

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIENE
BILTHOVEN

Rapport 642810001

Kinetiek en teratogeniteit van vitamine A.

Een literatuurstudie.

M. Olling, W. Bode, M. Bruil, K. Groen,
A.H. Piersma

september 1992

De literatuurstudie werd uitgevoerd in opdracht van de Hoofdinspectie Gezondheidsbescherming en is beschreven in projectnr. 642810.

VERZENDLIJST

- 1 - 5 Hoofdinspectie Gezondheidsbescherming
- 6 Directeur-generaal Volksgezondheid
- 7 Plv. Directeur-generaal Volksgezondheid
- 8 Depot Nederlandse publicaties en Nederlandse Bibliografie
- 9 Directie RIVM
- 10 dr.ir. G. de Mik
- 11 dr.ir. H.J.G.M. Derks
- 12 dr. W.H. Könemann
- 13 dr. J.W. v.d. Laan
- 14 dr. J.G. Loeber
- 15 prof.dr. P.W.J. Peters
- 16 Hoofd Bureau Voorlichting en Public Relations
- 17 - 21 Auteurs
- 22 Bibliotheek RIVM
- 23 Bureau Projecten- en Rapportenregistratie
- 24 - 40 Reserve exemplaren

INHOUDSOPGAVE

Verzendlijst.....	ii
Inhoudsopgave.....	iii
Summary.....	v
Samenvatting.....	vi
1 Inleiding.....	1
2 Algemeen.....	3
2.1 Bronnen van grote hoeveelheden vitamine A.....	4
2.2 Vitamine A behoefte van volwassenen.....	6
2.3 Proefdieren.....	7
3 Kinetiek van vitamine A.....	7
3.1 Absorptie.....	7
3.2 De absorptie van carotenoïden.....	8
3.3 De absorptie van retinylesters.....	9
3.4 De absorptie van retinoïnezuur.....	11
3.5 Transport, metabolisme en opslag in de lever.....	11
3.6 Verestering in de lever.....	13
3.7 Mobilisatie uit de lever.....	13
3.8 Retinoïnezuurvorming en metabolisme.....	14
4 Distributie.....	15

5	Teratogeniteit.....	21
5.1	Teratogeniteit bij de mens.....	21
5.2	Teratogeniteit bij proefdieren.....	21
5.3	Gevoelige periodes.....	21
5.4	Laagste effectieve doseringen.....	22
5.5	Mechanisme van teratogeniteit.....	23
5.6	Keuze van diersoort voor verder onderzoek.....	23
5.7	Kinetische factoren.....	24
6	Discussie.....	25
7	Conclusie.....	28
	Literatuur.....	29

SUMMARY

This report describes a literature study of the kinetics of vitamin A in different animal species. The goal of this study was to collect data to develop a model for risk assessment of the teratogenic effects of vitamin A.

In the diet vitamin A is present as esters of retinol and as carotenoids. In the gastro-intestinal tract the retinylesters are hydrolysed and the retinol formed are absorbed by the enterocytes in the lumen of the intestine. In the enterocytes esterification of retinol takes place and these esters are incorporated in chylomicrons which are transported by the lymph to the liver. Carotenoids are absorbed as such by the enterocytes and partially hydrolysed to retinol.

In the liver retinol bound to binding proteins, is stored in fat-storing cells and parachym cells. Retinol and its metabolite retinoic acid, again bound to binding proteins, are excreted by the liver depending on the demands of the organism.

After intake of large amounts of vitamin A it is presumed that the processes involved in the kinetics are saturable, and free retinol and retinoic acid can circulate in the body.

The sensitivity of the different species to the teratogenic effect of vitamin A is very variable. This difference in sensitivity can be caused by the different routes of administration used, the kinetics of vitamin A as well as the specific sensitivity of the target organ, the embryo.

From the literature can be concluded that the teratogenic effects are caused by retinol and retinoic acid.

To develop a model for the kinetics and risk assessment of vitamin A in pregnant women some questions still remain after this literature study. What is the bioavailability of retinol after administration of retinol esters and carotenoids and is the absorption linear? Under which circumstances (vitamin A status) is the storage in the liver saturable? To what compound is the embryo exposed after intake of vitamin A and what are the differences in the kinetics of vitamin A after a high single dose intake and after chronically intake? These questions should be answered by investigations in our laboratory.

The results of these studies shall contribute to the development of the model.

SAMENVATTING

In dit rapport wordt een literatuurstudie naar de lotgevallen en teratogene effecten van vitamine A bij verschillende diersoorten beschreven. De literatuurstudie werd uitgevoerd om data te verzamelen welke gebruikt kunnen worden bij het opstellen van een model voor de risicoschatting van de teratogene effecten bij de mens.

In het dieet komt vitamine A voor als esters van retinol en in de vorm van carotenoïden. In het maagdarmkanaal worden de retinylesters gehydrolyseerd en wordt het gevormde retinol in de enterocyten van de darmwand opgenomen. In de enterocyten vindt verestering plaats van retinol en inbouwning van deze ester in chylomicronen welke via de lymfe en het bloed naar de lever worden getransporteerd. Carotenoïden worden direct opgenomen in de enterocyten waarna ze gedeeltelijk worden gesplitst tot retinol.

In de lever wordt retinol, na hydrolyse van de esters, gebonden aan bindingseiwitten opgeslagen in 'fat-storing cells' en parenchymale cellen. Uit deze cellen worden retinol en retinoïnezuur (een metaboliet van retinol), gebonden aan transporteiwitten, gesecerneerd, afhankelijk van het aanbod en de behoefte van het organisme.

Bij een groot aanbod van vitamine A wordt verondersteld dat de processen betrokken bij de kinetiek verzadigd raken waardoor vrij retinol en retinoïnezuur in het lichaam circuleren.

De gevoeligheid van verschillende species met betrekking tot de teratogene effecten van retinol blijkt zeer uiteen te lopen. Dit kan veroorzaakt worden door zowel de verschillende gebruikte toedieningswegen, de kinetiek van vitamine A als de specifieke gevoeligheid van het doelorgaan, het embryo.

Bij de bestudering van de literatuur blijkt dat voor de teratogene effecten retinol en/of retinoïnezuur verantwoordelijk worden geacht.

Uit de literatuur blijkt verder dat voor het opstellen van een kinetisch model voor de schatting van het risico van vitamine A bij zwangere vrouwen nog een aantal vragen dient te worden beantwoord door het doen van onderzoek bij verschillende species. Deze vragen zijn: wat is de biologische beschikbaarheid van retinol na toediening van retinylesters en carotenoïden? Is de absorptie van vitamine A lineair? Onder welke omstandigheden (vitamine A status) en bij welke dosis is de opslag van vitamine A in de lever verzadigd? Waaraan wordt het embryo blootgesteld na inname van vitamine A en wat zijn de verschillen in de kinetiek van vitamine A na hoge eenmalige en chronische toediening?. De resultaten van deze onderzoeken zullen bijdragen aan de ontwikkeling van het model.

1 INLEIDING

Hoge doses vitamine A, toegediend aan proefdieren gedurende een bepaalde fase van de dracht, kunnen een breed spectrum aan ontwikkelingsstoornissen veroorzaken (Geelen, 1979; Biesalski, 1989). Ook voor de mens bestaan er aanwijzingen dat teratogeniteit veroorzaakt kan worden door overdosering met vitamine A (Rosa et al, 1986; Biesalski, 1989). Vooral bij een relatief hoge, maar niet schadelijke chronische belasting met vitamine A en verwante stoffen (β -caroteen) beneden de dagelijks aanvaardbare dosis (ADI), kan een hoge éénmalige dosis acute toxicische effecten geven. Op grond hiervan ontraadt de Wereld Gezondheids Organisatie (WHO) sinds 1991 de consumptie van lever door zwangere vrouwen. De gevonden dosis-effectrelaties in proefdieren wijzen op een grote inter-speciesvariatie in gevoeligheid, waardoor traditionele extrapolaties vanuit diermodellen niet betrouwbaar zijn. Het is mogelijk dat de gevonden verschillen tussen proefdieren kinetisch bepaald zijn. Daarbij wordt met name gedacht aan opname- en distributieprocessen van de verschillende transportvormen van retinol, zijn esters en metabolieten en, in het bijzonder, de mate waarin deze het embryonale weefsel kunnen bereiken. Bij een oriënterende literatuurstudie werden echter geen aanwijzingen gevonden dat de toxicokinetiek van vitamine A onder condities waarbij teratogene effecten optreden, voldoende gekarakteriseerd is. Kennis daarover, hetzij uit nog op te sporen literatuur, hetzij uit eigen experimenten, is van cruciaal belang om een kinetisch extrapolatiemodel te kunnen opstellen.

In dit rapport is zoveel mogelijk relevante informatie verzameld met betrekking tot de kinetiek en de teratogeniteit van vitamine A. Tevens zal een inventarisatie gemaakt worden van relevante bepalingmethoden van de belangrijkste componenten van vitamine A en metabolieten, welke in een later stadium zullen worden gerapporteerd.

Bij aanvang van de literatuurstudie werd gekozen voor de muis, de rat en het konijn als meest relevante diermodellen. Van de muis en rat zijn veel teratogeniteitsstudies met vitamine A en verwante stoffen beschreven. Voor het konijn, waarover slechts weinig bekend is met betrekking tot de teratogeniteit van vitamine A, werd gekozen omdat voor het opstellen van een goed voorspellend extrapolatiemodel het wenselijk is tevens een dier van een andere orde mee te nemen.

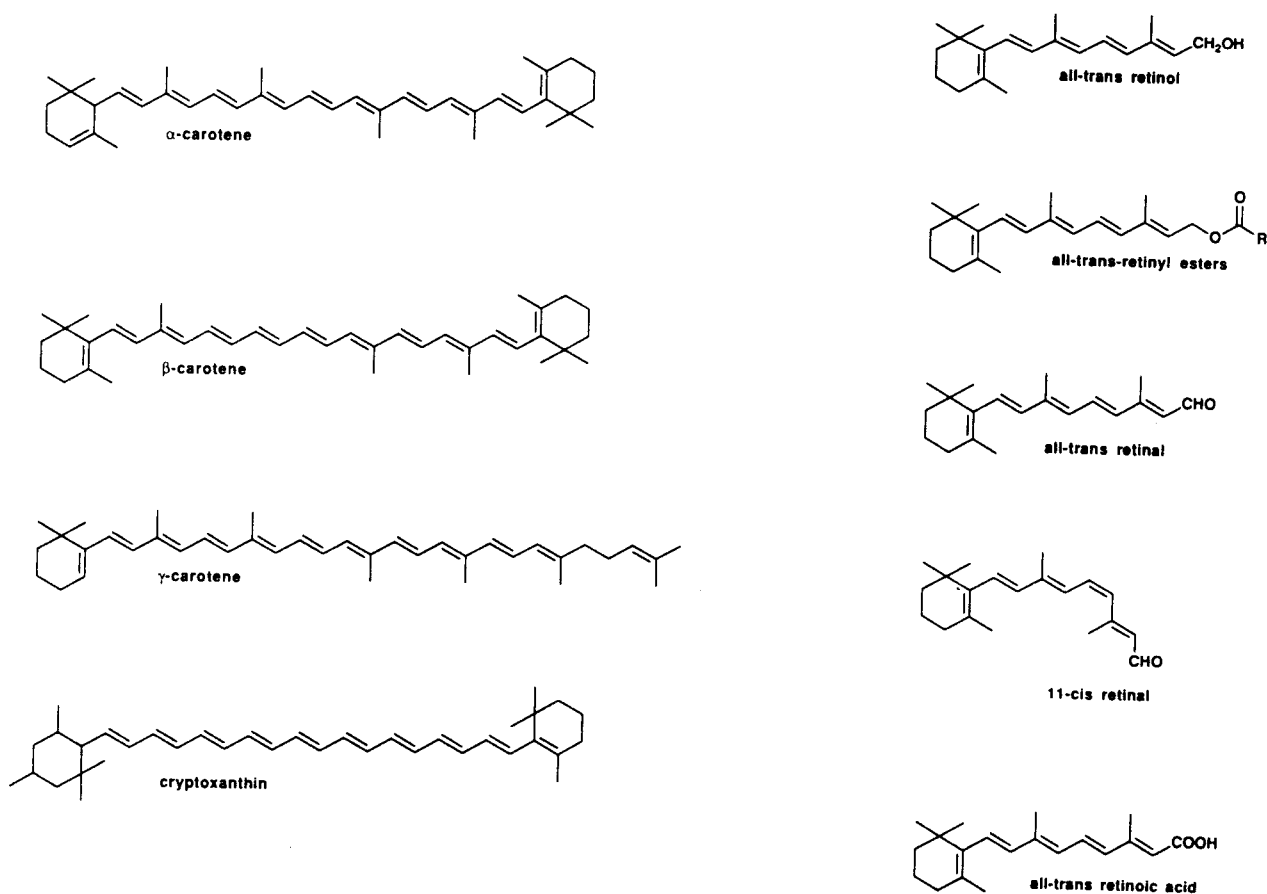
Bij bestudering van de literatuur werden zoveel mogelijk kengetallen verzameld met betrekking tot de genoemde proefdieren en de mens.

