

PROPHYLAXIE ET THÉRAPEUTIQUE DE L'HYPOCALCÉMIE VITULAIRE PAR LES ISOMÈRES OU LES MÉTABOLITES DE LA VITAMINE D

I. — LE 5,6 TRANS-25-HYDROXYCHOLÉCALCIFÉROL

J. P. BARLET

Station de Physiopathologie de la Nutrition,
Centre de Recherches de Clermont-Ferrand, I. N. R. A.,
Theix, Saint Genès Champagnelle, 63110 Beaumont

RÉSUMÉ

Le 5,6 *trans*-25-hydroxycholécalférol (5,6 *trans*-25-OH-D₃) est un isomère de la vitamine D₃ qui stimule intensément l'absorption calcique intestinale chez le rat néphrectomisé (HOLICK, GARABEDIAN et De LUCA, 1972 a, 1972 b). Nous avons étudié l'influence de ce composé, administré par voie intraveineuse au moment de la parturition, sur l'hypocalcémie et l'hypo-phosphatémie observées chez la vache parturiente.

Chez 4 vaches *Jersiaises* en 1^{re} ou 2^e lactation, et chez 4 vaches *Holstein* ou *Frisonnes*, l'injection de 5 mg de 5,6 *trans*-25-OH-D₃ au moment de la parturition induit une élévation hautement significative de la calcémie et de la phosphatémie dès la 6^e heure suivant l'injection (fig. 2 et 3). Il en est de même chez 16 vaches *Holstein* ou *Frisonnes*, en 3^e lactation et au-delà ayant reçu 10 mg de 5,6 *trans*-25-OH-D₃ (fig. 4). En outre, chez ces 16 animaux traités le nombre de cas cliniques d'hypocalcémie vitulaires (2/16) est très significativement inférieur à celui observé chez les témoins (9/11).

L'administration intraveineuse de 20 mg de 5,6 *trans*-25-OH-D₃ dans les 30 mn suivant la perfusion calcique chez 2 vaches atteintes d'hypocalcémie vitulaire a évité toute récurrence, et la calcémie de ces animaux s'est maintenue à un niveau normal.

Chez les Bovins, la parturition est associée à une hypocalcémie et à une hypo-phosphatémie plus ou moins accentuées (MOODIE, MARR et ROBERTSON, 1955 ; BARLET, 1969). La diminution de la calcémie et de la phosphatémie varie selon les animaux et le nombre de lactations (MARR, MOODIE et ROBERTSON, 1955 ; BARLET, 1969). Dans la plupart des cas, les symptômes cliniques de l'hypocalcémie vitulaire (hypoesthésie, hypothermie, parésie) apparaissent seulement chez les animaux dont la calcémie est inférieure à 6 mg/100 ml (MAYER, RAMBERG et KRONFELD, 1966).

L'administration orale de doses massives de vitamine D₃ (30 millions d'unités/ j /animal) pendant 3 à 8 jours avant la date prévue de mise bas (HIBBS et POUNDEN, 1955) ou une injection parentérale de 20 millions d'unités de vitamine D₃ effectuée entre le 10^e et le 2^e jour précédant la mise bas (SEEKLES *et al.*, 1958) peuvent fournir une méthode prophylactique relativement efficace (DOBSON et WARD, 1974). L'efficacité de celle-ci dépend essentiellement du délai entre le moment où est administrée la vitamine D₃ et la mise bas. Or il est toujours difficile de prévoir exactement la date de vêlage, surtout chez les animaux âgés. De plus, une administration prolongée de doses massives de vitamine D chez la Vache, si elle accroît l'absorption calcique et phosphatée au niveau de l'intestin (MANSTON, 1964 ; MANSTON et PAYNE, 1964), présente de très graves dangers pour l'animal par les risques de calcification qu'elle entraîne au niveau de l'aorte et du rein (MANSTON et PAYNE, 1964 ; PAYNE et MANSTON, 1967). Aussi la vitamine D est-elle peu employée en prophylaxie de l'hypocalcémie vitulaire (KRONFELD, 1971 ; DOBSON et WARD, 1974). On sait maintenant que pour agir au niveau de l'intestin et de l'os, la vitamine D₃ doit subir deux hydroxylations successives. La première, en position 25, a lieu dans le foie et donne naissance au 25-hydroxycholécalférol (25-OH-D₃) (De LUCA, 1969). La seconde, en position 1, se produit dans le rein et aboutit à la formation du 1,25-dihydroxycholécalférol (1,25-(OH)₂-D₃) (FRASER et KODICEK, 1970 ; GRAY, BOYLE et De LUCA, 1971 ; NORMAN, 1971). Le 1,25-(OH)₂-D₃ ainsi formé est actuellement considéré comme une véritable hormone stéroïde dont la synthèse est régulée par un « feed-back » complexe faisant intervenir la calcémie, la phosphatémie, la parathormone et la calcitonine (De LUCA, 1973 ; HOLICK et De LUCA, 1974). Malheureusement la synthèse chimique du 1,25-(OH)₂-D₃ est très difficile à réaliser et très coûteuse (De LUCA, 1974).

