

RIJKSINSTITUUT VOOR
VOLKSGEZONDHEID EN MILIEU
BILTHOVEN

Rapport nr. 642810 002

**Toxicokinetiek en embryotoxische effecten van vitamine A
na eenmalige orale toediening van verschillende doses
retinylpalmitaat aan drachtige ratten.**

M. Olling, A.H. Piersma, MA. Bruil, A. Verhoef en
R. Klaassen

oktober 1995

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht en ten laste van de Hoofdinspectie
Gezondheidsbescherming in het kader van het project 642810.

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven
tel. 030-274911, fax 030-2742971

VERZENDLIJST

- 1-5 F. Schuring, Hoofdinspecteur Gezondheidsbescherming
- 6 DG Volksgezondheid - prof.dr. B. Sangster
- 7 Depot Nederlandse Publikaties en Nederlandse Bibliografie
- 8 Directie RIVM
- 9 dr.ir. G. de Mik
- 10 dr.ir. H.J.G.M. Derks
- 11 dr. W.H. Könemann
- 12 dr. J.W. v.d. Laan
- 13 dr. J.G. Loeber
- 14 Unit BFT
- 15-19 Auteurs
- 20 SBD Voorlichting & Public Relations
- 21 Bureau Rapportenregistratie
- 22-23 Bibliotheek RIVM
- 24-44 Reserve exemplaren

INHOUDSOPGAVE

	<u>Blz.</u>
Verzendlijst	2
Inhoudsopgave	3
Abstract	4
Samenvatting	5
Inleiding	6
Methode	7
Resultaten en Discussie	9
Conclusies	12
Referenties	13
Figuur 1	14
Figuur 2	15
Tabel 1 + 2	16
Tabel 3	17
Tabel 4	18
Tabel 5 + 6	19
Tabel 7	20

Abstract

In this report an experiment is described in which the relationship between the pharmacokinetics and embryotoxic effects after a single oral dose of vitamin A is investigated.

Retinyl palmitate in olive oil was orally administered to pregnant rats on day 10 of gestation at three different dose levels. The pharmacokinetics was followed for 24 hours and on day 11 and day 21 of gestation the conceptus were examined for malformations.

From the pharmacokinetic data it appears that in rats after oral administration of retinyl palmitate no linear relationship could be detected between the internal dose (AUC and C_{max}) of retinol, retinyl palmitate and retinyl stearate and the dose administered. Only a positive correlation between retinyl oleate and the dose could be found. In this experiment, no concentrations higher than the detection limit of retinoic acid were detected in the plasma of the rats.

The embryotoxic effects, such as delayed closure of the neural tube at gestation day 11, and facial dysmorphogenesis as determined at day 21, however, were clearly correlated to the dose.

Samenvatting

In dit rapport wordt een onderzoek beschreven naar de relatie tussen de kinetiek en de embryotoxische effecten van vitamine A in de rat na eenmalige orale toediening. Dit onderzoek werd uitgevoerd in het kader van een project gericht op de ontwikkeling van een 'physiologically based pharmacokinetic model' (PB-PK model), voor schatting van de effecten van vitamine A blootstelling bij zwangere vrouwen na consumptie van lever of leverproducten. Aan drachtige ratten werd op dag 10 van de dracht een oplossing van retinylpalmitaat in olijfolie oraal toegediend in 3 verschillende doses (100, 300 en 1000 mg/kg). Bij de helft van de dieren werd de kinetiek gedurende 24 uur gevolgd en een aantal van de embryo's werd 24 uur na toediening onderzocht op afwijkingen. De overige dieren werden in de foetale fase op dag 21 van de dracht morfologisch onderzocht.

Uit het farmacokinetisch onderzoek blijkt dat er bij de rat na orale toediening van retinylpalmitaat geen relatie kon worden aangetoond tussen de interne blootstelling (uitgedrukt als oppervlak onder de concentratie-tijd curve (AUC) of de maximale concentratie (C_{max})) aan retinol, retinylpalmitaat en retinylstearaat en de toegediende dosis. Alleen het gevormde retinyleleaat gaf een verhoging van deze farmacokinetische grootheden te zien bij verhoging van de dosis. Er konden in dit onderzoek geen retinoïnezuren worden aangetoond in het plasma van de behandelde ratten.

Met betrekking tot de embryotoxische effecten werd op dag 11 van dracht een dosis-afhankelijke vertraging van de sluiting van de neuraalbuis gevonden. Ook de incidentie van morfologische afwijkingen op dag 21 van de dracht, met name in het aangezicht, die passen in het beeld van vitamine A embryopathie, bleken gerelateerd te zijn aan de dosis.

Inleiding

Vitamine A is een bekende embryotoxische stof bij mens en dier (Rosa, 1986; Lammer, 1985; Geelen, 1979). De embryotoxische effecten bij de mens zijn vooral bekend uit onderzoeken met herhaalde dermale toediening van retinoïden bij de behandeling van huidaandoeningen, en het gebruik van orale vitaminepreparaten als voedingssupplementen (Rosa, 1986; Lammer, 1985). De meest gevoelige periode ligt tijdens de organogenese, dit is bij de mens tussen de 2de en 5de week en bij dat rat dag 10 van de zwangerschap. Recent is vastgesteld dat lever van landbouwhuisdieren en de daarvan afgeleide producten hoge concentraties vitamine A bevatten. Het komt hierin vooral voor in de vorm van retinylpalmitaat mede als gevolg van hoge belasting via diervoeders waaraan vitamine A is toegediend en door de vorming van vitamine A uit het β -caroteen van het opgenomen plantaardig voer. Consumptie van deze lever zou voor zwangere vrouwen volgens het Scientific Committee for Food van de Europese Unie (1990) een mogelijk risico opleveren met betrekking tot embryotoxische effecten.

