:

Azijnzuur	$64,3 \pm 29,3$ mg/l,
Propionzuur	$1,11 \pm 0,26$ mg/l,
Boterzuur	$1,19 \pm 0,41$ mg/l.

Voor Ina waren deze gemiddelden:

Azijnzuur	$70,5 \pm 23,6$ mg/l,
Propionzuur	$1,37 \pm 0,71$ mg/l,
Boterzuur	$1,27 \pm 0,71$ mg/l.

Alleen het propionzuurgehalte van het bloed der ondervoede koeien is significant lager dan dat van Ina. De gehalten in het bloed tonen voorts een grote spreiding waarvoor in paragraaf 4.1.2 verschillende gronden zijn aangevoerd.

De analyse voerde tot de volgende bevindingen: De vvz-gehalten in het bloed worden voornamelijk bepaald door de in de pens gevormde hoeveelheden van deze zuren; de betrekking tussen de gehalten in pensvocht en bloed is niet rechtlijnig, ze tonen een samenhang, die er op schijnt te wijzen, dat onder normale omstandigheden de hoeveelheden zuur, die uit de pens worden opgenomen, zodanig zijn, dat de pensvochtgehalten min of meer op gelijke hoogten worden gehouden, wat overigens niet wil zeggen, dat de hoeveelheid en de samenstelling van het opgenomen voer geen invloed op deze hoogten zouden hebben.

## SUMMARY

Volatile fatty acids (vfa) formed in large quantities through fermentation of the food in the reticulorumen of ruminants are of great importance in the metabolism of these animals.

Determinations of these acids in the rumen fluid are fairly simple to make, but difficult in blood, where the concentrations are much lower. These difficulties could be overcome.

The analyses of rumen fluid preserved with phosphoric acid were performed by gas chromatography without further preliminary treatment (paragraph 2.2.2). Only the contents of acetic, propionic and butyric acid were determined, because these acids form 95% of the total amount of vfa. The other 5% are chiefly formed by iso-butyric, iso-valeric and valeric acid.

The vfa of blood mainly consisting of acetic acid were isolated by steam distillation after deproteinisation with meta-phosphoric acid. After drying the sodium salts of the vfa these were dissolved in 10% ortho phosphoric acid, the concentration of acetic acid obtained being nearly the same as in rumen fluid. In these solutions the concentration of acetic, propionic and butyric acid was also determined by gas chromatography (paragraph 2.2.1). This proved to be possible only when in the first place the deposition of salts was prevented by cleaning, after every two injections, of a specially designed small copper tube in which the samples were evaporated and which supplied the carrier gas to the column, in the second place the carrier gas was saturated with formic acid (ACKMANN and BURGHER, 1963) to diminish adsorption of vfa (paragraph 2.2.5).

With these methods samples of blood and rumen fluid collected as much as possible at the same time were analysed to study the relationship between the vfa concentration of these two fluids. Part of these samples were obtained from Ina a black and white friesian cow fitted two years previously with a rumen fistula. The fistula was also used to introduce solutions of vfa into the rumen to study the effects of such additions on the levels in blood and rumen fluid. Blood samples were obtained with insignificant disturbances to the animal by way of a catheter introduced into a jugular vein in the morning of the experimental day. The results are shown graphically in paragraph 2.3.1.

Acids administered to the rumen rapidly influenced the concentration of this same acid in the blood, a peak was reached in about 5 minutes, after which the content levelled off fairly rapidly. The concentration in the rumen fluid also descended rapidly at first, but sometimes only reached the original level after a few hours. Introduction of butyric acid into the rumen influenced not only the butyric acid level of the blood but also raised in most cases the concentration of the other vfa especially acetic acid.

During these experiments it was observed, however, that besides the vfa of the rumen there must be other influences on the vfa levels of the blood. Sometimes we got the impression that 'emotions' as for instance the introduction of the catheter, were of importance. This was explored with three animals by putting a

hollow needle into a jugular vein and collecting several samples of blood a few minutes apart. In these samples a considerable rise of the vfa content was observed (paragraph 2.3.2).

It was thought that the adrenal hormones epinephrine and or nor-epinephrine could have played a role in the causation of this phenomenon. This could not, however, be proved (paragraph 2.3.3).

Determinations in the blood of calves, in which rumen fermentation is not yet fully developed, showed that these were lower than in adult animals (paragraph 2.3.4).