Cependant l'isomère 5,6 *trans* du 25-OH-D₃ (5,6 *trans*-25-OH-D₃), dont le cycle A a subi une rotation de 180°, possède un radical hydroxyl en position 3, c'est-à-dire occupant le même emplacement géométrique que le radical hydroxyl en position 1 dans le 1,25-(OH)₂-D₃ (HOLICK, GARABEDIAN et De LUCA, 1972 *a*) (fig. 1). Cet isomère, facile à synthétiser, est peu actif sur la résorption osseuse mais stimule l'absorption calcique intestinale de façon analogue au 1,25-(OH)₂-D₃ chez le rat néphrectomisé (HOLICK, GARABEDIAN et De LUCA, 1972 *b* ; De LUCA et KLEINER-BOSSALER, 1973). Chez l'Homme, la demi-vie biologique du 5,6 *trans*-25-OH-D₃ tritié est de 115 h (OFFERMANN *et al.*, 1975).

Dans l'expérimentation rapportée ici, nous avons étudié l'influence du 5,6 *trans*-25-OH-D₃ sur l'hypocalcémie et l'hypophosphatémie de la vache parturiente. Nous avons également essayé de prévenir le syndrome vitulaire en administrant cet isomère au moment même de la parturition.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'expérimentation a été réalisée sur deux troupeaux différents, l'un constitué par des *Jersiaises* en 1^e ou 2^e lactation, d'un poids moyen de 280 kg, l'autre par des *Frisonnes* et des *Holstein*, de la 2^e à la 7^e lactation, d'un poids moyen de 650 kg. La répartition des animaux est indiquée dans le tableau 1.

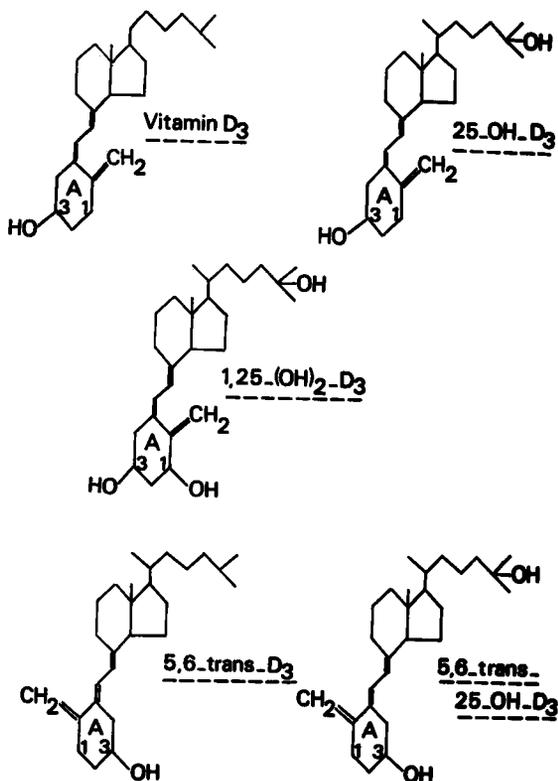


FIG. 1. — Structure du 5,6 trans-25-hydroxycholecalciférol (5,6 trans-25-OH-D₃) et de quelques métabolites et isomères de la vitamine D₃

TABLEAU I

Répartition des animaux et composition minérale de la ration

Animaux				Composition minérale de la ration (g/kg MS)		
Race	N° de lactation	Traités	Témoins	Ca	P	Mg
<i>Jersiaise</i>	1	2	2	10,2	6,8	1,9
	2	2	2			
<i>Holstein</i> ou <i>Frisonne</i>	2	4	3	9,4	4,7	1,4
	3 à 7	16	11			

Les animaux *Jersiais* recevaient un foin de graminées de bonne qualité *ad libitum* et un concentré à base de céréales. Les animaux *Holstein* et *Frisons* recevaient de l'ensilage de maïs et un concentré à base de luzerne déshydratée et de tourteau. La composition minérale des rations (composé minéral inclus) est indiquée dans le tableau 1.