Aan de hand van deze literatuurstudie zal een concept extrapolatiemodel worden opgesteld en zullen voorstellen worden geformuleerd voor verder onderzoek.

2 ALGEMEEN

De term vitamine A wordt gebruikt om alle stoffen aan te duiden die de biologische activiteit vertonen van retinol (zie figuur 1). In het dieet komt vitamine A voor als zogenaamd 'preformed' vitamine A en als 'provitamine' A (carotenoïden). 'Preformed' vitamine A bestaat uit esters van retinol met een vetzuur (meestal palmitine-, stearine- of oleïnezuur) en komt voor in dierlijke producten. In plantaardige producten komt vitamine A voor als 'provitamine A' waarvan de belangrijkste vormen α , β , γ -caroteen en cryptoxanthine zijn. In vitaminepreparaten met vitamine A zijn retinylesters aanwezig.

Figuur 1. Structuurformules carotenoïden en retinoïden.



Omdat er veel verschillende stoffen zijn die vitamine A-activiteit vertonen, is er behoefte aan een eenduidige maat die niet afhankelijk is van de structuur (c.q. molecuulgewicht) van de betreffende verbinding. Ongelukkigerwijze zijn hier verschillende methoden voor in gebruik. In dit rapport wordt de eenheid RE, retinolequivalent, gebruikt. Een andere eenheid is de IE, internationale eenheid (eigenlijk IE_a en IE_c). In tabel 1 zijn de omrekeningsfactoren gegeven.

Tabel 1 Omrekeningsfactoren tussen de verschillende eenheden in gebruik voor vitamine A.

1 RE (retinolequivalent)	1 IE_a (int. eenheid voor vitamine A)	1 IE_c (int. eenheid voor provitamine A)
1 μg retinol	0,3 μg retinol	0,1 μg retinol
6 μg β -caroteen	1,8 μg β -caroteen	0,6 μg β -caroteen
12 μg gemengde carotenoiden	3,6 μg gemengde carotenoiden	1,2 μg gemengde carotenoiden
3,33 IE_a	0,3 RE	0,1 RE
10 IE_c	3 IE_c	0,33 IE_a

(naar: Olson, 1987).

2.1 Bronnen van grote hoeveelheden vitamine A.

Een voor de hand liggende bron van grote hoeveelheden vitamine A wordt gevormd door vitaminepreparaten. Dit is met name van belang daar deze preparaten vrij (zonder recept) verkrijgbaar zijn. In tabel 2 zijn de hoeveelheden vitamine A gegeven van preparaten die in Nederland zijn geregistreerd (dat wil zeggen: vallen onder de Wet op de Geneesmiddelenvoorziening), en waarvan de samenstelling bekend is. Registratie is overigens niet verplicht voor voedingssupplementen. Van andere preparaten, die bijvoorbeeld via drogisterijen, reformwinkels en sportscholen worden verkocht, zijn geen gegevens gepubliceerd, en deze middelen zijn daarom niet in tabel 2 verwerkt.

Tabel 2. Vitamine A bevattende specialités.

Preparaat	Aanbevolen dosis (RE/dag)	Indicatie zwangerschap vermeld?	Bij zwangerschap ontraden, of contra-indicatie ?
Dagravit	300	ja	nee
Gravitamon	300	ja	nee
Multitrim	300	ja	nee
Supradyn	1000	nee	ja
Totaforte	2400	nee	ja
Dagravit	1800	onduidelijk	nee
Dagravit Forte	15000	nee	ja
Davitamon A	15000	nee	ja
Davitamon A-D	400-570	nee	nee
Dohyfral	120	ja	nee
Lovitran	2217	onduidelijk	nee

(bron: *Repertorium 1992*).

Een andere bron van grote hoeveelheden vitamine A wordt gevormd door lever. In tabel 3 zijn gemiddelde vitamine A gehalten gegeven van diverse soorten lever. Binnen een diersoort varieert het vitamine A gehalte van de lever; dit is waarschijnlijk toe te schrijven aan verschillen in vitamine A gehalte van het voer (bijvoorbeeld alleen ruwvoer of bijvoeding met krachtvoer). Bij het bereiden van de lever (koken, bakken) gaat waarschijnlijk een deel van de aanwezige vitamine A verloren. In de Nederlands Voedingsmiddelentabel (NEVO-tabel) staat het gehalte vitamine A in gekookte runder- dan wel varkenslever vermeld als 60 respectievelijk 22 RE/g (per portie van 100 g dus 6000 respectievelijk 2200 RE).

Tabel 3 Vitamine A gehalte van diverse soorten rauwe lever van dieren afkomstig uit Nederland.

Diersoort	RE/g spreiding	RE/100 g gemiddeld
Rund	99 - 268	16560
Kalf	134 - 537	28440
Varken	92 - 220	16710
Kip	381 (n=1)	38100

(naar: Commission of the European Communities 1991).

2.2 Vitamine A behoefte van volwassenen.

De dagelijkse vitamine A behoefte is in Nederland vastgesteld door de Voedingsraad (Commissie Voedingsnormen) en vastgelegd in een advies, de Nederlandse Voedingsnormen. In de editie van 1989 wordt hierbij aangesloten bij de vigerende aanbevelingen voor volwassenen in de Verenigde Staten en in Canada: voor mannen 1000 RE/dag, voor vrouwen 800 RE/dag, voor zwangere vrouwen 1000 RE/dag en voor lacterende vrouwen 1250 RE/dag (Nederlandse Voedingsnormen 1989). Bij een gevarieerd dieet kan de dagelijkse vitamine A behoefte volledig gedekt worden door inname via het voedsel.

De aanbevolen dagelijkse vitamine A consumptie is afgeleid van de minimumbehoefte vitamine A zoals geschat door Sauberlich et al. (1974): 600 RE/dag voor volwassen mannen. Deze hoeveelheid bleek voldoende om vitamine A deficiëntieverschijnselen (zoals veranderingen van de huid, nachtblindheid, afwijkingen in het elektroretinogram) te voorkomen en het vitamine A gehalte in plasma op een niveau van minimaal 0,7 $\mu\text{mol/l}$ te handhaven. Van een adequaat niveau van inname van vitamine A wordt gesproken wanneer de voorraad vitamine A in de lever in stand wordt gehouden. Er zijn echter te weinig gegevens beschikbaar om het adequate niveau te kunnen berekenen uit de minimumbehoefte. Vandaar dat een tamelijk willekeurige opslag wordt toegepast: 400 RE/dag voor volwassen mannen (vanwege het geringere lichaamsgewicht van volwassen vrouwen valt de aanbeveling voor hen lager uit). De opslag van 200 RE/dag voor zwangere vrouwen is toereikend om ook aan de behoefte van de foetus te voldoen. De opslag van 450 RE/dag voor lacterende vrouwen is gebaseerd op het verlies aan vitamine A via de moedermelk.

2.3 Proefdieren.

De vitamine A behoefte van proefdieren is beschreven in de 'NAS-NRC' aanbevelingen (National Academy of Sciences, Committee on Animal Nutrition, National Research Council; Verenigde Staten). De NAS-NRC aanbevelingen beschrijven een acceptabel voer voor een normale groei, reproductie en lactatie. Voor de rat is de aanbeveling 600 RE/kg voer, voor de muis 150 RE/kg voer (National Academy of Sciences, 1972). Om dierexperimenten zoveel mogelijk te kunnen standaardiseren (ter bevordering van de vergelijkbaarheid van de resultaten) worden tevens aanbevelingen gedaan voor het te gebruiken commercieel voer (Bieri, 1977). Opvallend is dat deze voeders al meer vitamine A bevatten dan de NAS-NRC aanbeveling: NIH-7, een z.g. niet-geraffineerd voer, bevat 1815 RE/kg, en AIN-76TM, een z.g. semisynthetisch voer, bevat 1200 RE/kg. Het in Nederland verkrijgbare, niet-geraffineerde voer Standard Laboratory Rat Diet AM II (Hope Farms) bevat 4800 RE/kg.

3 DE KINETIEK VAN VITAMINE A.

Bij de bestudering van de lotgevallen van vitamine A, ingenomen met het voedsel of toegediend als zuivere stof, valt vooral de grote verscheidenheid aan betrokken bindingseiwitten op. Deze bindingseiwitten spelen niet alleen een rol bij het in oplossing houden van de relatief lipofiele verbindingen met vitamine A-activiteit in waterige milieu (plasma, celinhoud), tevens worden op deze wijze lichaamcellen beschermd tegen de cytotoxische effecten van (vooral) vrij retinol.

Hoewel er al vele jaren onderzoek wordt gedaan naar de kinetiek van vitamine A, blijken er toch nog witte vlekken te zijn. Deze zullen bij de hierna volgende bespreking van de lotgevallen van vitamine A (absorptie, metabolisme en distributie) worden aangegeven. Over de eliminatie van vitamine A zijn geen gegevens gevonden in de literatuur.

3.1 ABSORPTIE.

Vitamine A aanwezig in voedsel bestaat uit lipofiele verbindingen: esters van retinol met langketenige vetzuren, of carotenoïden. Voor de absorptie van deze verbindingen is allereerst een goede vetvertering en -absorptie in de darm van belang. Naast de absorptie van carotenoïden en retinylesters wordt ook de absorptie van een belangrijke retinolmetaboliet, retinoïnezuur, beschreven.

3.2 De absorptie van carotenoïden.

De mate van absorptie van carotenoïden uit plantaardig voedsel en na toediening als zuivere stof is niet in detail bekend, maar is in ieder geval niet volledig, <50% (Blomhoff et al., 1991, Goodman, 1966). Bij een hogere inname van carotenoïden met het voedsel blijkt de mate van absorptie te dalen (Bauernfeind, 1971; Olson, 1972). Het mechanisme van absorptie vanuit het lumen van de dunne darm naar de darmcellen verloopt waarschijnlijk via passieve diffusie (Hollander, 1978). De lagere absorptie bij hogere inname kan mogelijk worden verklaard door een relatief geringere vertering van aanwezige plantaardige celwanden in het lumen van de dunne darm. Toename van de hoeveelheid vet in het dieet bevordert de absorptie vanuit het maagdarmkanaal van deze verbindingen (Roels et al., 1958).

In de darmwandcellen worden de geabsorbeerde carotenoïden deels omgezet in retinol (Goodman, 1966). Bij de mens worden niet omgezette carotenoïden (9 - 17% van de totale dosis) afgegeven aan de lymfe (Goodman, 1966). Van de hoeveelheid in lymfe is 23 - 30% aanwezig als β -caroteen, terwijl de rest als retinylesters voorkomt (Goodman et al., 1966). Bij ratten kon na een orale dosis β -caroteen echter geen onveranderde stof in de lymfe worden aangetoond (Haug, 1965). Onderzoek met ratten heeft uitgewezen dat ook andere cellen dan die in de darmwand in staat zijn β -caroteen om te zetten in retinol (Bieri 1954; McGillivray, 1956). Het is aannemelijk dat dit ook bij de mens het geval zal zijn.