Om een risicoschatting van een éénmalige of herhaalde piekbelasting met vitamine A bij de mens te kunnen uitvoeren werd gekozen voor het ontwikkelen van een 'physiologically based pharmacokinetic model' (PB-PK model) voor vitamine A bij de rat, om de relatie vast te kunnen stellen tussen de interne blootstelling aan vitamine A en de hierdoor optredende embryotoxische effecten. Dit model zal via allometrische extrapolatie vertaald worden naar de mens.

Om de relatie tussen dosis, interne dosis en effecten te kunnen vaststellen is een onderzoek uitgevoerd naar kinetische parameters en embryotoxische effecten bij de rat na blootstelling aan een eenmalige, orale dosis retinylpalmitaat op dag 10 van de dracht.

Methode

Dieren.

Vrouwelijke Wistar Riv:TOX ratten, 80 stuks, 9 weken oud en met een gewicht van 100 - 120 g werden gedurende 6 weken geacclimatiseerd. Voer, SSP/TOX (Hope Farms), met 5,5 mg/kg retinylpalmitaat, en leidingwater waren ad libitum beschikbaar. Het dag-nacht ritme was gewijzigd met de donkerperiode van 05.00 - 17.00 uur. Op de dagen 1, 3, 4, 5, 8, 9, 11 en 12 van het experiment werden steeds acht dieren gewogen en gedekt. Tien dagen na dekking (tijdstip waarop de organogenese plaats vindt) werd oraal retinylpalmitaat, opgelost in olijfolie, in drie verschillende doses per kilogram lichaamsgewicht, toegediend: 100 mg/kg; 300 mg/kg en 1000 mg/kg. De toediening vond plaats volgens het schema zoals gegeven in tabel 1.

Farmacokinetisch onderzoek.

Van de ratten die op de dagen 11, 15, 18 en 22 vitamine A kregen toegediend werden vlak voor de toediening bloedmonsters (0.2 ml) afgenomen via een incisie in de staart en vervolgens op de tijdstippen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 en 24 uur na toediening. Na de laatste bloedafname werden de ratten overgebracht (naar de Unit TEP) voor onderzoek van embryotoxische effecten, en werd bij de sectie nogmaals een bloedmonster afgenomen d.m.v. hartpunctie.

De bloedmonsters werden gecentrifugeerd en het plasma bewaard bij -70°C.

De plasmamonsters werden geanalyseerd volgens de gevalideerde methode beschreven in rapport 642810-03. De relevante validatiegegevens staan vermeld in tabel 2.

De volgende farmacokinetische kengetallen werden modelonafhankelijk berekend met behulp van het programma Topfit (versie 2.1):

- C_{max} : de maximale concentratie bepaald volgens directe aflezing uit de concentratie-curve ($\mu\text{g/ml}$);
- t_{max} : de tijd na toediening waarop C_{max} wordt bereikt (uur);
- AUC_{0-24} : het oppervlak onder de concentratie-tijd curve van het tijdstip van toediening tot het laatst gemeten tijdstip (24 uur) berekend met de lineaire trapeziumregel ($\mu\text{g.h/ml}$).

Embryotoxisch onderzoek.

De ratten welke op de dagen 11, 15, 18 en 22 van het experiment vitamine A kregen toegediend, werden 24 uur na toediening (is dag 11 van de dracht) gedood door middel van een intracardiale injectie van 0,2 ml T61 dat 0,2 g /ml embutramide bevat, waarna sectie werd verricht volgens SOP TEP 109. De levers en de embryo's werden verwijderd en ingevroren voor eventuele analyse van de vitamine A componenten. De helft van de embryo's werd gebruikt voor directe morfologische beoordeling en de overige embryo's werden ingevroren voor een eventuele bepaling van de concentraties aan vitamine A. Bij het morfologisch onderzoek werd het aantal implantatieplaatsen in de uterus geteld, en per embryo het somietenaantal, de draaiing (0: niet gedraaid, 0,5: deels gedraaid; 1: volledig gedraaid), en de sluiting van de neuraalbuis aan de craniale zijde (0: open; 1: gesloten) vastgelegd.

De dieren welke op de dagen 13, 14, 19 en 21 vitamine A hadden toegediend gekregen, werden op dag 21 van de dracht afgemaakt, en de inhoud van hun uteri geteld, en foeten gewogen en morfologisch beoordeeld.

Resultaten en Discussie

In de tabellen 3 en 4 staan de gemiddelde resultaten van de chemische analyses vermeld. Tevens zijn deze gegevens grafisch weergegeven in de figuur 1. Er werden geen aantoonbare hoeveelheden van 13-cis retinoïnezuur en all-trans retinoïnezuur gevonden. In de monsters van de dieren van groep A (de controlegroep) werd alleen retinol aangetoond. De concentraties van de overige componenten in deze groep lagen beneden de ondergrenzen (zie tabel 2) van de bepalingmethode en zijn daarom hier niet vermeld. Het ongelijke aantal dieren in de groepen wordt veroorzaakt door het feit dat niet steeds alle dieren gedekt werden. Alleen de dieren die gedekt waren, al of niet drachtig, werden in het experiment meegenomen.