Dans les 10 minutes suivant la naissance du Veau, chaque vache traitée recevait une injection de 5,6 *trans*-25-OH-D₃ (RU 21016, laboratoires Roussel) (5 mg/animal en 1^{re} ou 2^e lactation, 10 mg/animal en 3^e lactation ou au-delà) dissout dans 5 ml de propylène-glycol. Les témoins recevaient, de la même façon, le même volume de solvant. Au sein d'un même lot d'animaux de même âge, traités et témoins étaient choisis au hasard, selon l'échelonnement des mises bas, celle d'un animal témoin s'intercalant toujours entre celles de deux animaux traités.

Chez deux vaches *Frisonnes* en 4^e et 5^e lactation atteintes d'hypocalcémie vitulaire dans les 24 h suivant la mise bas, et traitées par perfusion intraveineuse d'une solution de 500 ml de gluconate de calcium (10 g de Ca/animal), nous avons pratiqué une injection intraveineuse de 20 mg de 5,6 *trans*-25-OH-D₃, trente minutes après la fin de la perfusion calcique, et suivi les variations de la calcémie de ces animaux, en les comparant à celles observées chez deux vaches de même âge, atteintes elles aussi d'hypocalcémie vitulaire et traitées avec une perfusion calcique analogue.

Chez tous les animaux, les prélèvements de sang étaient effectués à intervalles réguliers, grâce à un cathéter implanté dans la jugulaire droite et mis en place dès que les premiers symptômes de la mise bas apparaissaient. Après centrifugation du sang, le calcium et le magnésium plasmatiques étaient dosés par spectrophotométrie d'absorption atomique. Le phosphore minéral plasmatique était mesuré par colorimétrie.

RÉSULTATS

Chez tous les animaux, quels que soient la race et le numéro de lactation, on observe une hypocalcémie et une hypophosphatémie *post-partum* (fig. 2, 3, 4). Cette hypocalcémie et cette hypophosphatémie sont plus accentuées chez les animaux *Frisons* et *Holstein* en 3^e lactation et au-delà (fig. 4) que chez les animaux de même race en 2^e lactation (fig. 3).

La calcémie et la phosphatémie des animaux en 1^{re} ou 2^e lactation ayant reçu une injection intraveineuse de 5 mg de 5,6 *trans*-25-OH-D₃ sont significativement supérieures ($P < 0,01$) à celles des témoins dès la 6^e heure après l'injection. Cette différence significative persiste pendant 48 h (fig. 2 et 3).

Parmi les animaux en 3^e lactation et au-delà, 9 des 11 témoins et 2 des 16 traités ont présenté les symptômes cliniques (tremblements musculaires, hypoesthésie, parésie) et biochimiques (calcémie inférieure à 7 mg/100 ml, phosphatémie inférieure à 3 mg/100 ml) du syndrome vitulaire. Parmi les animaux témoins atteints, 5 animaux ont récidivé 2 fois, un animal a récidivé 3 fois et 4 animaux n'ont pas récidivé. Les deux animaux traités au 5,6 *trans*-25-OH-D₃ et atteints d'hypocalcémie n'ont pas récidivé. La différence entre le nombre de cas d'hypocalcémie observés chez les traités (2/16) et chez les témoins (9/11) est hautement significative ($\chi^2 = 12,85$, $P < 0,001$). La calcémie et la phosphatémie des 16 animaux qui ont reçu 10 mg de 5,6 *trans*-25-OH-D₃ sont significativement supérieures ($P < 0,01$) à celles des témoins dès la 6^e heure après l'injection. Cette différence significative persiste pendant 48 h (fig. 4).