Tot recent werd aangenomen dat 1 molecuul β -caroteen door het β -caroteen-15-15'-dioxigenase werd omgezet in 2 moleculen retinal, welke via retinalreductase worden omgezet in retinol; in theorie ontstaan er dus uit 1 molecuul β -caroteen 2 moleculen retinol (Blomhoff et al., 1991). De biologische beschikbaarheid van retinol na orale inname van gemengde carotenoïden (zoals aanwezig in voedsel) wordt echter geschat op ongeveer 1/12 op gewichtsbasis. Na inname van het belangrijkste carotenoïde, β -caroteen, in zuivere vorm, wordt de biologische beschikbaarheid van retinol geschat op ongeveer 1/6 op gewichtsbasis. Op deze getallen zijn dan ook de conversiefactoren gebaseerd zoals gegeven in tabel 1.

Van carotenoïden zijn geen toxische doses beschreven, zelfs niet wanneer caroteen-rijke voedingsmiddelen (bijvoorbeeld tomatensap, wortelsap) of voedingssupplementen met β -caroteen in grote hoeveelheden worden geconsumeerd. Wel treedt bij een consumptie van meer dan 30 mg β -caroteen per dag een gele tot oranje verkleuring van de huid op, die echter reversibel is na beëindiging van de hoge inname (Micozzi, 1988).

3.3 De absorptie van retinylesters.

Absorptie van vitamine A na orale inname van retinylesters vindt alleen plaats na hydrolyse van de esters in het lumen van de dunne darm. Het pancreasenzym dat hiervoor verantwoordelijk wordt geacht is een niet-specifiek lipase, dat aangrijpt op een groot aantal verschillende esters: het cholesterol esterase (Goodman et al, 1984, Wolg, 1984). De allereerste stap in het absorptieproces van retinylesters is identiek aan die van vetten; de nauwe verwevenheid van de absorptie van vitamine A en vetten blijkt hieruit duidelijk.

Het retinol, gevormd uit 'preformed' vitamine A in het lumen van de dunne darm onder de invloed van pancreasenzymen, wordt geabsorbeerd door de cellen van de darmwand. Er wordt verondersteld dat retinol bij lagere concentraties (tot circa 150 nmol/l) wordt geabsorbeerd via gefaciliteerde diffusie, na binding aan een dragereiwit, maar bij hogere concentraties (450-2700 nmol/l) via passieve diffusie (Hollander, 1981). Mogelijk is bij de absorptie van retinol aangeboden in lagere concentraties een receptor betrokken (Said, 1989).

Nadat het retinol is opgenomen in de darmmucosa wordt het onder normale omstandigheden niet afgegeven aan het portale bloed maar na omzetting in retinylesters en inbouwning in chylomicronen afgegeven aan de lymfe. Bij experimenten met ratten waarbij de lymfe-absorptie was geblokkeerd bleek dat er ook afgifte aan het portale bloed optrad, zij het in geringe mate (Murray, 1961; Yeung, 1972).

De omzetting van retinol in retinylesters vindt in de enterocyten plaats door verestering met langketenige vetzuren. Hierbij zijn in de humane situatie de volgende percentages gevonden (Goodman et al., 1966):

retinylpalmitaat	53-60%
retinylstearaat	19-27%
retinyloleaat	10-16%
retinylinoleaat	6-9%

Zowel acyl-CoA-retinolacyltransferase (ARAT) als lecitineretinolacyltransferase (LRAT) mediëren deze verestering. Uit *in vitro* onderzoek, waarbij aan de microsomaal fractie uit de intestinale mucosa [³H]-retinol, palmitoyl-CoA en oleoyl-CoA werden toegevoegd, werd een hogere produktie van het palmitaat dan van het oleaat gevonden bij een pH-optimum van 7,1-7,6 (Helgerud et al., 1982).

In de humane mucosa werd de hoogste activiteit van LRAT en ARAT gevonden in het jejunum, maar ook in de andere delen van de dunne darm werd activiteit gemeten (Helgerud et al., 1983).

In ratten werd tevens gevonden dat de activiteit hoger was in de villuscellen dan in

de cryptcellen (Norum et al., 1983). In ratten die gevast hadden, was de activiteit hoger dan in controledieren (Helgerud et al., 1982). Na orale toediening van hoge doses vitamine A-palmitaat nam de intestinale ARAT-activiteit toe; in vitamine A-deficiënte ratten was de activiteit hoger dan in de controledieren (Rasmussen et al., 1984).

LRAT-activiteit werd gevonden in de intestinale mucosa, de lever en de retina (Zie review door Blomhoff et al., 1991). In de microsomale fractie van de dunne darm van de rat worden de esters in dezelfde ratio gevormd als in geïsoleerde rattechylomicronen en in lymfe. Proximaal werd de hoogste activiteit gevonden. Volgens Ong et al. (1987) is de verestering door LRAT effectiever wanneer retinol gebonden aan cellular retinolbinding proteins (CRBP-II) wordt aangeboden. De acyldonor is dan fosfatidylcholine. Alleen de 1-acyl-groep van lecithine wordt overgedragen aan retinol (MacDonald et al., 1988).

De theorie is dat de bijdragen van LRAT en ARAT afhankelijk zijn van de aangeboden dosis vitamine A. LRAT zou verantwoordelijk zijn voor de herverestering van fysiologische concentraties retinol, terwijl ARAT wordt ingezet bij de verestering van excessieve hoeveelheden retinol (Yost et al., 1988). De gevormde esters worden ingebouwd in triglyceriderijke absorptieve lipoproteïnen (chylomicronen). Chylomicronen bevatten triacylglycerolen, veresterd en niet-veresterd cholesterol, fosfolipiden, apolipoproteïnen, veresterd en niet-veresterd retinol, andere vetoplosbare vitaminen, en in sommige species carotenoïden. De vorming van chylomicronen vindt plaats in de enterocyten (Zie reviews Blomhoff et al., 1991; Hendriks, 1991).

De biologische beschikbaarheid van retinol na een orale dosis retinylester is niet bekend. In standaardwerken wordt over het algemeen geponoerd dat zowel de hydrolyse van retinylesters in het darmlumen als de absorptie van intraluminaal gevormd retinol volledig is. Er is wel enig onderzoek gedaan op het gebied van de absorptie van oraal toegediend radioactief gemerkt retinol: van de toegediende dosis radioactiviteit werd 37-48% teruggevonden in de lymfe van ratten (Fidge, 1968; Huang, 1965) en 21,5% in de lymfe van één vrouwelijke vrijwilliger (Goodman, 1966). Uitgaande van de (zeer beperkte) data betreffende de opslag van oraal toegediend vitamine A in de lever bij ratten en mensen kan een absorptie van minimaal 50% worden berekend (Bausch, 1977; Sauberlich, 1974). De invloed van de dosis retinylester op de biologische beschikbaarheid van retinol is eveneens niet bekend.

In de circulatie worden triacylglycerolen door lipoproteïne lipase (LPL) gehydrolyseerd. Dit enzym is hoofdzakelijk gelokaliseerd op het luminale oppervlak van capillair endotheelcellen, vooral in vet- en skeletspierweefsel. Vervolgens wordt

tijdens chylomicronenmetabolisme een aantal componenten overgedragen aan andere lipoproteïnen of celmembranen. Van retinylesters wordt aangenomen dat ze relatief slecht (<10%) vanuit chylomicronen overdraagbaar zijn. De restanten zijn chylomicronenremnants, welke door de lever uit het plasma worden verwijderd (Zie review Green and Glickman, 1981).

3.4 De absorptie van retinoïnezuur.

Retinoïnezuur komt niet voor in voedsel, maar wordt gebruikt in zalven voor dermale aandoeningen. Het wordt in het lichaam gevormd uit retinol en in de lever geconjugeerd.

Retinoïnezuur wordt geabsorbeerd via het poortadersysteem, niet via de lymfe (Fidge, 1968). Bij de rat is aangetoond dat retinoïnezuur en andere metabolieten van retinol met de gal worden uitgescheiden in het darmlumen, waarna enterohepatische recirculatie optreedt (Zachman, 1966). Over de mate van absorptie van retinoïnezuur zijn geen gegevens voorhanden.

3.5 Transport, metabolisme en opslag in de lever

(Zie reviews Blomhoff et al., 1991; Hendriks, 1991).

In de lever zijn vooral hepatocyten (parenchymcellen) en stellate cellen (fat-storing cells) betrokken bij het vitamine A metabolisme. Hepatocyten zijn vooral betrokken bij de verwerking van nieuw opgenomen retinylesters vanuit chylomicronenremnants, in de produktie van bindingseiwitten (retinol-binding proteins, RBP) en in de recycling van plasma RBP-gebonden retinol. In de stellate-cellen worden de retinylesters opgeslagen bij vitamine A-sufficiëntie. Deze cellen produceren tevens bindweefselcomponenten en kunnen ook betrokken zijn bij pathologische veranderingen waargenomen tijdens de ontwikkeling van leverfibrose. Bij de rat en de hond wordt meer dan 70% van de chylomicronenretinylesters opgenomen in de lever. De opname door hepatocyten van componenten van chylomicronenremnants is receptorgemedieerd. Het blijkt mogelijk te zijn dat de componenten uit de chylomicronenremnants, inclusief retinylesters, door de hepatocyten worden opgenomen, terwijl de remnant gebonden is aan receptoren op het celoppervlak. Opname kan direct plaatsvinden of na actie door plasmamembraangebonden enzymen. In het algemeen worden de chylomicronen zelf niet door de lever geklaard vanwege hun samenstelling of vanwege hun grootte (Windler and Havel, 1985; Scriver et al., 1989).

Na opname van retinylesters in de hepatocyt vindt eerst hydrolyse van de ester plaats gevolgd door herverestering voor opslag. Er zijn aanwijzingen dat hydrolyse

van palmitaatesters galzout-afhankelijk zijn, hoewel ook galzout-onafhankelijke hydrolases beschreven zijn (Harrison and Gad, 1989; Mentlein and Heymann, 1987). [³H]-retinol werd in de parenchymcellen terug gevonden, geassocieerd aan ruw endoplasmatisch reticulum (RER), Golgi-lichaampjes en verwante vesicles (Hendriks et al., 1988). Transport van retinol naar het RER kan theoretisch plaats vinden d.m.v. cellulaire bindingseiwitten (CRBP) of via vesicles (Gruenberg and Howell, 1989).

Retinol bindende eiwitten (RBP) zijn in hoge concentraties gevonden in glad endoplasmatisch reticulum (SER) en in ruw endoplasmatisch reticulum (RER) (Rask et al., 1983). Binding van retinol aan RBP verandert waarschijnlijk de RBP "signal patch", waardoor een translocatie plaats vindt van endoplasmatisch reticulum naar het Golgi-apparaat, gevolgd door secretie van het retinol-RBP complex uit de cellen. Het aanbod van retinol beïnvloedt op deze manier dus de verhouding RBP-secretie/RBP-degradatie (Alberts et al., 1989). Een aantal studies geeft aan dat retinol uit de parenchymcellen wordt geëxcreteerd gebonden aan RBP (Zie reviews Blomhoff et al., 1991; Hendriks, 1991). Transport van parenchym- naar stellate-cellen vindt niet plaats via het bloed. Na injectie van retinylester-gelabelde chylomicronen in deficiënte ratten vond er vrijwel geen cumulatie plaats in de stellate cellen. Dit kan er op wijzen dat er geen overdracht naar de stellate cellen plaats vond, of dat het retinol weer snel uit de stellate-cellen werd vrijgegeven.