In de tabellen 5 en 6 zijn de farmacokinetische grootheden, C_{max} , de t_{max} en de AUC_{0-24h} weergegeven voor alle componenten.

Door het grillige verloop van de individuele concentratie-tijd curven was het niet mogelijk andere farmacokinetische grootheden te berekenen.

De AUC_{0-24} waarden zijn statistisch getoetst met het programma Minitab op het voorkomen van significante verschillen tussen de verschillende doseringen. Voor retinol werd alleen een significant verschil aangetoond tussen de AUC's van de dosering C en D t.o.v. de blanco groep A. Tussen groep A en de laagste doseringsgroep werd geen significant verschil gevonden. Voor retinylpalmitaat, dat niet in het plasma van de controle groep (A) werd gevonden, werd tussen de groepen B, C en D geen statistisch significant verschil gevonden. Met betrekking tot de AUC-waarden voor retinyleleaat en retinylstearaat werd eveneens geen statistisch significant verschil aangetoond tussen de verschillende doses. In figuur 2 is de relatie tussen de dosis en de gevonden gemiddelde AUC-waarden grafisch weergegeven. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de AUC van retinyleleaat tendeert naar een positieve correlatie met de gegeven dosis. De overige componenten vertonen geen lineaire toename van de AUC bij een hoger dosering.

Met betrekking tot de C_{max} en de verschillende doses werd met retinol alleen een statistisch significant verschil aangetoond tussen de dieren van groep A (controle groep) en die van groep D. Voor retinylpalmitaat kon tussen de groepen B, C en D geen statistisch significant verschil worden aangetoond. Voor retinyleleaat en retinylstearaat, werden eveneens geen significante verschillen tussen de verschillende doses aangetoond.

Bij het testen van de verschillen tussen de AUC-waarden van de verschillende doses en ook bij de C_{max} -waarden dient te worden opgemerkt dat de afwezigheid van significante verschillen samenhangt met de grote variabiliteit in deze farmacokinetische grootheden.

In figuur 2 zijn de gemiddelde C_{max} waarden grafisch uitgezet tegen de doses. Hierbij zien we dat, zoals ook bij de AUC-waarden, alleen de C_{max} van retinyleleaat toeneemt met toenemende dosis.

Een mogelijke verklaring voor het al of niet optreden van significante verschillen in de farmacokinetische grootheden tussen de doses voor de bepaalde componenten zou gevonden kunnen worden in het feit dat bij fysiologische doseringen de esterificatie van het geabsorbeerde retinol voornamelijk plaats vindt door het enzym leciteretinolacyltransferase (LRAT). Bij hogere doseringen wordt de hoeveelheid boven de fysiologisch normale dosering, ge-esterificeerd door het enzym acyl-CoA-retinoltransferase (ARAT) (Norman en Blomhoff, 1992). Dit zou betekenen dat bij de rat de concentraties retinylpalmitaat en retinylstearaat bepaald worden door de activiteit van LRAT die maximaal is bij doses boven de fysiologische hoeveelheden en waardoor de vorming van het stearaat en palmitaat dosis-onafhankelijk is geworden. Bij hogere doses wordt de overmaat dan voornamelijk omgezet in het oleaat door het enzym ARAT. Hierbij gaan we ervan uit dat de gevonden esters in het plasma alleen afkomstig zijn van de toegediende dosis en niet door de lever worden gevormd. Kennis hierover is in de literatuur tot nu toe niet te vinden daar slechts sporadisch de verschillende esters separaat bepaald zijn.

Voorzover onze kennis thans reikt wordt alleen retinylpalmitaat in de lever opgeslagen en komt uit de lever alleen retinol, gebonden aan 'retinol binding protein' (RBP) vrij (Green et al., 1993). Ook Blaner et al. (1985) vinden bij ratten op een normaal dieet met retinylacetaat (5 mg/kg voer) slechts marginale hoeveelheden oleaat en stearaat in de levers. Daarom wordt door de auteurs aangenomen dat de gevonden esters in plasma direct afkomstig zijn van de toegediende dosis door vorming hiervan in de enterocyten van de darm.

Het niet vinden van de zuren all-trans en 13-cis-retinoïnezuur in plasma wordt verklaard door de te hoge detectiegrens van de bepalingmethode van beide componenten. Volgens een recent artikel van Collins et al (1994) blijkt dat na herhaalde orale toediening van 100 mg/kg retinylpalmitaat gedurende 5 dagen aan ratten op een normaal dieet, plasmaspiegels van de zuren werden gevonden van < 1 ng/ml. De hierbij gevonden retinol- en retinylpalmitaatspiegels lagen in dezelfde orde van grootte als die door ons gevonden in de laagste doseringsgroep (groep B). Zelfs na eenmalige toediening van 100 mg/kg retinol aan muizen worden door Eckhoff et al. (1989) concentraties lager dan 100 ng/ml gevonden. Deze in de literatuur gevonden concentraties aan retinoïnezuur liggen onder de detectiegrens van de door ons gebruikte bepalingmethode.