Chez les 2 animaux atteints d'hypocalcémie vitulaire et ayant reçu 20 mg de 5,6 *trans*-25-OH-D₃ 30 minutes après la fin de la perfusion calcique, nous n'avons observé aucune récurrence du syndrome vitulaire. Par contre les 2 témoins de même âge, traités avec la seule perfusion calcique ont récidivé chacun une fois. De plus,

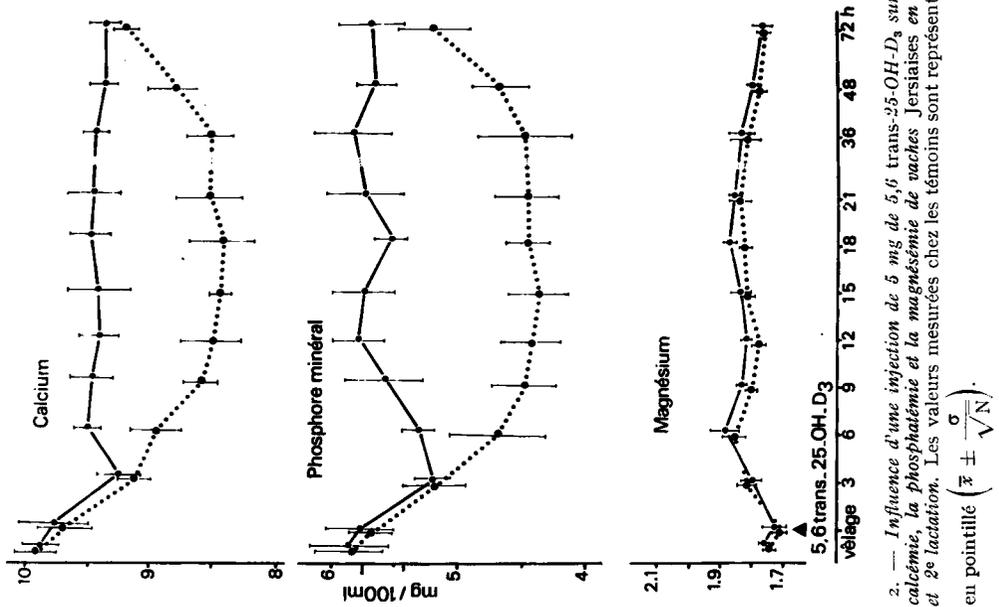


Fig. 2. — Influence d'une injection de 5 mg de 5,6 trans-25-OH-D₃ sur la calcémie, la phosphatémie et la magnésémie de vaches Jerseyaises en 1^{re} et 2^e lactation. Les valeurs mesurées chez les témoins sont représentées en pointillé ($\bar{x} \pm \frac{\sigma}{\sqrt{N}}$).

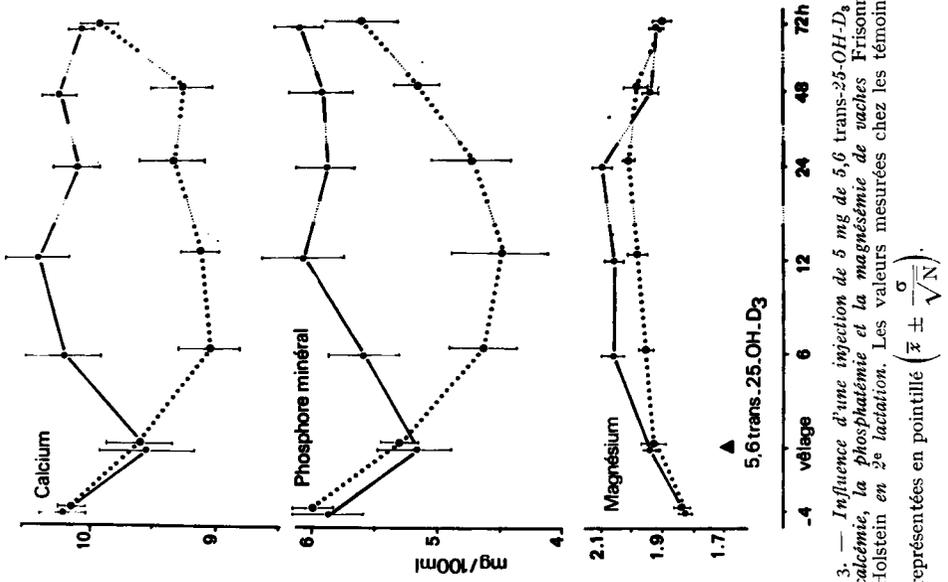


Fig. 3. — Influence d'une injection de 5 mg de 5,6 trans-25-OH-D₃ sur la calcémie, la phosphatémie et la magnésémie de vaches Frisonnes ou Holstein en 2^e lactation. Les valeurs mesurées chez les témoins sont représentées en pointillé ($\bar{x} \pm \frac{\sigma}{\sqrt{N}}$).