Samenvattend suggereren de beschikbare data dat retinol in vitamine A-sufficiënte ratten snel wordt overgedragen van parenchymcellen naar stellate-cellen. Een deel verschijnt direct in het bloed. De opnamecapaciteit van de lever voor vitamine A is verzadigbaar. Wanneer en bij welke chronische of eenmalige belasting met vitamine A deze verzadiging optreedt is echter niet bekend.

Na injectie van retinol gebonden aan gelabeld palmitaat werd in stellate-cellen vrijwel niets van het gelabelde palmitaat gevonden, wat aangeeft dat in de parenchymcellen hydrolyse plaats vindt (Blaner et al., 1987; Blomhoff et al., 1988). Studies met antilichamen tegen RBP hebben aangetoond dat het paracriene transport van parenchymcellen naar stellate-cellen gemedieerd wordt door RBP (Blomhoff et al., 1988).

Endotheel- en Kupfercellen bevatten verwaarloosbare hoeveelheden retinol, 80 - 90% van het totale vitamine A in de lever bevindt zich in de stellate-cellen. Hiervan is ongeveer 98% veresterd. Alleen bij extreme deficiëntie bevatten de stellate-cellen relatief minder retinol (Zie reviews Blomhoff et al., 1991; Hendriks, 1991).

3.6 Verestering in de lever.

Hoge ARAT- en LRAT-activiteit in zowel parenchym- als stellate-cellen zijn beschreven (Blaner et al., 1990; Blomhoff et al., 1985). Ook hier gebruikt LRAT het vetzuur op de 1-positie van lecithine als acyldonor en CRBP-gebonden retinyl wordt als substraat gebruikt. De gevormde esters worden in vetdruppeltjes opgeslagen. Voor karakteristieken van de enzymen zie tabel 4 .

CRBP is in hoge concentraties aanwezig in de perisinusoidale stellate-cellen (Eriksson et al., 1984; Kato et al., 1984). In vitamine A-deficiënte ratten werden lagere CRBP-niveaus gemeten (Kato et al., 1985). Als de levervoorraden van retinol hoger zijn en CRBP-niveaus verhoogd zijn, wordt er meer van het in stellate-cellen opgenomen retinol door LRAT veresterd. Als CRBP verzadigd is zal ARAT in membranen retinol veresteren. Dit proces kan ook optreden als individuen met lage vitamine A voorraden matige hoeveelheden vitamine A tot zich nemen (Blomhoff et al., 1991).

Tabel 4 Verestering van retinol door ARAT en LRAT in verschillende weefsels (Blomhoff, 1991).

Weefsel	Enzymatische activiteit pmol/mg eiwit.min		Schijnbare K_m voor retinol, μM	
	ARAT	LRAT	ARAT	LRAT
dunne darm (mens)	3.400		20-30	
dunne darm (rat)	2.000	44	10-20	0,2
lever (mens)	370	16	20-40	0,5
lever (rat)	60	145	30-40	4
lever (kat)	60			
oog (rond)		100.000		
borstklier	400		30-40	
testis	4	20		

3.7 Mobilisatie uit de lever.

Retinylesters moeten gehydrolyseerd worden voor er mobilisatie van retinol uit de lever mogelijk is. De betrokken enzymen zijn zowel microsomaal als cytosolair (Harrison et al., 1979). De hydrolases bevinden zich in parenchym- en in stellate-

cellen (Blomhoff et al., 1985; Blaner et al., 1985; Hendriks et al., 1988). Mobilisatie van retinol uit de lever vindt plaats na koppeling aan het transporteiwit RBP. Meer dan 90% van het RBP in de lever bevindt zich in de parenchymcellen. Dit heeft geleid tot de hypothese dat de parenchymcellen hoofdzakelijk verantwoordelijk zijn voor mobilisatie. Er zijn echter aanwijzingen dat ook de stellate-cellen retinol, gebonden aan RBP, rechtstreeks in het bloed kunnen uitscheiden. Dit wordt ondersteund door het feit, dat ook uit de stellate-cellen in bijvoorbeeld de long, het retinol-RBP-complex gemobiliseerd kan worden (Wake, 1980).

Een deel van het retinol-RBP complex dat in het bloed circuleert wordt weer door de lever opgenomen, door zowel parenchym- als stellate-cellen (Blomhoff et al., 1985; Gjoen et al., 1987).

3.8 Retinoïnezuur vorming en metabolisme.

Aangenomen wordt dat retinoïnezuur verantwoordelijk is voor de teratogene effecten van vitamine A (Lammer et al., 1985; Geelen, 1979; Rosa et al., 1986). Retinoïnezuur werd voor het eerst gesynthetiseerd in 1946 (Arens en Van Dorp). Lang werd aangenomen, dat na orale toediening van retinoïnezuur weinig werd geabsorbeerd. Later werd echter duidelijk dat dit vooral toe te schrijven was aan tekortkomingen in de gevoeligheid van de analysemethoden. Verschillende experimenten zijn beschreven, waarin retinaldehyde werd toegediend, waarna retinoïnezuur kon worden gemeten in bloed, lever, darm, longen, nieren en milt van de rat. Het retinoïnezuur verdwijnt echter snel uit de weefsels (Deshmukh et al., 1965). Na intraduodenale injectie van retinaldehyde worden aanzienlijke hoeveelheden retinoïnezuur waargenomen in portaal bloed, wat er op wijst dat de vorming van retinoïnezuur plaats vindt in het darmlumen of in de darmmucosa. Concentraties retinoïnezuur in plasma van vastende vrijwilligers, die geen vitamine A supplementatie kregen, variëren van 2,7 tot 6,6 ng/ml (De Leenheer et al., 1982; Napoli et al., 1985).

Na toediening van retinylacetaat aan vitamine A-deficiënte ratten werden all-trans- en 13-cis-retinoïnezuur als metabolieten gevonden (Cullum and Zile, 1985).

Tevens kan retinoïnezuur gevormd worden na opname van retinol in doelorganen, deze omzetting vindt plaats in het cytosol. Ook kan retinoïnezuur rechtstreeks uit β -caroteen gevormd worden zonder dat hierbij retinol of retinal als tussenprodukt noodzakelijk zijn. Bepalend voor de lokale intracellulaire retinoïnezuurconcentratie zou kunnen zijn: de cellulaire opname van retinoïden, de snelheid van retinoïdsynthese of- degradatie, of de hoeveelheid beschikbaar cellulair retinoïnezuur bindend eiwit (CRABP). Een alternatieve mogelijkheid is dat het retinoïnezuur

niveau niet gereguleerd is en dat de meeste cellen een overmaat retinoïnezuur bevatten. In dat geval zullen de bindingseiwitten en nucleaire receptoren de response bepalen (Zie review Blomhoff et al., 1991).

4 DISTRIBUTIE.

De distributie van vitamine A naar de doelorganen wordt verondersteld plaats te vinden via de lever. Onder normale omstandigheden worden chylomicronenremnants snel geklaard door voornamelijk de lever (in mindere mate door beenmerg en milt, in zeer geringe mate door de overige organen), en neemt de lever in eerste instantie vrijwel alle in de darmwand geabsorbeerde en aan de lymfe afgegeven retinylesters op. Distributie naar andere organen dan de lever vindt vervolgens plaats na afgifte door de lever. Deze distributie wordt in hoge mate gereguleerd door bindingseiwitten. Na een hoge orale dosis vitamine A (in de vorm van retinylesters) kunnen de concentraties retinylesters in plasma echter enige uren sterk verhoogd blijven; mogelijk is dan de directe distributie vanuit chylomicronremnants naar de doelorganen (buiten de regulatie door bindingseiwitten om) van belang.

In zoogdieren zijn een aantal bij de distributie van vitamine A betrokken bindingseiwitten zeer goed beschreven. In dit rapport worden de eiwitten die betrokken zijn bij de verwerking van visuele signalen niet besproken: die komen alleen voor in de retina van het oog en zijn voor de distributie van vitamine A over andere organen van geen belang. Een overzicht van de belangrijkste bindingseiwitten zijn gegeven in tabel 5.

Tabel 5. Overzicht van de belangrijkste retinoïdenbindende eiwitten.

Naam	RBP	CRBP(1)	CRBP(2)	CRABP
Mol. gewicht	21.000	14.600	16.000	14.600
Komt voor in:	plasma en alle weefsels	alle cellen	darmwand	alle cellen
Ligand	retinol	retinol	retinol	retinoïnezuur

(naar Ong, 1985).

In plasma is tot nu toe slechts één specifiek retinoïdenbindend eiwit aangetoond: het retinol-bindend eiwit of RBP (retinol-binding protein). Vanuit interstitiële vloeistof zijn echter nog wel enige andere retinoïdenbindende eiwitten geïsoleerd; van deze eiwitten wordt verondersteld dat de functie vergelijkbaar is met die van RBP in

plasma, maar dan voor lokaal transport van cel tot cel. Het betreft verschillende retinolbindende eiwitten uitgescheiden door endometriumweefsel, zoals aangetoond bij het varken na toediening van progesteron (Clawitter, 1990), die mogelijk betrokken zijn bij het transport van retinol van matернаal bloed naar de foetus. Verder zijn nog twee retinoïnezuurbindende eiwitten geïsoleerd uit het lumen van de epididymi van de rat (Ong, 1988).

Intracellulair zijn verschillende retinoïdenbindende eiwitten aangetoond: op te splitsen in retinolbindende eiwitten (CRBPs; cellular retinol-binding proteins) en retinoïnezuurbindende eiwitten (CRABPs; cellular retinoic acid-binding proteins). CRBP(I) en CRABP(I) zijn de belangrijkste retinoïdenbindende eiwitten in de meeste weefsels. CRBP(II) is aangetoond in hoge concentraties in de cellen van de darmwand (betrokken bij absorptie) van zowel de rat als de mens (Ong, 1984; Ong, 1987). Bij de rat bestaat ongeveer 1% van het oplosbare eiwit dat wordt geëxtraheerd uit de darmmucosa uit CRBP(II). Bij de volwassen rat is CRBP(II) in geen enkel ander weefsel aangetoond, echter wel in embryonaal lever- en longweefsel. Recent zijn ook twee verschillende nieuwe CRABPs aangetoond, die wel allebei CRABP(II) zijn genoemd: één in pasgeboren ratten en één in weefsel van kippe-embryo's; het CRABP(II) in kippe-embryo's kon niet worden aangetoond in weefsels van volwassen kippen (Bailey, 1988; Kitamoto, 1989).

Retinol Binding Protein (RBP).

In plasma van nuchtere personen en ratten komt retinol alleen voor gebonden aan RBP, in molaire ratio retinol:RBP = 1:1. Retinol-RBP wordt ook wel holo-RBP genoemd. In plasma van nuchtere dieren en mensen is altijd een overmaat RBP aanwezig (apo-RBP). De dissociatieconstante van retinol-RBP in de rat is ongeveer $1,9 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$ (Cogan, 1976). *In vitro* vertoont RBP affiniteit voor retinol, retinal en retinoïnezuur, maar niet voor retinylesters, voor α -retinol of voor apo- β -carotenoïden. *In vivo* wordt alleen retinol-RBP waargenomen; retinoïnezuur komt in plasma voor gebonden aan albumine (vergelijkbaar met het transport van vrije vetzuren).

RBP is een relatief klein eiwit (zie tabel 4); daarom zou het via glomerulaire filtratie in de nieren kunnen worden geklaard. In plasma komt RBP (zowel holo-RBP als apo-RBP) echter voor als complex met het veel grotere eiwit transthyretine (TTR, vroeger ook wel pre-albumine genoemd). TTR is in molaire overmaat aanwezig in plasma ten opzichte van RBP. De associatie-constante van het complex RBP:TTR is ongeveer $1,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ voor de mens en ongeveer $8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ voor de rat (Muto, 1982).