The investigation of the vfa in blood was especially undertaken to study possible derangements in cows with ketosis. This disease of cows in the first weeks after calving is characterised by hypoglycaemia and high amounts of ketone bodies in blood and urine. Besides these symptoms a lowered appetite and milk production, emaciation, drowsiness (sometimes however excitement) and often indigestion are seen. The cause of the disease is unknown. Insufficient or incorrect feeding eventually accompanied by an aberrant fermentation in the rumen (shortage of propionic acid) are often thought to be of importance.

When experimentally after calving an insufficient amount of food is given some symptoms of the disease are obtained, lack of appetite, however, is not seen.

We examined seven cows in the first weeks of their lactation after calving which received a ration with a 10% too low starch value. Some of these animals developed a somewhat higher amount of ketone bodies in their blood (chapter 3). This was accompanied by a higher acetic acid content. However cows with clinical symptoms of the disease had in most cases much higher blood levels of ketone bodies and acetic acid (AAFJES, 1964). It is thought that these higher levels are both caused by a shortage of glucose, giving on one side a high mobilisation of body fat with the formation of ketone bodies, on the other side an insufficient utilisation (in the udder?) of acetic acid absorbed from the rumen.

A discussion of the collected results and some computed means are given in chapter 4.

The rumen fluids of the underfed cows (70 samples) contained the following amounts of vfa, given with the samples standard deviation:

Acetic acid	4,18 ± 0,44 g/l,
Propionic acid	1,29 ± 0,16 g/l,
Butyric acid	1,04 ± 0,18 g/l.

The rumen fluid of Ina after calving contained (44 determinations):

Acetic acid	4,58 ± 0,60 g/l,
Propionic acid	1,39 ± 0,29 g/l,
Butyric acid	1,39 ± 0,18 g/l.

The significantly lower amounts of vfa in the rumen fluid of the underfed cows are probably caused by the shortage of feed. Compared with these rumen fluid levels, the contents of vfa in the blood show much variation (discussed in 4.1.2). In the blood samples of the underfed cows, collected at times corres-



ponding with those of the above mentioned rumen fluid samples, the following amounts of vfa were found:

Acetic acid      64,3 ± 29,3 mg/l,  
Propionic acid   1,11 ± 0,26 mg/l,  
Butyric acid     1,19 ± 0,41 mg/l.

For Ina was found:

Acetic acid      70,5 ± 23,6 mg/l,  
Propionic acid   1,37 ± 0,71 mg/l,  
Butyric acid     1,27 ± 0,71 mg/l.

The discussion of these results led to the conclusion that the vfa contents of the blood are in the first place influenced by the total amount of these acids produced in the rumen; the concentrations in the rumen fluid show, however, a relation to the concentrations in the blood which seem to indicate that under normal conditions the levels in the rumen are kept more or less constant. This does not mean that the composition of the ration could not influence these levels.