In tabel 7 zijn de gegevens van het embryotoxisch onderzoek samengevat. Het postimplantatie verlies blijft op dag 11 van de dracht beperkt tot 3 in de middelste dosering. Dit is geen effect van de blootstelling. Het percentage open neuraalbuizen aan de craniale zijde neemt toe met de dosering, van 0% in de controle tot 70% in de hoogste doseringsgroep.

Om na te gaan of dit effect een afspiegeling is van algehele vertraging in de ontwikkeling is het aantal somieten per embryo geteld. Somieten markeren namelijk de lichaamssegmenten die later teruggevonden worden als onder meer wervels en ribben, en kunnen dienen als een maat voor het ontwikkelingsstadium van het embryo. Bij de hoogste dosering hebben de embryo's gemiddeld een kleiner somietenaantal. Dit wijst op algemene groeivertraging. Bovendien blijkt bij vergelijking van embryo's met evenveel somieten uit de verschillende groepen, dat ook het percentage open neuraalbuizen toeneemt met de dosis; bijvoorbeeld bij 15 somieten: 0/3, 0/3, 2/5, 6/9. Er is derhalve tevens sprake van een specifiek effect op de neuraalbuisluiting, en niet uitsluitend van algemene vertraging van de ontwikkeling.

Er werden verschillende vormen van open neuraalbuizen aan de craniale zijde gevonden. In een aantal gevallen was de morfologie normaal, wijzend op niet meer dan vertraging van de sluiting. In andere gevallen was er sprake van te ver uiteen wijken van de neurale wallen, waarbij geen sluiting in een later stadium te verwachten valt. De interpretatie van deze beide situaties is verschillend. In dit onderzoek is bij het scoren dit onderscheid niet gemaakt. Het verdient aanbeveling om dit in vervolgonderzoek wel te doen, en daarbij ook de mate van sluiting van het caudale deel van de neuraalbuis te scoren.

Op dag 21 van de dracht wordt een dosisafhankelijke toename van prenatale sterfte door resorpties, foetale dood, en 'abortus' waargenomen. Met de laatste term wordt bedoeld de dode foeten die losgelaten hebben van hun implantatieplaats en bij de sectie worden aangetroffen in de uterus. Van de levende foeten had er in de hoogste doseringsgroep slechts één een exencephalie; behalve dit exemplaar werden geen foeten met open defecten aangetroffen. Deze bevinding op dag 21 contrasteert met het grote aantal open neuraalbuizen dat werd aangetroffen op dag 11 van de dracht. De prenatale sterfte is hiervoor niet een voldoende verklaring. Zo wordt bij de hoogste dosering op dag 11 70% open gevonden, terwijl op dag 21 2% open en 40% prenatale sterfte optrad. Bij de lage en middendoseringen geldt eenzelfde verhaal. Zodoende wijzen de gegevens van dit onderzoek op een vertraagde sluiting van de craniale neuraalbuis als gevolg van blootstelling aan vitamine A. De vertraagde neuraalbuisluiting gaat gepaard met een aantal afwijkingen op dag 21. Deze passen alle in het bekende patroon van vitamine A embryopathie bij de rat (Cochean, 1953) en bij de mens (Lammer, 1985). Samengevat kan geconcludeerd worden dat een eenmalige orale blootstelling aan retinylpalmitaat aangeboren afwijkingen kan veroorzaken bij de rat. Voorts bleek dat voor het meten van embryotoxische effecten een goede dosisrange werd gekozen om een scala van vitamine A geïnduceerde afwijkingen te vinden.

Conclusies

Het doel van dit onderzoek was om een verband te vinden tussen farmacokinetiek van de retinoïden en het optreden van embryotoxische effecten na eenmalige toediening van retinylpalmitaat aan drachtige ratten.

Met betrekking tot de farmacokinetiek kon alleen een tendens in de dosis-effect relatie gezien worden in de AUC en de C_{max} van het in de rat gevormde retinyloloeaat. Dit verband is echter niet-lineair, de toename van de AUC en die van de C_{max} waren veel kleiner dan de toename in de doses. De farmacokinetisch grootheden van de overige vitamine A componenten worden door het organisme blijkbaar dusdanig efficiënt gereguleerd dat geen verschillen konden worden aangetoond tussen de verschillende doseringen.

De voor embryotoxische effecten belangrijk geachte metabolieten van vitamine A, all-trans- en 13-cis retinoïnezuur, konden in dit onderzoek niet worden aangetoond. Dit maakt een vergelijking met de literatuur waarin embryotoxische effecten gemeten zijn na toediening van de zuren, moeilijk. Bij de bepaling van de retinoïden in de embryo's, welke thans relevant worden geacht voor de ontwikkeling van het PB-PK model, zal hieraan nader aandacht worden gegeven.

Uit het embryotoxisch onderzoek blijkt het dat er een duidelijk verband is tussen de toegediende dosis en het optreden van embryotoxische effecten. Vooral het niet gesloten zijn van de neuralebuis op dag 11 van de dracht blijkt sterk gecorreleerd te zijn aan de dosis. Het postimplantatieverlies en de craniale malformaties, die op dag 21 van de dracht gevonden werden, bleken bij de hoogste dosering significant te verschillen van de andere doseringen.