Normaalwaarden voor nuchter humaan plasma zijn retinol 1,2-1,7 $\mu\text{mol/l}$;

RBP 40-50 $\mu\text{g/ml}$, TTR 200-300 $\mu\text{g/ml}$. Mannen hebben gemiddeld een hogere retinol plasmaspiegel dan vrouwen; dit kan mogelijk verklaard worden uit het feit dat de circulerende spiegels van RBP (en TTR) voor mannen hoger zijn. Smith et al. vonden RBP 57 en 42 $\mu\text{g/ml}$, TTR 263 en 238 $\mu\text{g/ml}$, voor respectievelijk mannen en vrouwen (Smith, 1970). Bij de rat worden vergelijkbare retinolspiegels in plasma of serum waargenomen als bij de mens (ongeveer 1,6 $\mu\text{mol/l}$). RBP spiegels in de rat zijn vergelijkbaar met die van de mens, gemiddeld 40-50 $\mu\text{g/ml}$ (Muto, 1972; Smith, 1975). In geval van hypervitaminose A (bij de mens) is naast de plasma retinolspiegel ook de RBP-spiegel verhoogd, maar in geringere mate, zodat de verhouding retinol:RBP groter wordt dan 1 (Smith, 1976).

RBP komt niet alleen voor in plasma, maar ook in alle onderzochte weefsels (Smith, 1975). Bij de rat zijn in de lever gehalten van gemiddeld 30 $\mu\text{g/g}$ gevonden, voornamelijk geassocieerd met het endoplasmatisch reticulum. In de nieren was het gehalte gemiddeld 150 $\mu\text{g/g}$, voornamelijk aanwezig in het cytosol. Gehaltes in vetweefsel, hersenen, ogen, speekselklieren, thymus, longen, hart, darmen, milt, bijnieren, testes, schildklier en erythrocyten waren laag. In vitamine A-deficiënte ratten werden in serum en organen lagere RBP spiegels gevonden dan in controle-dieren (ongeveer 9 $\mu\text{g/ml}$ in serum respectievelijk 30 $\mu\text{g/g}$ in de nieren), terwijl het RBP-gehalte in de lever hoger bleek (ongeveer 90 $\mu\text{g/g}$). RBP wordt aangemaakt in de lever en deze synthese wordt niet beïnvloed door vitamine A deficiëntie: zowel de mRNA-spiegels als de synthesesnelheid zijn vergelijkbaar in vitamine A-deficiënte ratten en controle dieren (Soprano, 1982; Soprano, 1986). Wel is waargenomen dat vitamine A-deficiëntie het intracellulaire transport van RBP van het endoplasmatisch reticulum naar het Golgi-apparaat blokkeert, waardoor de secretie van RBP door de lever wordt tegengegaan (Harrison, 1980; Rask, 1983). Wanneer vitamine A-deficiënte ratten worden gerepleerd met vitamine A (i.v. injectie van chylomicronen) treedt een snelle stijging van zowel serum retinol als serum RBP op, waarbij de RBP-leverspiegels overeenkomstig dalen (Smith, 1973; Smith, 1979). Tevens werd aangetoond dat deze stijging van de RBP-serumspiegel het gevolg is van de afgifte door de lever van reeds aanwezig RBP.

Voor de rat is de halfwaardetijd van RBP ongeveer 6,5 uur, met een synthese-capaciteit van ongeveer 1,5 mg/dag/100 g lichaamsgewicht (Peterson, 1974). Voor de mens is de halfwaardetijd ongeveer 11,5 uur en de synthese-capaciteit ongeveer 190 mg/dag/m² lichaamsoppervlak (Valquist, 1973). Wanneer ratten op een deficiënt voer worden gezet, daalt de levervoorraad vitamine A vrijwel lineair met de tijd naar een verwaarloosbaar lage hoeveelheid in ongeveer 20 dagen (Muto, 1972). Serum retinolspiegels dalen eveneens ongeveer lineair met de tijd, van

ongeveer 1,6 tot ongeveer 0,2 $\mu\text{mol/l}$ in 25 dagen. Ook het serum RBP gehalte daalt, van ongeveer 50 naar ongeveer 15 $\mu\text{g/ml}$, maar hierbij wordt een lagtime van ongeveer 10 dagen waargenomen.

De spiegels van TTR in plasma en weefsels worden niet beïnvloed door vitamine A deficiëntie, dit in tegenstelling tot de spiegels van RBP (Navab, 1977).

De opname van retinol en retinoïnezuur is *in vitro* onderzocht met behulp van retina-epitheelcellen. Hierbij bleek dat opname van retinol in de cel bij aanbieden van holo-RBP (plasma) gepaard gaat met binding aan RBP-receptoren. Na dissociatie van het retinol-RBP complex wordt het retinol opgenomen in de cel, maar het RBP niet. Het aanbieden van vrij retinol gaf geen cellulaire opname. Het aanbieden van retinoïnezuur gebonden aan albumine (zoals het ook voorkomt in plasma) leidde eveneens níét tot opname van retinoïnezuur in de cellen. Werd echter retinoïnezuur aangeboden gebonden aan RBP, dan trad wèl opname van retinoïnezuur op.

Cellular Retinol Binding Protein (CRBP).

CRBP is aangetoond in alle onderzochte cellen, waar het voorkomt in het cytosol. Het eiwit is identiek in alle weefsels en vertoont slechts geringe speciesverschillen (Ong, 1985). Het ligand voor CRBP is retinol; de dissociatieconstante van CRBP geïsoleerd uit rattelever is ongeveer $1,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (Ong, 1978). CRBP vertoont eveneens affiniteit voor α -retinol, maar niet voor retinal of retinoïnezuur (Bashor, 1973). CRBP is verzadigd met retinol bij een ratio 0,87 mol retinol per mol CRBP (Saari, 1987). In tabel 5 wordt een overzicht gegeven van CRBP concentraties in weefsels van de rat zoals gevonden door Blaner et al. (1986). Ook Adachi et al (1981) vonden de hoogste gehalten CRBP in lever, nieren en testes. Kato et al. (1985) onderzochten zowel vitamine A deficiënte ratten als controle dieren. In controle dieren werden de hoogste CRBP-gehalten gevonden in lever en nieren, gevolgd door, in afnemende concentratie, longen, lymfeklieren, ogen, milt, dunne darm. In de mannelijke geslachtsorganen nam de concentratie af van centraal naar distaal: proximale epididymi, testes, distale epididymi, prostaat, vas deferens, zaadblaasjes. Het gehalte in de vrouwelijke geslachtsorganen was 7-9 $\mu\text{g/g}$, in volgorde van hoog naar laag, net als bij de mannelijke geslachtsorganen van centraal naar distaal: eierstokken, eileiders, uterus. In vitamine A deficiënte dieren was het CRBP-gehalte gedaald met 8 tot 55%, de sterkste daling werd waargenomen in lever en nieren. In retinol-deficiënte, maar retinoïnezuur-gesupplementeerde ratten bleken de CRBP-spiegels in de diverse onderzochte organen niet te verschillen van die van controleratten, met uitzondering van een daling met ongeveer 70%

in de proximale epididymi (Blaner, 1986).

Cellular Retinoic Acid Binding Protein (CRABP).

CRABP is qua aminozuurcompositie vergelijkbaar met CRBP, maar niet identiek (Saari, 1978). CRABP is aangetoond in alle onderzochte cellen, voornamelijk in het cytosol. Het ligand voor CRABP is retinoïnezuur; CRABP vertoont geen affiniteit voor retinol of retinal (Ong, 1978). De dissociatieconstante van CRABP voor retinoïnezuur is bepaald door verschillende onderzoekers: ze vonden een waarde van ongeveer $2,3 \times 10^{-8}$ M (Sani, 1977), of $4,2 \times 10^{-9}$ M (Ong, 1978). CRABP is verzadigd met retinoïnezuur bij een ratio 0,20 mol retinoïnezuur per mol CRABP (Saari,). In tabel 6 wordt een overzicht gegeven van CRABP concentraties in weefsels van de rat zoals gevonden door Blaner et al. (1986). De hoogste gehalten werden gevonden in de huid en in de mannelijke geslachtsorganen. In retinol-deficiënte, maar retinoïnezuur-gesuppleerde ratten waren de CRABP-gehalten in de diverse onderzochte weefsels vergelijkbaar (Blaner, 1986). Zowel in mannelijke als in vrouwelijke geslachtsorganen bleek het verloop van de CRABP-concentraties van hoog naar laag precies tegengesteld te lopen aan die van CRBP: de hoogste CRABP-gehalten werden nu distaal waargenomen (Kato, 1985). De gehalten CRABP worden mogelijk hormonaal gereguleerd: in de melklieren van zwangere ratten (dag 1-5) worden hogere concentraties CRABP gevonden dan in niet-zwangere ratten en lacterende ratten (Mehta, 1981). Een dagelijkse injectie met oestrogenen geeft ook in deze ratten CRABP-gehalten vergelijkbaar met die gevonden in zwangere ratten.

Tabel 6. Gehaltes ($\mu\text{g/g}$) aan retinolbindende eiwitten gemeten in weefsels van mannelijke ratten (gemiddelde \pm s.d., $n=6$).

Orgaan	CRBP	CRABP
lever	$52,5 \pm 21,9$	$1,5 \pm 0,5$
nieren	$57,0 \pm 16,2$	$2,2 \pm 1,0$
longen	$20,6 \pm 9,7$	$0,5 \pm 0,1$
lymfeklieren	$15,4 \pm 3,4$	$7,6 \pm 4,8$
oog	$11,0 \pm 6,3$	$3,1 \pm 1,5$
milt	$6,4 \pm 2,3$	$1,1 \pm 0,4$
dunne darm	$10,2 \pm 2,8$	$2,3 \pm 1,5$
bijnieren	$5,7 \pm 2,3$	$1,3 \pm 0,8$
thymus	$4,1 \pm 1,8$	$3,5 \pm 1,9$
hersenen	$4,4 \pm 3,4$	$3,1 \pm 1,4$
maag	$4,4 \pm 1,7$	$2,3 \pm 1,5$
huid	$1,8 \pm 0,7$	$23,1 \pm 12,0$
pancreas	$2,1 \pm 0,5$	$0,3 \pm 0,1$
vetweefsel	$0,8 \pm 0,5$	$0,1 \pm 0,0$
spierweefsel	$1,7 \pm 1,4$	$0,2 \pm 0,1$

(bron: Blaner, 1986)

5 TERATOGENITEIT

5.1 Teratogeniteit bij de mens.

Aangeboren afwijkingen bij de mens als gevolg van vitamine A zijn bekend geworden door gebruik van preparaten met hoge doseringen vitamine A (>25.000 IU/dag = 7.500 RE) tijdens de zwangerschap. Rosa et al (1986) geven een overzicht van de 18 gevallen die tot dan toe beschreven waren. De meest voorkomende defecten betreffen het oor, het aangezicht, en het gehemelte. Daarnaast zijn afwijkingen aan hart, nieren, centraal zenuwstelsel, oog, darmkanaal, en extremiteiten beschreven. In de meeste gevallen was er sprake van dagelijkse blootstelling gedurende een groot deel van de zwangerschap. De kritieke fase voor het ontstaan van vitamine A-geïnduceerde congenitale misvormingen ligt tussen week 2 en week 5 na de bevruchting (Rosa et al, 1986).

5.2 Teratogeniteit bij proefdieren.

Proefdieren vertonen een spectrum van aangeboren afwijkingen welke vergelijkbaar is met die bij de mens (tabel 7). Bij de rat, de species waarvan het aantal studies met orale blootstelling aan retinol het grootst is, treden exencephalie en anophthalmie/microphthalmie het meest op de voorgrond. Bij de muis komt vaak gespleten gehemelte voor naast misvormingen van het centraal zenuwstelsel. De meeste studies met muizen zijn gedaan met de minder relevante intraperitoneale blootstellingsroute, waarbij directe diffusie van de plaats van toediening naar het embryo mogelijk is. Verder is het gehemelte bij de muis in het algemeen een gevoelige parameter voor teratogeniteit. Studies met hamster en konijn zijn gering in aantal en richten zich in de meeste gevallen op één of enkele teratogene effecten.