72 h après l'injection, la calcémie des traités est supérieure à 9 mg/100 ml alors que celle des témoins est inférieure à 8 mg/100 ml.

Nous n'avons observé aucun symptôme d'hypervitaminose D (diminution des quantités consommées, polyurie, fèces déshydratées) chez les animaux recevant 5,10 ou 20 mg de 5,6 trans-25-OH-D₃.

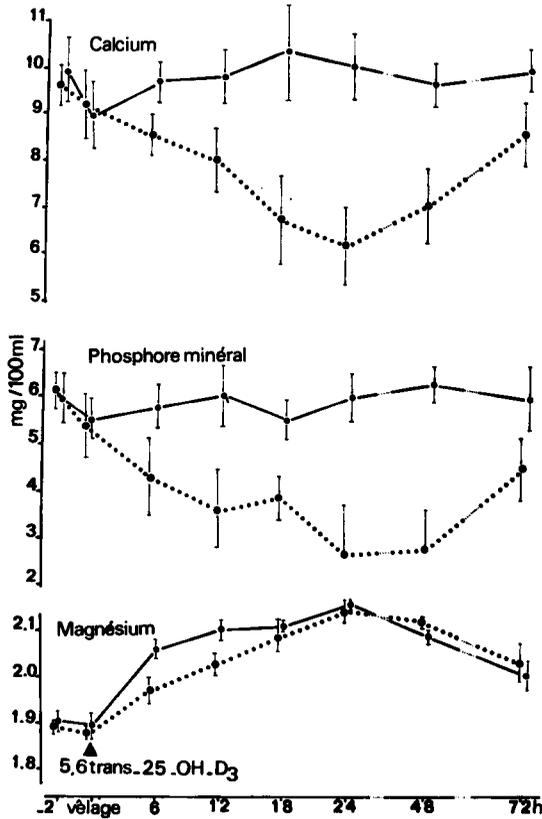


FIG. 4. — Influence d'une injection de 10 mg de 5,6 trans-25-OH-D₃ sur la calcémie, la phosphatémie et la magnésémie des vaches en 3^e lactation et au-delà. Les valeurs mesurées chez les témoins sont représentées en pointillé ($\bar{x} \pm \frac{\sigma}{\sqrt{N}}$).

DISCUSSION

Chez tous les animaux utilisés, la parturition est associée à une hypocalcémie et à une hypophosphatémie dont l'intensité s'accroît entre le 1^{er} et le 3^e vêlage (fig. 2, 3, 4). Le syndrome vitulaire semble donc résulter de l'exacerbation des variations physiologiques de la calcémie et de la phosphatémie survenant au moment de la parturition. Le nombre élevé de cas d'hypocalcémie vitulaire observés chez les animaux en 3^e lactation (ou au-delà) semble résulter de plusieurs facteurs. D'une

part il s'agit d'animaux à très haut potentiel laitier, atteignant leur production maximale (3^e lactation). Or, la fréquence du syndrome vitulaire semble liée au niveau de production laitière (HIBBS, 1950 ; LARVOR, BROCHART et THERET, 1961). D'autre part, ces animaux à très forte production reçoivent une alimentation à base d'ensilage de maïs. Celui-ci, même supplémenté convenablement en minéraux, semble favoriser l'apparition du syndrome vitulaire (KENDALL *et al.*, 1970). La forte proportion de récidives dans les heures suivant la perfusion calcique est en accord avec les observations faites en France (LARVOR, BROCHART et THERET, 1961) ou à l'étranger (KRONFELD, 1971).