De resultaten van dit onderzoek zullen verder gebruikt worden voor het kalibreren van een 'physiologically based pharmacokinetic model' (PBPK-model) voor het beschrijven van de lotgevallen van vitamine A in de rat en verdere kwantificering van de effecten. Dit model zal naar de humane situatie worden geëxtrapoleerd.

Referenties

Biesalski HK (1989). Comparative assessment of the toxicology of vitamin A and retinoids in man. *Toxicology* 57:117.

Blaner WS et al. (1985). Retinoid, retinoid-binding proteins, and retinyl palmitate hydrolase distribution in different types of rat liver cells. *J Lipid Res* 26: 1241.

Cochean SQ (1953). Excessive intake of vitamine A as a cause of congenital anomalis in the rat. *Science* 117: 535.

Collings MD et al. (1994) Comparative teratology and transplacental pharmacokinetics of all-trans-retinoic acid, 13-cis-retinoic acid, and retinyl palmitate following daily administrations in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 127: 132.

Eckhoff Ch et al. (1989). Transplacental pharmacokinetics and teratogenicity of a single dose of retinol (vitamin A) during organogenesis in the mouse. *Toxicol Letters* 48: 171.

Geelen JAG (1979). Hypervitaminosis A induced teratogenesis. *CRC Crit Rev Toxicol* 6: 351.

Green MH et al. (1993) Vitamin A metabolism in rat liver: a kinetic model. *Am J Physiol* 264: G509.

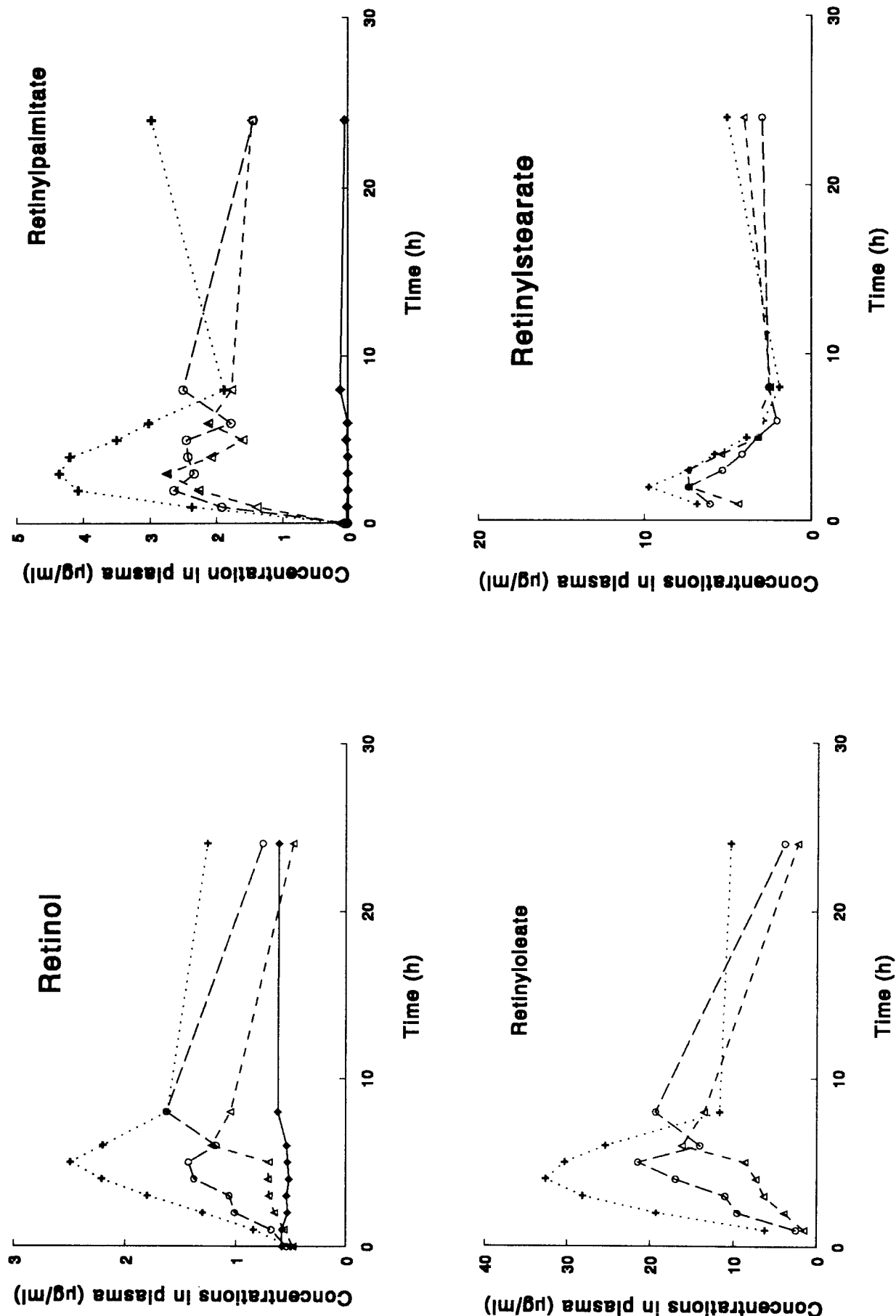
Lammer EJ et al. (1985). Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med* 313: 837.