5.3 Gevoelige periodes.

De gevoeligheid voor retinol is bij mens en dier het grootst tijdens de organogenese (tabel 8). In deze periode vormt zich de neurale buis, worden oog en oor aangelegd, ontstaan de kieuwbogen die het aangezicht vormen, segmenteert het embryo door de vorming van somieten, migreren cellen uit de neurale wallen (neural crest) en dragen onder meer bij aan de vorming van perifere ganglia en aangezicht. Aansluitend ontstaan de pootknoppen waaruit de extremiteiten zich vormen. De organogenese eindigt met de sluiting van het gehemelte. Bij de mens beslaat de gevoelige periode week 2 tot week 5 van de embryogenese (Rosa, 1986; Langman, 1963), wat bij de rat overeenkomt met dag 9 tot 11 na de bevruchting. Bij muis en konijn ligt deze fase ongeveer een dag eerder dan bij de rat

(Mizutani, 1966), terwijl deze bij de hamster circa 2 dagen eerder optreedt (Biesalski, 1989). De gevoeligheid van orgaansystemen is gefaseerd binnen deze periode. Zo zullen neuraalbuisdefecten in het algemeen in een vroeger stadium veroorzaakt worden dan afwijkingen aan de extremiteiten.

Tabel 7 Vergelijkende teratologie van Vitamine A

Orgaan	mens	rat	muis	hamster	konijn
oor	++	+	+	+	+
aangezicht	++	+	+	+	+
gehemelte	++	+	++		
centraal zenuwst.	+	++	+	++	+
oog	+	++	+		
skelet/extremit.	+	+	+	+	+
circulatie	+		+	+	
urogenitaal	+	+	+	+	
darm	+	+	+	+	
long			+	+	

+: orgaansystemen waarvoor teratogene effecten van retinol beschreven zijn
 ++:relatief gevoelig orgaansysteem voor de betreffende diersoort
 referentie mens: Rosa et al 1986, overig: Geelen 1979, Biesalski 1989.

5.4 Laagste effectieve doseringen.

De gevoeligheid van de mens voor het ontstaan van congenitale misvormingen als gevolg van blootstelling aan retinol is veel groter dan die van proefdieren (tabel 8). Terwijl bij de mens doseringen vanaf ca. 0,12 mg/kg/dag oraal effectief zijn (Rosa et al, 1986), wordt bij de muis vanaf 3 mg/kg/dag intraperitoniaal het bij deze diersoort gevoelige gehemelte aangedaan, en treden de eerste effecten bij hamster en rat op vanaf 30 resp. 50 mg/kg/dag oraal in de vorm van met name exencephalie. In genoemde studies heeft blootstelling plaatsgehad tijdens de gevoeligste fase van de organogenese. Bij het konijn zijn gevoeligste parameter en gevoeligste blootstellingsfase niet goed uitgezocht. Mizutani (1966) beschrijft skeletafwijkingen

na blootstelling van konijnen op dag 10 na de bevruchting aan zeer hoge intraperitoneale doseringen retinol. De relevantie voor dit projekt van studies die gebruik maken van een niet-orale route is overigens beperkt, vanwege belangrijke verschillen in kinetiek.

Tabel 8. Laagste effectieve doseringen Vitamine A voor structurele afwijkingen.

Species	Dosering	Tijd na bevruchting	Parameter
mens (60 kg)	8000 RE/dag p.o. = 0,12 mg/kg.dag	wk 2 - 5	craniofaciaal
muis (20 g)	3300 RE/kg.dag i.p. = 3 mg/kg.dag	dag 9	gehemelte
hamster (100 g)	30.000 RE/kg.dag p.o. = 30 mg/kg .dag	dag 8	exencephalie
rat (200 g)	50 mg/kg.dag p.o.	dag 9 - 11	exencephalie

5.5 Mechanisme van teratogeniteit.

Veel van de congenitale afwijkingen veroorzaakt door retinol kunnen verklaard worden door remming van de migratie van neural crest cellen (Lammer, 1985). Deze cellen migreren vanuit de neurale wallen door het mesenchym, en leveren belangrijke bijdragen bij de vorming van craniofaciale structuren als hersenen, oog, oor en boven- en onderkaak, maar ook aan hart en thymus. Retinoïnezuur accumuleert in het embryo in neurale en neural crest cellen (Dencker et al 1987). Skeletafwijkingen, waaronder gefuseerde ribben en misvormde extremiteiten, die in een iets latere fase veroorzaakt worden, ontstaan mogelijk door een verstoring van de interne weefselconcentraties van retinoïnezuur. Gradienten van retinoïnezuur zijn betrokken bij de inductie van geprogrammeerde celdood en differentiatie van kraakbeen, been en epithelia (Kistler, 1985).

5.6 Keuze van diersoort voor verder onderzoek.

Er zijn verschillende argumenten om voor de rat te kiezen als het gaat om nader

(kinetisch) onderzoek. Het aantal studies waarin de effecten van retinol na orale toediening worden beschreven is het grootst voor de rat. De rat is het meest gebruikte proefdier in toxicologie en teratologie, waardoor veel historische gegevens beschikbaar zijn. De eindpunten van teratogeniteit liggen zowel bij de mens als bij de rat in het craniofaciale gebied, hoewel bij de mens aangezichtsafwijkingen domineren en bij de rat exencephalie en oogafwijkingen.

5.7 Kinetische factoren.

Tijdens de gevoelige fase is er noch bij de mens, noch bij genoemde diersoorten sprake van een functionele placenta. De trophoblast, die het embryo omgeeft, groeit in deze periode uit in de vorm van villi, die penetreren in het maternale deciduaweefsel. Aan beide zijden ontstaat een intensief netwerk van bloedvaten, waardoor bij de mens in de loop van week 5 tot 16 en bij de rat op dag 12 en 13 de placentafunctie zich ontwikkelt. Voor die tijd is het embryo (bij de mens in week 5 ca. 5-8 mm lang) voor voeding afhankelijk van de dooierzak. Exogene stoffen kunnen het embryo bereiken via chorion, amnion, en dooierzak.

Een belangrijk anatomisch verschil tussen mens en knaagdier is de positie van de dooierzak. Het menselijk embryo ligt in amnion en chorion, maar buiten de dooierzak, die via de toekomstige navelstreng met het embryo in verbinding staat. Bij knaagdieren ligt het embryo in (van binnen naar buiten) amnion, dooierzak, en chorion. Het is onduidelijk in hoeverre de dooierzak bij knaagdieren een functionele extra barriere vormt voor de passage van exogene stoffen.

De zwangerschap heeft consequenties voor maternale microsomale leverenzymen. Bij de mens neemt de activiteit van deze enzymen tijdens de zwangerschap toe, terwijl deze bij de rat afneemt tot de helft. Daar staat weliswaar tegenover, dat de rattelever met 40% in omvang toeneemt, maar dit resulteert toch in een verminderde leverenzymactiviteit bij de rat tijdens de dracht (Mihaly en Morgan, 1984).

De metaboliet die verantwoordelijk wordt geacht voor de teratogene effecten van retinol is het all-trans-retinoïnezuur ofwel tretinoïne. Deze metaboliet ontstaat uit retinol via retinal. Deze omzetting vindt alleen plaats uit vrij retinol, dat niet gebonden is aan eiwitten (RBP). Retinoïnezuur passeert gemakkelijk naar het embryo (Creech Kraft et al, 1987), en veroorzaakt een met retinol vergelijkbaar spectrum van congenitale misvormingen bij muis (Creech-Kraft et al, 1987), rat (Kistler, 1981), aap (Fantel et al, 1977) en hamster (Shenefelt, 1972). Bij de mens veroorzaakt 13-cis-retinoïnezuur of isotretinoïne een vergelijkbaar patroon van congenitale afwijkingen (Lammer et al, 1985). Het is niet duidelijk of andere retinolmetabolieten een rol spelen in de teratogeniteit van vitamine A (Biesalski, 1989).

DISCUSSIE

Bij de bestudering van de literatuur met betrekking tot de kinetiek van vitamine A valt direct op hoe complex deze is. Het lichaam heeft voor dit soort stoffen een adequaat regelmechanisme ontwikkeld voor de instandhouding van de benodigde hoeveelheden en voor de bescherming van het organisme tegen deze stoffen. Zo blijkt dat bij normale dagelijkse inname van vitamine A er nagenoeg geen vrije componenten (retinol, retinoïnezuur) van vitamine A in het lichaam voorkomen. In de eerste plaats wordt nagenoeg alle vitamine A opgeslagen in de lever en komt slechts in kleine hoeveelheden hieruit vrij. Datgene wat vrijkomt is dan nog gebonden aan eiwitten. De hoeveelheid bindingseiwitten is afhankelijk van de synthese van deze eiwitten welke via een positief terugkoppelingsmechanisme gebonden is aan het aanbod van vitamine A.

Om een onderbouwd extrapolatiemodel te ontwikkelen voor de risicoschatting van vitamine A, dienen de lotgevallen van de stoffen die bij het effect betrokken zijn zoveel mogelijk bekend te zijn om na te kunnen gaan welke processen van belang zijn en welke processen nog nader onderzoek behoeven. Tevens is het van cruciaal belang de samenhang tussen de verschillende processen te kennen, i.c. zijn er processen die elkaar positief dan wel negatief beïnvloeden?

Uit de literatuur blijkt dat vooral retinol en retinoïnezuur verantwoordelijk worden geacht voor de teratogene effecten. De discussie zal zich daarom vooral richten op de vorming en de lotgevallen van deze twee stoffen en de interspecies verschillen voor deze processen. De discussie zal de hoofdstukken zoals in het rapport volgen.

Absorptie.

Mechanistisch zijn de processen die bij de absorptie van vitamine A een rol spelen goed onderzocht in proefdieren. Bekend is hoe de stoffen uit het maagdarmkanaal worden opgenomen, welke enzymen er betrokken zijn bij de hydrolyse en de daaropvolgende verestering en wat het transsportmechanisme vanuit de enterocyten van de darmwand via lymfe naar de lever is. Toch is een aantal gegevens met betrekking tot de absorptie, die noodzakelijk zijn voor het uitvoeren van een goede risicoschatting, nog onbekend of in ieder geval door ons niet in de literatuur gevonden. Daar is in de eerste plaats de biologische beschikbaarheid: welk gedeelte van de dosis bereikt de systemische circulatie? Voor retinylesters, zoals die in dierlijke produkten en in vitaminepreparaten voorkomen, wordt de biologische beschikbaarheid geschat op ca 50%. Onderzoek hiernaar is echter niet in de litera-

tuur gevonden. Tevens is het niet bekend of de vorm waarin vitamine A wordt geconsumeerd invloed heeft op deze biologische beschikbaarheid. Na inname van carotenoïden wordt slechts 8% (op gewichtsbasis) als retinol teruggevonden in de algemene circulatie. Ook is niet bekend of de absorptie lineair verloopt, d.w.z. geeft een twee maal zo hoge dosis ook twee maal hogere concentraties in de algemene circulatie. Het is niet uit te sluiten dat bij hoge doseringen niet alle geabsorbeerde vitamine A via het in dit rapport beschreven mechanisme wordt opgenomen. Door verzadiging van de bij dit proces betrokken enzymen, zou ook een gedeelte van de dosis rechtstreeks, via de poortader, naar de lever kunnen gaan. Aangenomen wordt dat de hierboven beschreven processen bij alle onderzochte species (rat, konijn, hamster, mens) volgens hetzelfde principe verlopen, doch over verschillen in snelheden en capaciteiten tussen de species is nagenoeg niets bekend.

Transport, metabolisme en opslag in de lever.