## LITERATUUR

- AAFJES, J. H., 1964. *Life Sci.* 3: 1327.
- ACKMANN, R. G., BURGHER, D., 1963. *Anal. Chem.* 35: 647.
- ADRICHEM, P. W. M. v., 1962. *Dissertatie Utrecht.*
- ANNISON, E. F., 1954. *Bioch. J.* 58: 670.
- ANNISON, E. F., HILL, K. J., LEWIS, D., 1957. *Bioch. J.* 66: 592.
- ANNISON, E. F., LINDSAY, D. B., 1961. *Bioch. J.* 78: 777.
- ANNISON, E. F., WHITE, R. R., 1962. *Bioch. J.* 84: 546.
- BARS, H. LE, SIMONNET, H., 1954. *Rec. Méd. Vét.* 130: 689, 777. 131: 17.
- BAUMGARDT, B. R., MONTGOMERY, M. J., SIMKINS, K. L., SUTTIE, J. W., 1964. *J. Dairy Sci.* 47: 685.
- BENSADOUN, A., 1960. *Thesis Cornell University.*
- BERGMAN, E. N., SELLERS, A. F., 1960. *Am. J. Physiol.* 198: 1083, 1087.
- BLAXTER, K. L., *The Energy Metabolism of Ruminants.* Hutchinson, Londen 1962.
- BOUCKAERT, J. H., OYAERT, W., SEGERS, J., 1958. *Zentralbl. Vet. Med.* 5: 101.
- BROUWER, E., NIJKAMP, H. J., 1950. *Acta Physiol. Pharmacol. Neerl.* 1: 44.
- BROWN, R. E., SHAW, J. C., 1957. *J. Dairy Sci.* 40: 667.
- CIARANFI, E., FONNESU, F., 1952. *Bioch. J.* 50: 698.
- COWIE, A. T., KNAGGS, G. S., TINDALL, J. S., 1964. *J. Endocrin.* 28: 267.
- CRAINE, E. M., HANSEN, R. G., 1952. *J. Dairy Sci.* 35: 631.
- DOWDEN, D. R., JACOBSON, D. R., 1960. *Nature* 188: 148.
- DUKES, H. H., *The Physiology of Domestic Animals*, 7e druk. Comstock Publishing Associates, Ithaca, New York 1955. p. 541.
- EL-SHAZLY, K., 1952. *Bioch. J.* 51: 640, 647.
- EMERY, E. M., KOERNER, W. E., 1961. *Anal. Chem.* 33: 146.
- EMERY, R. S., WILLIAMS, J. A., 1964. *J. Dairy Sci.* 47: 879.
- ESSIG, H. W., NORTON, H. W., JOHNSON, B. C., 1961. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 108: 194.
- FRITZ, I. B., 1961. *Phys. Rev.* 41: 52.
- GOODWIN, B. C., *Temporal Organisation in Cells.* Academic Press, London and New York 1963.
- GRAY, F. V., 1948. *J. Exp. Biol.* 25: 135.
- HAMMOND, J., *Progress in the Physiology of Farm Animals.* Butterworths Scientific Publications, London 1957. Vol. III, p. 932-942.
- HANSEN, O., 1960. *Scand. J. Clin. Lab. Inv.* 12: 18.
- HENDRIKS, H. J., 1963. *Tijdschr. Diergeneesk.* 88: 1572.
- HOLTER, J. B., LAKSHMANAN, S., 1959. *J. Dairy Sci.* 42: 358.
- HORROCKS, D., PATERSON, J. Y. F., 1957. *J. Comp. Pathol.* 67: 331.
- JACKSON, H. D., TAYLOR, J. A., HATCHER, B. W., CARTER, J. M., 1964. *Arch. Bioch. Bioph.* 105: 575.
- JAMES, A. T., MARTIN, A. J. P., 1952. *Bioch. J.* 50: 679.
- JARRET, J. G., POTTER, B. J., 1957. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 35: 103.
- JONGE, H. DE, *Inleiding tot de Medische Statistiek. Verhandeling van het Nederlands Instituut voor Praeventieve Geneeskunde XLVIII, Leiden 1960. Deel II, p. 401.*
- KELLNER, O., BECKER, M., *Grundzüge der Fütterungslehre*, 12e druk. Paul Parey, Hamburg und Berlin 1959.
- KINGREY, B. W., LADWIG, V. D., MONLUX, W. S., RAMSEY, F. K., 1957. *N. Amer. Vet.* 38: 321.
- KLINGMÜLLER, V., ERDMANN-MÜLLER, G. J., RAUSCH-STROOMANN, J. G., BRUNE, G., 1955. *Arzneimittel Forsch.* 5: 105.
- KON, S. K., COWIE, A. T., *Milk: The Mammary gland and Its Secretion.* Academic Press, New York and London 1961. Vol. I, p. 163-198.
- KUDRYAVTSEV, A. A., 1959. XVI Congreso Mundial de Veterinaria. Madrid 21-27 Mayo. p. 133.
- LEE, S. D., WILLIAMS, W. F., 1962. *J. Dairy Sci.* 45: 517, 893.