Norum KR and Blomhoff R (1992). McCollun Award lecture, 1992: Vitamin A absorption, transport, cellular uptake, and storage. *Am J Clin Nutr* 56: 735.

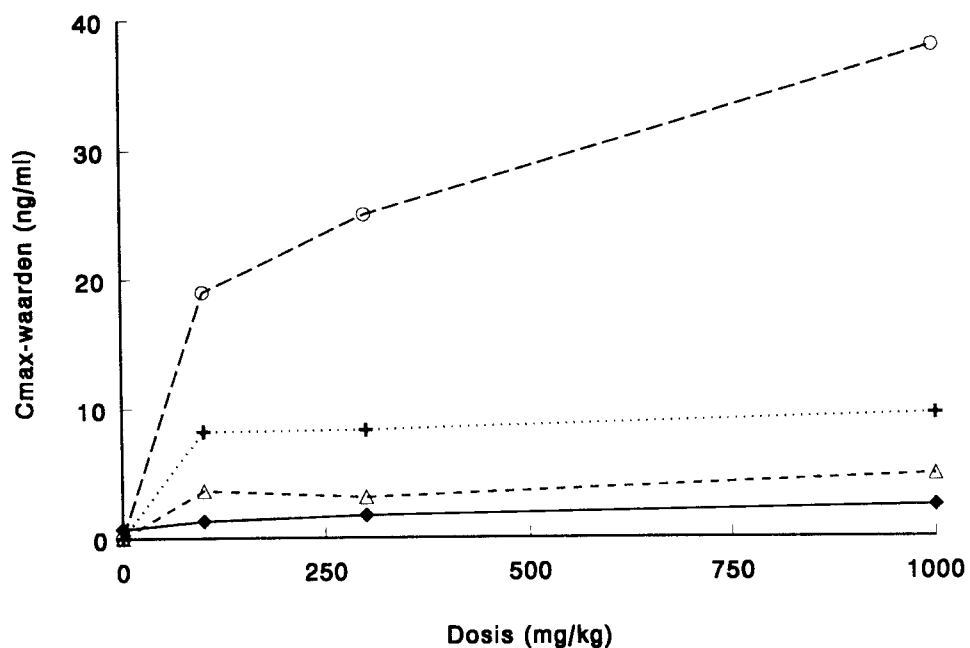
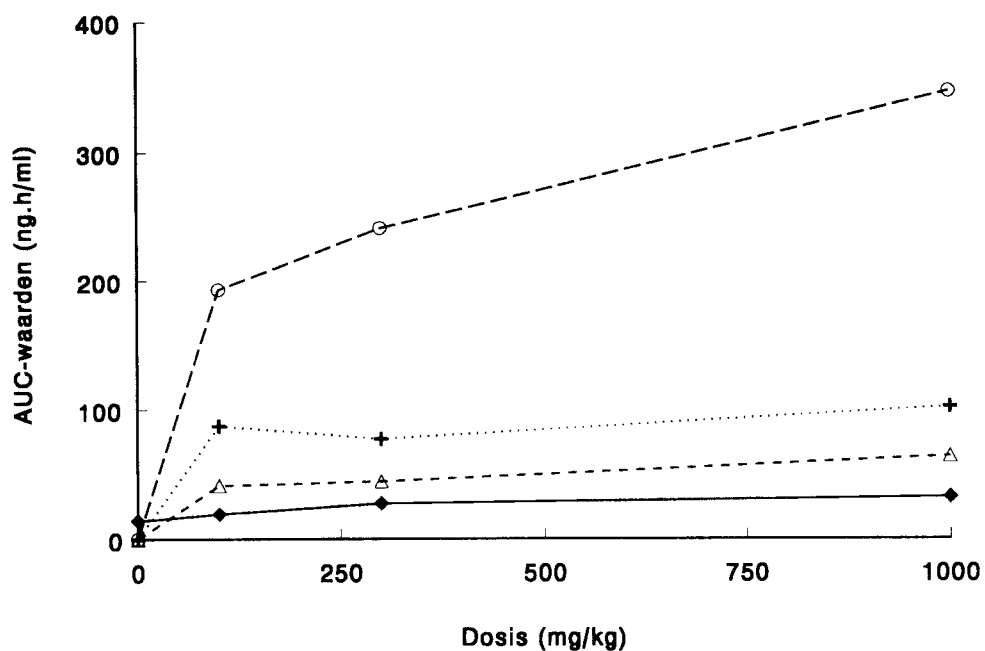
Rosa FW et al. (1986). Teratogen update: vitamin A congeners. *Teratology* 33: 355.

Scientific Committee for Food of the European Union. CS/VIT A/3, december 1990.

Figuur 1. Gemiddelde plasmapijgels van vitamine A metabolieten na 3 verschillende doses retinylpalmitaat aan ratten op dag 10 van de dracht. Controle groep: --♦--; 100 mg/kg: --△--; 300 mg/kg: --○--; 100 mg/kg: ---+---.



Figuur 2. AUC- en C_{max} -waarden van de verschillende vitamine A componenten in de rat na orale toediening van eenmalige doses retinylpalmitaat van 100, 300 en 1000 mg/kg. Retinol: --♦--; retinylpalmitaat: --Δ--; retinyloleaat: --o--; retinylstearaat: --+--.