De bij het transport en bij de opslag in de lever van retinol en retinoïnezuur betrokken processen zijn in de literatuur goed beschreven. Vooral de hierbij betrokken bindingseiwitten, zowel extra- als intracellulair, zijn in verschillende species uitgebreid onderzocht en gekarakteriseerd. Over de opslagcapaciteit van de lever is echter weinig bekend. Indien experimenten met betrekking tot de kinetiek en de effecten van vitamine A worden uitgevoerd is de vitamine A status uitermate belangrijk voor de vraag wanneer de opslag in de lever is verzadigd en wat men kan verwachten na verzadiging met betrekking tot de blootstelling van het doelorgaan aan retinol of retinoïnezuur.

Distributie

Na afgifte door de lever wordt retinol, gebonden aan Retinol Binding Protein (RBP) door het bloed getransporteerd naar de doelorganen. Het al of niet opnemen van retinol in andere organen dan de lever is gekoppeld aan het voorkomen van bindingseiwitten in de cellen van die organen. Over de verdeling van deze bindingseiwitten, zowel voor retinol als retinoïnezuur is vrij veel bekend bij proefdieren (concentraties en dissociatieconstanten). Echter wat er na de opname in de cellen van organen met het aangeboden retinol of retinoïnezuur verder gebeurt, zoals het katabolisme, is niet bekend. Dit betekent dat voor de verschillende species niet bekend is waaraan het doelorgaan (het embryo) wordt blootgesteld noch bij chronische belasting, noch bij een eenmalige belasting.

Teratogeniteit

Zoals reeds vermeld is het effect waarop wij ons in dit literatuurrapport hebben geconcentreerd, het teratogene effect. Verondersteld wordt dat het teratogene effect ontstaat door blootstelling van het embryo aan vrij retinol en/of retinoïnezuur. Bij de beschreven onderzoeken bij proefdieren naar dit effect is weinig of geen aandacht besteed aan de hierboven besproken kinetische processen. Het is bijvoorbeeld waarschijnlijk dat de teratogene effecten na intraperitoneale toediening van retinol weinig afhankelijk zijn van deze kinetische processen, daar het toegediende retinol rechtstreeks naar het embryo kan diffunderen. In onderzoeken waarbij het vitamine A middels de gebruikelijke orale weg is toegediend is slechts gekeken naar de directe dosis-effect relatie. Over de vitamine A status van de proefdieren is niets bekend, waardoor het moeilijk wordt om de uit deze onderzoeken resulterende 'laagste effectieve dosis' te interpreteren. Ook is bij dit soort onderzoeken de interne dosis in het embryo niet bepaald. Onderzoek naar de relatie tussen de dosis en het effect zal daarom plaats moeten vinden in proefdieren waarvan de vitamine A status bekend is. Tevens zullen de optredende concentraties van retinol en/of retinoïnezuur in het embryo bepaald dienen te worden.

Voor interspecies vergelijking kunnen de fysiologische veranderingen tijdens de zwangerschap van belang zijn voor de kinetiek van vitamine A. Zo is bekend dat de activiteit van de microsomale leverenzymen bij de mens toe- maar bij de rat afneemt. Bij het opstellen van het model zal hiermee rekening gehouden moeten worden.

CONCLUSIE.

Uit de gegevens die tijdens deze literatuurstudie werden gevonden is het mogelijk een concept extrapolatiemodel voor de risicoschatting voor vitamine A op te stellen. De belangrijke kinetische processen voor een interspecies vergelijking zijn gedeeltelijk bekend. Voorshands kunnen nu reeds een aantal onderzoeken met betrekking tot de kinetiek van vitamine A worden geformuleerd welke voor het model belangrijk worden geacht. Deze onderzoeken dienen de volgende vragen te beantwoorden voor de verschillende species zoals: rat, konijn en mens:

1. Wat is de biologische beschikbaarheid van retinol na toediening van retinylesters en carotenoïden?
2. Is de absorptie van vitamine A en carotenoïden lineair?
3. Onder welke omstandigheden (bij welke vitamine A status) en bij welke dosis van vitamine A is de opslagcapaciteit van de lever verzadigd?
4. Wat zijn de verschillen in kinetiek van vitamine A na hoge eenmalige en chronische toediening?
5. Waaraan wordt het embryo blootgesteld na inname van vitamine A?

Bij enkele onderzoeken in het proefdier zullen tevens teratogene effecten worden gemeten. Dit zal in de experimentplannen nader worden uitgewerkt.

Indien deze vragen beantwoord zijn, kunnen de gegevens uit deze onderzoeken, samen met de verzamelde gegevens uit de literatuur, worden ingepast in het ontwikkelde model. Er kan niet worden uitgesloten dat uit de modelmatige benadering van de risicoschatting meerdere vragen zullen moeten worden gesteld al naar gelang het model aangeeft wat de gevoelige kinetische parameters in het model zijn.

LITERATUUR.

Adachi N, Smith JE, Sklan D, Godman DS (1981). Radioimmunoassay studies of the tissue distribution and subcellular localization of cellular retinol-binding protein in rats. *J. Biol. Chem.* 256: 9471.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. (1989) *Molecular biology of the cell* (2nd ed.) Garland, New York.

Arens, J.F., and Van Dorp, D.A. (1946) Synthesis of some compounds possessing vitamin A activity. *Nature* 157: 190.

Bailey JS, Siu CH (1988). *J. Biol. Chem.* 263: 9326. verder geen info

Bashor MM, Toft DO, Chytil F (1973). In vitro binding of retinol to rat-tissue components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3483.

Bauernfeind JC (1971). Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feed. *J. Agric. Food Chem.* 20: 456.

Bausch J, Rietz P (1977). Method for the assessment of vitamin A liver stores. *Acta Vitaminol. Enzymol.* 31: 99.

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

Bieri JG, Pollard CJ (1954). Studies on the site of conversion of β -carotene injected intravenously into rats. *Br. J. Nutr.* 8: 32.

Bieri JG, Stoewsand GS, Briggs GM, Phillips RW, Woodard JC, Knapka JJ (1977). Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. *J. Nutr.* 107: 1340.

Blaner, W.S., Hendriks, H.J.F., Brouwer, A., De Leeuw, A.M., Knook, D.L., and Goodman, D.S. (1985) Retinoids, retinoidbinding proteins, and retinyl palmitate hydrolase distributions in different types of rat liver cells. *J. Lipid Res.* 26: 1241.

Blaner WS, Das K, Mertz JR, Das SR, Goodman DS (1986). Effects of dietary retinoic acid on cellular retinol- and retinoic acid-binding protein levels in various rat tissues. *J. Lipid Res.* 27: 1084.

Blaner, W.S., Dixon, J.L., Moriwaki, H., Martino, R.A., Stein, O., Stein, Y., and Goodman, D.S. (1987) Studies on the in vivo transfer of retinoids from parenchymal to stellate cells in rat liver. *Eur. J. Biochem.*, 164: 301.

Blaner, W.S., Van Bennekum, A.M., Brouwer, A., and Hendriks, H.F.J. (1990) Distribution of lecithin-retinol acyltransferase activity in different types of rat liver cells and subcellular fractions. *FEBS Lett.* 274: 89.

Blomhoff, R., Rasmussen, M., Nilsson, A., Norum, K.R., Berg, T., Blaner, W.S., Kato, M., Mertz, J.R., Goodman, D.S., Eriksson, U., and Peterson, P.A. (1985) Hepatic retinol metabolism: distribution of retinoids, enzymes, and binding proteins in isolated rat liver cells. *J. Biol. Chem.* 260: 13560.

Blomhoff, R., Norum, K.R., and Berg, T. (1985) Hepatic uptake of [³H]-retinol bound to the serum retinol-binding protein involves both parenchymal and perisinusoidal stellate cells. *J. Biol. Chem.* 260: 13571.

Blomhoff, R., Berg, T., and Norum, K.R. (1988) Transfer of retinol from parenchymal to stellate cells in liver is mediated by retinol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3455.

Blomhoff, R., Green, M.H., Green, J.B., Berg, T., and Norum, K.R. (1991) Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage. *Physiol. Rev.* 71: 951.

Clawitter J, et al (1990). *J. Biol. Chem.* 265: 3248. verder geen info

Cogan U, Kopelman M, Mokady S, Shinitzky M (1976). Binding affinities of retinol and related compounds to retinol-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* 256: 3153.

Commision of the European Communities. CS/VIT A/10. Draft of a second part of a report on the risk of hypervitaminosis A. April (1991).

Creech-Kraft J, Kochhar DM, Scott WJ, Nau H (1987). Low teratogenicity of 13-cis-retinoic acid (isotretinoin) in the mouse corresponds to low embryo concentrations during organogenesis: comparison to the all-trans isomer. *Toxicol.appl.Pharmacol.* 87: 474.

Cullum, M.E., and Zile, M.H. (1985) Metabolism of all-trans-retinyl acetate. Demonstration of common physiological metabolites in rat small intestinal mucosa and circulation. *J. Biol. Chem.* 260: 10590.

De Leenheer, A.P., Lambert, W.E., and Claeys, I. (1982) All-trans-retinoic acid: measurement of reference values in human serum by high-performance liquid chromatography. *J. Lipid Res.* 23: 1362.

Dencker L, d'Argy R, Danielsson BRG, Ghantous H, Sperber GO (1987). Saturable accumulation of retinoic acid in neural and neural crest derived cells in early embryonic development. *Dev.Pharmacol.Ther.* 10: 212.

Deshmukh, D.S., Malathi, P., and Ganguly, J. (1965) Rapid conversion of retinal (vitamin A aldehyde) to retinoic acid (vitamin A acid) in the living rat. *Biochim. Biophys. Acta* 107: 120.

Eriksson, U., Das, K., Busch, C., Nordlinder, H., Rask, L., Sundelin, J., Sallstrom, J., and Peterson, P.A. (1984) Cellular retinol-binding protein - quantitation and distribution. *J. Biol. Chem.* 259: 13464.

Fantel AG, Shepard TH, Newell-Morris LL, Moffett BC (1972). Teratogenic effects of retinoic acid in pigtail monkeys (*Macaca nemestrina*). *Teratology* 15: 65.

Fidge, N.H., Shiratori, T., Ganguly, J., and Goodman, D.S. (1968) Pathways of absorption of retinal and retinoic acid in the rat. *J. Lipid Res.* 9: 103.

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

Gjoen, T., Bjerkelund, T., Blomhoff, H.K., Norum, K.R., Berg, T., and Blomhoff, R. (1987) Liver takes up retinol-binding protein from plasma. *J. Biol. Chem.* 262: 10926.

Goodman, D.S., Blomstrand, R., Werner, B., Huang, H.S., and Shiratori, T. (1966) The intestinal absorption and metabolism of vitamin A and β -carotene in man. *J. Clin. Invest.* 45: 1615.

Goodman, D.S., and Blaner, W.S. (1984) Biosynthesis, absorption, and hepatic metabolism of retinol. In: *The Retinoids* (Sporn, M.B., Roberts, A.B., and Goodman, D.S. eds.). Academic, Orlando, Florida. Volume 2: 1.

Green, P.H.R., and Glickman, R.M. (1981) Intestinal lipoprotein metabolism. *J. Lipid Res.* 22: 1153.

Gruenberg, J., and Howell, K.E. (1989) Membrane traffic in endocytosis: insights from cell-free assays. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5: 453.

Harrison, E.H., Smith, J.E., and Goodman, D.S. (1979) Unusual properties of retinyl palmitate hydrolase activity in rat liver. *J. Lipid Res.* 20: 760.

Harrison EH, Smith JE, Goodman DS (1980). Effects of vitamin A deficiency on the levels and distribution of retinol-binding protein and marker enzymes in homogenates and Golgi-rich fractions of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 628: 489.

Harrison, E.H., and Gad, M.Z. (1989) Hydrolysis of retinyl palmitate by enzymes of rat pancreas and liver. Differentiation of bile salt-dependent and bile salt-independent, neutral retinyl ester hydrolases in rat liver. *J. Biol. Chem.* 264: 17142.