- LEWIS, O., HILL, K. J., ANNISON, E. F., 1957. *Bioch. J.* **66**: 587.
- LUICK, J. R., SMITH, L. M., 1963. *J. Dairy Sci.* **46**: 1251.
- MAYES, P. A., ROBSON, W. 1957. *Bioch. J.* **67**: 11.
- MCCARTHY, R. D., KESLER, E. M., 1956. *J. Dairy Sci.* **39**: 1280.
- MCCLENDON, J. F., 1944. *J. Biol. Chem.* **154**: 357.
- MCCLYMONT, G. L., 1951. *Austr. J. Agric. Res.* **2**: 92, 158.
- MONTGOMERY, M. J., SCHULTZ, L. H., BAUMGARDT, B. R., 1963. *J. Dairy Sci.* **46**: 1380.
- MULDER, H., HAVE, A. J. v. d., SCHIPPER, C. J., De samenstelling van Nederlandse melk. Laboratorium voor Zuivelbereiding en Melkkunde van de Landbouwhogeschool te Wageningen 1959.
- NUTRITION REVIEWS, 1964. The role of carbohydrate in the diet. **22**: 102.
- PEARCE, P. J., 1960. *Vet. Rev. Ann.* **6**: 53.
- PENNINGTON, R. J., 1952. *Bioch. J.* **51**: 251.
- PHILLIPSON, A. T., 1962. *J. Roy. Agr. Soc. Eng.* **123**: 91.
- REID, R. L., 1950. *Austr. J. Agric. Res.* **1**: 338.
- REID, R. L., 1953. *Austr. J. Agric. Res.* **4**: 213.
- REID, R. L., 1960a. *Austr. J. Agric. Res.* **11**: 42, 364, 530.
- REID, R. L., 1960b. *The Analyst.* **85**: 265.
- REID, R. L., HINKS, W. T., MILLS, S. C., 1963. *J. Endocrin.* **27**: 1.
- ROOK, J. A. F., BALCH, C. C., 1961. *Brit. J. Nutr.* **15**: 361.
- SABINE, J. R., CONNOR JOHNSON, B., 1960. *J. Dairy Sci.* **43**: 885.
- SCOW, R. O., CHERNICK, S. S., 1960. *Rec. Progr. Horm. Res.* **16**: 491.
- SEEKLES, L., 1960. *Tijdschr. Diergeneesk.* **85**: 1478.
- SHAW, J. C., 1943. *J. Dairy Sci.* **26**: 1089.
- SHAW, J. C., 1956. *J. Dairy Sci.* **39**: 402.
- SHAW, J. C., 1959. Oklahoma Conference on Radioisotopes in Agriculture. U.S.At. E. Comm. p. 213.
- SHIBATA, F., UMETSU, M., 1957. *Tohoku J. Agric. Res.* **8**: 161.
- SINCLAIR, H., 1960. *Perspect. Biol. Med.* **4**: 72.
- SJOLLEMA, B., ZANDE, J. E. v. d., 1923. *J. Met. Res.* **4**: 525.
- SMITH, V. R., *Physiology of Lactation*, 5e druk. Constable and Company Ltd. London 1959. p. 83-95.
- SNEDECOR, G. W., *Statistical Methods*, 5e druk. The Iowa State University Press, Ames, Iowa U.S.A. 1962. p. 46.
- SOSKIN, S., LEVINE, R., *Carbohydrate Metabolism* 3e druk. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois 1947. p. 112.
- SUTHERLAND, T. M., In *Progress in Nutrition and Allied Sciences*. Ed. D. P. Cuthbertson. Oliver and Boyd, Edinburgh and London 1963. p. 168.
- TURNER, C. W., WILLIAMS, R., HINDERY, G. A., 1963. *J. Dairy Sci.* **46**: 1390.
- UMBARGER, H. E., 1964. *Science* **145**: 674.
- VEEVOEDERTABEL 1957. Gegevens over voederwaarde, verteerbaarheid en samenstelling van veevoerders bijeengebracht en berekend door de Rijkslandbouwproefstations te Maastricht en Hoorn. Uitgave: Centraal Veevoederbureau in Nederland.
- VERSLAG over de landbouw in Nederland over 1962. Ministerie van Landbouw en Visserij. 's-Gravenhage 1964, p. 130.
- VOEDERNORMEN voor de landbouwhuisdieren en voederwaarden der veevoerders. Verkorte tabel bewerkt aan het Instituut voor Veevoedingsonderzoek 'Hoorn'. 23e druk, 1964. Uitgave: Centraal Veevoederbureau in Nederland.
- WARNER, H. C. I., 1964. *Nutr. Abstr. Rev.* **34**: 339.
- WILLIAMS, V. J., CHRISTIAN, K. R., 1956. *N. Z. J. Sci. Technol.* **38**: 403.
- WOLIN, M. J., 1960. *J. Dairy Sci.* **43**: 1452.
- ZELTER, M., 1952. *C. R. Acad. Sci.* **234**: 567.
- ZELTER, M., 1953. *Ann. Zootechn.* **2**: 105, 197, 303.
- ZUIVELJAARBOEK 1963-'64. Zestiende uitgave. Redactie P. Krediet en G. J. ten Arve. Uitg. Spruyt en Co N.V. Zutphen. p. 265.