Chez tous les animaux, l'injection de 5,6 *trans*-25-OH-D₃ induit une remontée rapide de la calcémie et de la phosphatémie (fig. 2, 3, 4). Celle-ci est probablement due à une stimulation de l'absorption intestinale de ces éléments : chez le rat néphrectomisé le 5,6 *trans*-25-OH-D₃ stimule intensément l'absorption calcique intestinale (HOLICK, GARABEDIAN et De LUCA, 1972 *a* ; De LUCA et KLEINER-BOSSALER, 1973). Ceci semble indiquer que, chez la Vache, comme chez le Rat (HOLICK, GARABEDIAN et De LUCA, 1972 *a*) la présence d'un radical hydroxyl en position 1 sur le cycle A est primordiale dans la stimulation de l'absorption calcique intestinale. De plus, la rapidité d'action de l'isomère (6 h) tend à prouver que celui-ci agit directement chez la Vache, sans avoir à être métabolisé en un composé plus actif. La persistance de son effet hypercalcémiant et hyperphosphatémiant (48 h) est un atout précieux pour la prophylaxie et la thérapeutique du syndrome vitulaire.

Conséquences pratiques

Prophylaxie du syndrome vitulaire.

L'utilisation du 25-OH-D₃ pour la prophylaxie du syndrome vitulaire présente les mêmes inconvénients que celle de la vitamine D₃ en ce qui concerne la prévision de la date de mise bas. En effet, il diminue d'environ 20 p. 100 la fréquence des cas d'hypocalcémie vitulaire s'il est injecté (8 mg/animal) entre le 10^e et le 3^e jour avant la mise bas (OLSON *et al.*, 1973 *b*). Par contre, le 5,6 *trans*-25-OH-D₃ ne nécessite aucune prévision de ce genre puisque, dans notre essai, injecté par voie intraveineuse au moment même de la parturition (10 mg/animal) il diminuait de façon très hautement significative le nombre de cas d'hypocalcémie observés. Il paraît donc souhaitable de recommander l'administration systématique intraveineuse de 5,6 *trans*-25-OH-D₃ au moment du vêlage aux animaux susceptibles d'être atteints d'hypocalcémie vitulaire (animaux ayant présenté le syndrome au vêlage précédent, animaux à forte production laitière en 3^e lactation ou au-delà).

Thérapeutique du syndrome vitulaire.

Le 25-OH-D₃ est inefficace dans le traitement du syndrome vitulaire, et il ne diminue pas la fréquence des récidives lorsqu'il est administré après la perfusion calcique (OLSON *et al.*, 1973 *a*). Par contre chez les deux animaux qui ont reçu 20 mg de 5,6 *trans*-25-OH-D₃ 30 minutes après la perfusion calcique, nous n'avons observé aucune récidive, et la calcémie de ces animaux est tout à fait normale 48 h plus tard (fig. 5). On peut donc recommander d'administrer 20 mg de cet isomère, par voie intraveineuse, après la perfusion calcique, afin de diminuer les récidives chez les animaux hypocalcémiques.

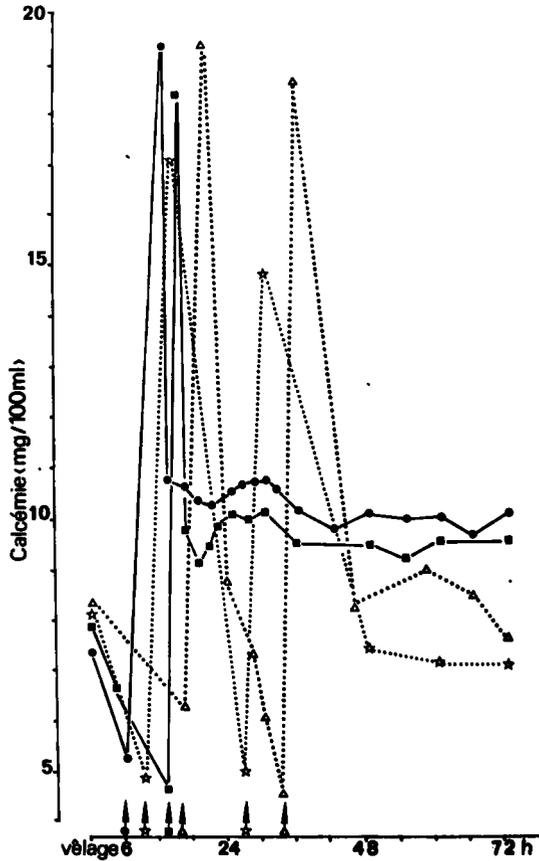


FIG. 5. — Influence d'une injection de 20 mg de 5,6 *trans*-25-OH-D₃ effectuée après la perfusion calcique sur la calcémie de 2 vaches atteintes d'hypocalcémie vitulaire (traits pleins). La calcémie de 2 témoins est représentée en pointillé. Chaque flèche représente une perfusion calcique.