Tabel 1. Toedieningsschema (per dag, per rat) retinylpalmitaat in verschillende hoeveelheden opgelost in olijfolie, aan drachtige ratten. De ratten ontvingen steeds 5 ml olijfolie per kg lichaamsgewicht.

Dag	Opl. A olijfolie	Opl. B 100 mg/kg	Opl. C 300 mg/kg	Opl. D 1000 mg/kg
11	1 en 2	3 en 4	5 en 6	7 en 8
13	9 en 10	11 en 12	13 en 14	15 en 16
14	23 en 24	17 en 18	19 en 20	21 en 22
15	31 en 32	25 en 26	27 en 28	29 en 30
18	37 en 38	39 en 40	33 en 34	35 en 36
19	45 en 46	47 en 48	41 en 42	43 en 44
21	51 en 52	53 en 54	55 en 56	49 en 50
22	59 en 60	61 en 62	63 en 64	57 en 58

Tabel 2 Lineariteit en minimaal detecteerbare concentratie vitamine A componenten in ratteplasma.

Componenten	Range ($\mu\text{g/ml}$)	R^2	Minimaal detecteerbare concentratie ($\mu\text{g/ml}$)
13-cis retinoïnezuur	0,125 - 25,00	0,9985	0,09
retinol	0,156 - 31,25	0,9973	0,02
all-trans retinoïnezuur	0,188 - 37,50	0,9982	0,08
retinyloleaat	0,72 - 143,75	0,9985	0,40
retinylpalmitaat	0,375 - 75,00	0,9982	0,07
retinylstearaat	0,90 - 90,00	0,9971	0,12

Tabel 3 Gemiddelde (\pm s.d.) plasmaspiegels van retinol en retinylpalmitaat bij de drachtige rat, op verschillende tijden na toediening van verschillende eenmalige doses retinylpalmitaat. Dosis A: olijfolie; dosis B: 100 mg/kg; dosis C: 300 mg/kg; dosis D: 1000 mg/kg.

Tijd	Retinol				Retinylpalmitaat			
	Dosis A (n=8)	Dosis B (n=5)	Dosis C (n=6)	Dosis D (n=7)	Dosis B (n=5)	Dosis C (n=6)	Dosis D (n=7)	
0	0,58 \pm 0,22	0,48 \pm 0,20	0,54 \pm 0,06	0,50 \pm 0,08	0,13 \pm 0,17	< 0,07	< 0,07	
1	0,58 \pm 0,19	0,56 \pm 0,12	0,68 \pm 0,10	0,84 \pm 0,17	1,39 \pm 0,89	1,92 \pm 0,69	2,37 \pm 1,18	
2	0,53 \pm 0,13	0,65 \pm 0,08	1,01 \pm 0,23	1,30 \pm 0,42	2,27 \pm 1,36	2,64 \pm 1,27	4,08 \pm 1,05	
3	0,54 \pm 0,20	0,70 \pm 0,08	1,06 \pm 0,37	1,80 \pm 0,78	2,75 \pm 1,57	2,34 \pm 0,72	4,36 \pm 2,25	
4	0,52 \pm 0,18	0,71 \pm 0,08	1,38 \pm 0,67	2,21 \pm 0,66	2,08 \pm 1,22	2,43 \pm 1,24	4,20 \pm 1,47	
5	0,53 \pm 0,19	0,70 \pm 0,19	1,43 \pm 0,56	2,49 \pm 0,96	1,60 \pm 0,72	2,45 \pm 0,78	3,50 \pm 0,80	
6	0,54 \pm 0,16	1,22 \pm 0,88	1,18 \pm 0,32	2,20 \pm 1,14	2,12 \pm 1,15	1,78 \pm 0,78	3,02 \pm 1,60	
8	0,62 \pm 0,18	1,05 \pm 0,26	1,63 \pm 0,75	1,62 \pm 0,71	1,77 \pm 0,83	2,50 \pm 2,14	1,88 \pm 0,98	
24	0,61 \pm 0,22	0,48 \pm 0,06	0,76 \pm 0,13	1,26 \pm 0,62	1,46 \pm 1,25	1,44 \pm 0,41	2,97 \pm 2,14	

Tabel 4 Gemiddelde (\pm s.d.) plasmaspiegels van retinyleleaat en retinylsteeraat bij de drachtige rat, op verschillende tijden na toediening van verschillende eenmalige doses retinylpalmitaat. Dosis A: olijfolie; dosis B: 100 mg/kg; dosis C: 300 mg/kg; dosis D: 1000 mg/kg.

Tijd	Retinyleleaat				Retinylsteeraat			
	Dosis B (n=5)	Dosis C (n=6)	Dosis D (n=7)		Dosis B (n=5)	Dosis C (n=6)	Dosis D (n=7)	
1	1,55 \pm 1,02	2,53 \pm 1,22	6,2 \pm 3,5		4,39 \pm 2,78	6,07 \pm 2,68	6,85 \pm 3,50	
2	3,93 \pm 1,42	9,54 \pm 8,69	19,3 \pm 6,8		7,33 \pm 3,76	7,35 \pm 3,82	9,73 \pm 2,90	
3	6,36 \pm 2,86	11,0 \pm 7,8	28,1 \pm 21,8		7,40 \pm 4,07	5,33 \pm 1,33	7,36 \pm 2,13	
4	7,32 \pm 3,27	16,9 \pm 14,4	32,6 \pm 13,5		5,40 \pm 3,35	4,16 \pm 1,67	5,80 \pm 2,12	
5	8,66 \pm 3,82	21,5 \pm 11,8	30,2 \pm 11,7		3,19 \pm 1,74	3,22 \pm 0,81	3,89 \pm 0,82	
6	16,2 \pm 11,4	14,0 \pm 6,2	25,4 \pm 18,9		3,26 \pm 1,76	2,07 \pm 1,02	2,90 \pm 0,98	
8	13,5 \pm 4,2	19,3 \pm 19,8	11,7 \pm 11,2		2,46 \pm 1,66	2,56 \pm 1,79	1,92 \pm 1,06	
24	2,43 \pm 3,13	4,01 \pm 4,69	10,4 \pm 13,9		4,06 \pm 4,17	2,98 \pm 0,95	5,07 \pm 2,73	