En conclusion, le 5,6 *trans*-25-OH-D₃ qui élève rapidement et intensément la calcémie et la phosphatémie des vaches parturientes semble pouvoir être utilisé efficacement et sans danger dans la prophylaxie (20 mg par voie intraveineuse au moment du vélage) et dans la thérapeutique (20 mg par voie intraveineuse après la perfusion calcique) du syndrome vitulaire.

Reçu pour publication en janvier 1976.

REMERCIEMENTS

Le 5,6 *trans*-25-OH-D₃ utilisé dans cette expérimentation a été gracieusement fourni par les laboratoires Roussel (D^r MATHIEU De FOSSEY et D^r GRANDADAN). M. JOURNET (Laboratoire de Production laitière) a mis à notre disposition les animaux de race *Holstein* ou *Frisonne*.

SUMMARY

PROPHYLAXIS AND TREATMENT OF PARTURIENT HYPOCALCEMIA
IN COWS WITH 5,6 TRANS-25-HYDROXYCHOLECALCIFEROL

5,6 *trans*-25-hydroxycholecalciferol (5,6 *trans*-25-OH-D₃) is a synthetic analogue of 1,25-dihydroxycholecalciferol (fig. 1), the biologically active metabolite of vitamin D₃; it strongly stimulates intestinal calcium absorption in rats. We study its value as a prophylactic or therapeutic agent of parturient hypocalcemia in dairy cows.

5,6 *trans*-25-OH-D₃ (5 mg/animal), given intravenously to 8 cows at the exact time of first or second calving, significantly inhibits hypocalcemia and hypophosphatemia occurring during the hours following parturition (fig. 2 and 3). Sixteen cows, weighing 650 kg and calving for the third time or more, are each given 10 mg of 5,6 *trans*-25-OH-D₃ intravenously at exact calving time. Only 2 present clinical symptoms of parturient hypocalcemia, while these symptoms appear in 9 out of 11 control cows ($P < 0.001$). The drop in plasma calcium and phosphate observed during the hours following parturition is significantly smaller in treated than in control animals (fig. 4).

In 2 other cows, afflicted with parturient hypocalcemia and treated with calcium gluconate and 5,6 *trans*-25-OH-D₃ (20 mg/animal given intravenously just after calcium infusion), no relapse is observed and plasma calcium remains at normal level after the treatment. It falls in two control animals treated with calcium alone (fig. 5). No toxic effect of 5,6 *trans*-25-OH-D₃ is noted in any of the 26 animals treated.

These results indicate that 5,6 *trans*-25-OH-D₃, given intravenously at the exact time of calving, could be a useful agent in the prophylaxis of parturient hypocalcemia. Furthermore, it might prevent relapses if given just after calcium infusion in hypocalcemic parturient cows.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BARLET J. P., 1969. Variations de la calcémie et de la phosphatémie chez la vache laitière au moment du vêlage : rôle probable de la calcitonine dans l'étiologie du syndrome vitulaire. *Rech. vétér.*, **2**, 93-100.
- DE LUCA H. F., 1969. 25-hydroxycholecalciferol, the probable metabolically active form of vitamin D. Isolation, identification and subcellular location. *Amer. J. Clin. Nutr.*, **22**, 412-424.
- DE LUCA H. F., 1973. The kidney as an endocrine organ for the production of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, a calcium-mobilizing hormone. *New England J. Med.*, **289**, 359-365.
- DE LUCA H. F., 1974. Vitamin D: the vitamin and the hormone. *Fed. Proc.*, **33**, 2211-2219.
- DE LUCA H. F., KLEINER-BOSSALER A., 1973. Metaboliten von vitamin D als Hormone in der Regulation des Calcium- und Phosphatstoffwechsels. *M Schr. Kinderheilk.*, **121**, 329-337.
- DOBSON R. C., WARD G., 1974. Vitamin D physiology and its importance in cattle: a review. *J. Dairy Sci.*, **57**, 985-991.
- FRASER D. R., KODICEK E., 1970. Unique biosynthesis by kidney of a biologically active vitamin D metabolite. *Nature (London)*, **228**, 764-766.
- GRAY R., BOYLE I., DE LUCA H. F., 1971. Vitamin D metabolism: the role of kidney tissue. *Science*, **172**, 1232-1234.
- HIBBS J. W., 1950. Milk-fever (parturient paresis) in dairy cows. A review. *J. Dairy Sci.*, **33**, 758-789.
- HIBBS J. W., POUNDEN W. D., 1955. Studies on milk-fever in dairy cows. IV. Prevention by short time, prepartum feeding of massive doses of vitamin D. *J. Dairy Sci.*, **38**, 65-72.
- HOLICK M. F., DE LUCA H. F., 1974. Vitamin D metabolism. *Ann. Rev. Med.*, **25**, 349-367.
- HOLICK M. F., GARABEDIAN M., DE LUCA H. F., 1972 a. 5,6 *trans*-25-hydroxycholecalciferol: vitamin D analog active on intestine of anephric rats. *Science*, **176**, 1247-1248.
- HOLICK M. F., GARABEDIAN M., DE LUCA H. F., 1972 b. 5,6 *trans*-isomers of cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol. Substitutes for 1,25-dihydroxycholecalciferol in anephric animals. *Biochemistry*, **11**, 2715-2719.
- KENDALL K. A., HARSHBARGER K. E., HAYS R. L., ORMISTON E. E., 1970. Blood serum composition associated with prepartum diet and colostrum removal in relation to parturient paresis. In J. J. B., ANDERSON, *Parturient hypocalcemia*, 55-70, Academic Press, London.