Tabel 5 Gemiddelde (\pm s.d.) farmacokinetische grootheden van retinol en retinylpalmitaat bij drachtige rat na eenmalige orale toediening van verschillende doses retinylpalmitaat. Dosis A: olijfolie; dosis B: 100 mg/kg; dosis C: 300 mg/kg; dosis D: 1000 mg/kg.

	Retinol				Retinylpalmitaat			
	Dosis A	Dosis B	Dosis C	Dosis D	Dosis B	Dosis C	Dosis D	
AUC ₀₋₂₄ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$) C.V.	14,3 \pm 4,5 31%	18,6 \pm 3,9 21%	28,4 \pm 7,8 28%	36,8 \pm 9,9 27%	40,9 \pm 14,1 34%	48,5 \pm 19,2 40%	63,7 \pm 18,2 29%	
C _{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$) C.V.	0,67 \pm 0,21 32%	1,32 \pm 0,84 63%	1,85 \pm 0,75 40%	2,79 \pm 0,90 32%	3,60 \pm 0,97 27%	3,59 \pm 1,76 49%	5,56 \pm 2,04 37%	
t _{max} (h) (range)	13 (0-24)	8 (6 - 8)	6 (4 - 8)	6 (4 - 8)	8 (3 - 24)	4 (1 - 8)	6 (2 - 24)	

Tabel 6 Gemiddelde (\pm s.d.) farmacokinetische grootheden van retinyloleaat en -stearaat bij drachtige rat na eenmalige orale toediening van verschillende doses retinylpalmitaat. Dosis A: olijfolie; dosis B: 100 mg/kg; dosis C: 300 mg/kg; dosis D: 1000 mg/kg.

	Retinyloleaat				Retinylstearaat			
	Dosis B	Dosis C	dosis D		Dosis B	Dosis C	Dosis D	
AUC ₀₋₂₄ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$) C.V.	193 \pm 53 28%	288 \pm 177 61%	343 \pm 151 44%		87,3 \pm 40,4 46%	76,1 \pm 19,2 25%	95,8 \pm 27,0 28%	
C _{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$) C.V.	18,8 \pm 9,6 51%	30,6 \pm 16,2 53%	40,9 \pm 16,5 40		8,74 \pm 3,87 44%	8,25 \pm 2,99 36%	10,26 \pm 2,91 28%	
t _{max} (h) (range)	7 (6 - 8)	5 (4 - 8)	7 (3 - 24)		7 (2 - 24)	2 (1 - 2)	5 (2 - 24)	

Tabel 7 Waargenomen embryotoxische effecten en bijbehorende morfologische grootheden.

Dosis groep	Controle groep (A)	100 mg/kg (B)	300 mg/kg (C)	1000 mg/kg (D)
dag 11 van de dracht				
aantal drachtig	3	5	3	6
aantal implantaties	36	54	36	74
aantal resorpties	0	0	3	0
postimplant.verlies (%)	0%	0%	8%	0%
no. embryos beoordeeld	16	24	15	37
totaal open @ per groep	0	8	6	26
open @ per groep (%)	0%	33%	40%	70%
somieten open @ embryo's		13.1±0.6	13.2±1.8	12.8±1.8
somieten alle embryo's	14.9 ± 1.8	13.5±1.6	13.8±1.3	13.4±1.8
Open/totaal aantal embryo's per somietenaantal				
10	-	-	1/1	4/4
11	-	0/2	-	2/2
12	0/1	1/4	-	5/5
13	0/2	5/9	3/4	4/6
14	0/5	2/3	0/5	5/8
15	0/3	0/3	2/5	6/9
16	0/1	0/2	-	0/2
17	0/2	0/1	-	0/1
18	0/2	-	-	-
dag 21 van de dracht				
aantal drachtig	6	4	2	5
aantal implantaties	57	49	22	53
aantal resorpties	2	2	5	10
aantal dode foeten	0	0	1	2
aantal 'abortussen'	0	0	0	9
aantal levende foeten	55	47	16	32
postimplan.verlies (%)	4%	4%	27%	40%
exencephalieën	0	0	0	1
open @ per groep (%)	0%	0%	0%	2%
micr-/anophthalmieën	0	0	0	11
afwezigheid oogleden	0	0	0	9
uitpuiende tong	0	0	13	20
gespleten gehemelte	0	0	2	27
pootafwijkingen	0	0	0	2
open rug	0	0	0	11
cran. malformaties (%)	0%	0%	0%	23%

@: craniale zijde van de neurale buis