- KRONFELD D. S., 1971. Parturient hypocalcemia in dairy cows. *Advances Vet. Sci. Comp. Med.*, **15**, 133-157.
- LARVOR P., BROCHART M., THERET M., 1961. Enquête sur la fièvre vitulaire et la tétanie d'herbage des bovins en France. *Econ. Med. anim.*, **2**, 5-38.
- MANSTON R., 1964. Investigation of the effects of vitamin D₃ on calcium and phosphorus metabolism in cows, using calcium-45 and phosphorus-32. *Brit. Vet. J.*, **120**, 365-371.
- MANSTON R., PAYNE J. M., 1964. Mineral unbalances in pregnant « milk-fever prone » cows and the value and possible toxic effects of treatment with vitamin D₃ and dihydrotachysterol. *Brit. Vet. J.*, **120**, 167-177.
- MARR A., MOODIE E. W., ROBERTSON A., 1955. Some biochemical and clinical aspects of milk-fever. *J. Comp. Path.*, **65**, 347-365.
- MAYER G. P., RAMBERG C. F., KRONFELD D. S., 1966. Hypocalcemia without paresis in cows. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, **151**, 1673-1680.
- MOODIE E. W., MARR A., ROBERTSON A., 1955. Serum calcium and magnesium and plasma phosphate levels in normal parturient cows. *J. Comp. Path.*, **65**, 20-36.
- NORMAN A. W., 1971. Evidence for a new kidney-produced hormone, 1,25-dihydroxycholecalciferol, the proposed biologically active form of vitamin D. *Amer. J. Clin. Nutr.*, **24**, 1346-1351.
- OFFERMANN G., SCHAEFER K., GRIGOLEIT H. G., DITTMAR F., 1975. Pharmacokinetics of 5,6-*trans*-25-hydroxycholecalciferol, a synthetic analogue of vitamin D₃, in man. *Europ. J. Clin. Pharmacol.*, **8**, 255-260.
- OLSON W. G., JORGENSEN N. A., BRINGE A. N., SCHULTZ L. H., De LUCA H. F., 1973 a. 25-hydroxycholecalciferol. I. Treatment for parturient paresis. *J. Dairy Sci.*, **56**, 885-888.
- OLSON W. G., JORGENSEN N. A., SCHULTZ L. H., De LUCA H. F., 1973 b. 25-hydroxycholecalciferol. II. Efficacy of parenteral administration in prevention of parturient paresis. *J. Dairy Sci.*, **56**, 889-895.
- PAYNE J. M., MANSTON R., 1967. The safety of massive doses of vitamin D₃ in the prevention of milk-fever. *Vet. Record*, **79**, 214-216.
- SEEKLES L., REITSMA P., De MAN T. J., WILSON J. H. G., 1958. Effect of intravenous injection of high doses of crystalline vitamin D₃ on the occurrence of milk-fever in cows. *Tijdschr. Diergeneesk.*, **83**, 125-136.