Helgerud, P., Petersen, L.B., and Norum, K.R. (1982) Acyl CoA:retinyl transferase in rat small intestine: its activity and some properties of the enzymic reaction. *J. Lipid Res.* 23: 609.

Helgerud, P., Petersen, L.B., and Norum, K.R. (1983) Retinol esterification by microsomes from the mucosa of human small intestine. *J. Clin. Invest.* 71: 747.

Hendriks, H.F.J., Elhany, E. Brouwer, A., De Leeuw, A.M., and Knook, D.L. (1988) Uptake and processing of [³H]retinoids in rat liver studied by electron microscopic autoradiography. *Hepatology* 8: 276.

Hendriks, H.F.J., Blaner, W.S., Wennekers, H.M., Piantedosi, R., Brouwer, A., De Leeuw, A.M., Goodman, D.S., and Knook, D.L. (1988) Distribution of retinoids, retinoid-binding proteins and related parameters in different types of liver cells isolated from young and old rats. *Eur. J. Biochem.* 171: 237.

Hendriks, H.F.J. (1991) Retinoid (vitamin A) metabolism in rat liver. Thesis, Leiden.

Huang, H.S., and Goodman, D.S. (1965) Vitamin A and caro-tenoids. I. Intestinal absorption and metabolism of ¹⁴C-labeled vitamin A alcohol and β-carotene in the rat. *J. Biol. Chem.* 240: 2839.

Hollander D, Ruble PE (1978). Beta-carotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH and flow rate effects on transport. *Am. J. Physiol.* 235 (Endocrin. Metab. Gastrointest. Physiol. 4: E686.

Hollander D (1981). Intestinal absorption of vitamine A, E, D, and K. *J. Lab. Clin. Med.* 97: 449.

Kato, M., Kato, K., and Goodman, D.S. (1984) Immunocytochemical studies on the localisation of plasma and of cellular retinol-binding proteins and of transthyretin (prealbumin) in rat liver and kidney. *J. Cell Bio.* 98: 1696.

Kato, M. Blaner, W.S., Mertz, J.R., Das, K., Kato, K., and Goodman, D.S. (1985) Influence of reinoid nutritional status on cellular retinol- and cellular retinoic acid-binding protein concentrations in various rat tissues. *J. Biol. Chem.* 260: 4838.

Kitamoto T, Momoi M (1989). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 531. verder geen info

Kistler A (1981). Teratogenesis of retinoic acid in rats: susceptible stages and suppression of retinoic acid-induced limb malformations by cycloheximide. *Teratology* 23: 25.

Kistler A (1985). Inhibition of chondrogenesis by retinoids: limb bud cell cultures as a test system to measure the teratogenic potential of compounds? *Concepts Toxicol.* 3: 86.

Lammer, E.J., Chen, D.T., Hoar, R.M., Agnish, N.D., Benke, P.J., Braun, J.T., Curray, C.J., Fernhoff, P.M., Grix, A.W., Lott, I.T., Richard, J.M., and Sun, S.C. (1985) Retinoic acid embryopathy. *N. Engl. J. Med.* 313: 837.

Langman J (1963). *Medical Embryology*. Williams and Wilkins, Baltimore MD,.

MacDonald, P.N., and Ong, D.E. (1988) Evidence for a lecithinretinol acyltransferase activity in the rat small intestine. *J. Biol. Chem.* 263: 12478.

McGillivray WA, Thompson SY, Worker NA (1956). Further studies on the metabolism by rats of intravenously administered aqueous dispersions of carotenoid pigments. *Br. J. Nutr.* 10: 126.

Mehta RG, Moon RC (1981). Hormonal regulation of retinoic acid-binding proteins in the mammary gland. *Biochem. J.* 200: 591.

Mentlein, R., and Heymann, E. (1987) Hydrolysis of retinyl esters by non-specific carboxylesterases from rat liver endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 245: 863.

Micozzi MS, Brown ED, Taylor PR, Wolfe E (1988). Carotenoderma in men with elevated carotenoid intake from foods and β -carotene supplements. *Am. J. Clin. Nutr.* 48: 1061.

Mihaly GW, Morgan DJ (1984). Placental drug transfer: effects of gestational age and species. *Pharmac. Ther.* 23: 253.

Mizutani M, Ihara T, Kaziwara K (1966). Effect of hypervitaminosis A on the fetus of several species of rodents, with special reference to malformation of the extremities. *Japan J. Genet.* 41: 141.

Murray TK, Grice HC (1961). Absorption of vitamin A after thoracic duct ligation in the rat. *Can. J. Biochem. Physiol.* 39: 1103.

Muto Y, Smith JE, Milch PO, Goodman DS (1972). Regulation of retinol-binding protein metabolism by vitamin A status in rats. *J. Biol. Chem.* 247: 2542.

Muto Y, Shidoji Y, Kanda Y (1982). Isolation and characterization of serum retinol-binding protein. *Methods in Enzymology*, Vol. 81. Packer L, Ed., Academic Press, New York, 840.

Napoli, J.L., Pramanick, B.C., Williams, J.B., Dawson, M.I., and Hobbs, P.D. (1985) Quantitation of retinoic acid by gas-liquid chromatography-mass spectrometry: total versus all-trans-retinoic acid in human plasma. *J. Lipid Res.* 26: 387.

National Academy of Sciences. *Nutrient requirements of laboratory animals*, no. 10, second revised edition (1972).

Navab M, Smith JE, Goodman DS (1977). Rat plasma prealbumin. Metabolic studies on effects of vitamin A status and on tissue distribution. *J. Biol. Chem.* 252: 5107.

Nederlandse Voedingsnormen 1989. Voorlichtingsbureau voor de Voeding 's-Gravenhage (1989).

Norum, K.R., Helgerud, P., Petersen, L.B., Groot, P.H.E., and De Jonge, H.R. (1983) Influence of diets on acyl-CoA:cholesterol acyltransferase and on acyl-CoA:retinol acyltransferase in villous and crypt cells from rat small intestinal mucosa and in the liver. *Biochim. Biophys. Acta* 751: 153.

Olson JA (1972). The prevention of childhood blindness by the administration of massive doses of vitamin A. *Isr. J. Med. Sci.* 8: 1199.

Olson JA (1987). Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin A in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 704.

Ong DE, Chytil F (1978). Cellular retinol-binding protein from rat liver. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 253: 828.

Ong DE (1984). A novel retinol binding protein from rat: purification and partial characterization. *J. Biol. Chem.* 259: 1476.

Ong DE (1985). Vitamin A-binding proteins. *Nutr. Rev.* 43: 225.

Ong, D.E., Kakkad, B., and MacDonald, P. (1987) Acyl-CoA-independent esterification of retinol bound to cellular retinol-binding protein (type II) by microsomes from rat small intestine. *J. Biol. Chem.* 262: 2729.

Ong DE, Page DL (1987). Cellular retinol-binding protein (type two) is abundant in human small intestine. *J. Lipid Res.* 28: 739.

Ong DE, Chytil F (1988). *Arch. Biochem. Biophys.* 267: 474. verder geen info

Ong, D.E., MacDonald, P.N., and Gubitosi, A.M. (1988) Esterification of retinol in rat liver. Possible participation by cellular retinol-binding protein and cellular retinol-binding protein II. *J. Biol. Chem.* 263: 5789.

Peterson PA, Nilson SF, Östberg L, Rask L, Valquist A (1974). Aspects of metabolism of retinol-binding protein and retinol. *Vitam. Horm. (Leipzig)* 32: 181.

Rask, L., Valtersson, C., Anundi, H., Kvist, S., Eriksson, U., Dallner, G., and Peterson, P.A. (1983) Subcellular localization in normal and vitamin A-deficient rat liver of vitamin A serum transport proteins, albumin, ceruloplasmin and class I major histocompatibility antigens. *Exp. Cell. Res.* 143: 91.

Rasmussen, M., Petersen, L.B., and Norum, K.R. (1984) The activity of acyl CoA:retinol acyltransferase in the rat: variation with vitamin A status. *Br. J. Nutr.* 51: 245.

Roels, O.A., Trout, M., and Dujacquier, R. (1958) Carotene balances on boys in Ruanda where vitamin A deficiency is prevalent. *J. Nutr.* 65: 115.

Rosa FW, Wilk AL, Kelsey FO (1986). Teratogen update: vitamin A congeners. *Teratology* 33: 355.

Saari JC, Futterman S, Bredberg L (1978). Cellular retinol- and retinoic acid-binding proteins of bovine retina. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 253: 6432.

Saari JC, Bredberg L, Garwin GG. Identification of the endogenous retinoids associated with 3 cellular retinoid-binding proteins from bovine retina and retinal pigment epithelium. verder geen info

Saari, J.C., and Bredberg, D.L. (1989) Lecithin:retinol acyltransferase in retinal pigment epithelial microsomes. *J. Biol. Chem.* 264: 8636.

Said HM, Ong DE, Shingleton JL (1989). Intestinal uptake of retinol: enhancement by bovine milk β -lactoglobulin. *Am. J. Clin. Nutr.* 49: 690.

Sani BP (1977). Localization of retinoic acid binding protein in nuclei. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 75: 7.

Sauberlich HE, Hodges RE, Wallace DL, Kolder H, Canham JE, Hood J, Raica N (Jr), Lowry LK (1974). Vitamin A metabolism and requirements in the human studied with the use of labeled retinol. *Vit. Horm. (Leipzig)* 32: 251.

Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., and Valle, D. (1989) *The metabolic basis of inherited diseases* (6th edition). New York, McGraw-Hill.

Shenefelt RE (1972). Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid: relation to dose and stage at treatment. *Teratology* 5: 103.

Smith FR, Goodman DS (1970). Metabolism of plasma retinol-binding protein in man. *J. Clin. Invest.* 49: 90a.

Smith JE, Muto Y, Milch PO, Goodman DS (1973). The effects of chylomicron vitamin A on the metabolism of retinol-binding protein in the rat. *J. Biol. Chem.* 248: 1544.

Smith JE, Muto Y, Goodman DS (1975). Tissue distribution and subcellular localization of retinol-binding protein in normal and vitamin A deficient rats. *J. Lipid Res.* 16: 318.

Smith JE, Goodman DS (1976). Vitamin A transport in human vitamin A toxicity. *N. Engl. J. Med.* 294: 805.

Smith JE, Goodman DS (1979). Retinol-binding protein and the regulation of vitamin A transport. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Ep. Biol.* 38: 2504.

Soprano DR, Smith JE, Goodman DS (1982). Effect of retinol status on retinol-binding protein biosynthesis rate and translatable messenger RNA level in rat liver. *J. Biol. Chem.* 257: 7693.

Soprano DR, Soprano KJ, Goodman DS (1986). Retinol-binding protein messenger RNA levels in the liver and in extrahepatic tissues of the rat. *J. Lipid Res.* 27: 166.

Valquist A, Peterson PA, Wibell L (1973). Metabolism of the vitamin A transporting protein complex. I. Turnover studies in normal persons and in patients with chronic renal failure. *Eur. J. Clin. Invest.* 3: 352.

Wake, K. (1980) Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. *Int. Rev. Cytol.* 66: 303.

WHO, Scientific Committee for Food. Report on the risks of hypervitaminosis A (1991).

Windler, E., and Havel, R.J. (1985) Inhibitory effects of C apolipoproteins from rats and humans on the uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants by the perfused rat liver. *J. Lipid Res.* 26: 556.

Wolff, G. (1984) Multiple functions of vitamin A. *Physiol. Rev.* 64: 873.

Yost, R.W., Harrison, E.H., and Ross, A.C. (1988) Esterification by rat liver microsomes of retinol bound to cellular retinol-binding protein. *J. Biol. Chem.* 263: 18693.

Yeung DL, Veen-Baigert MJ (1972). Absorption of retinol and retinyl esters via lymph and portal vein in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 50: 753.

Zachman RD, Dunagin PE, Olson JA (1966). Formation and enterohepatic circulation of metabolites of retinol and retinoic acid in bile duct-cannulated rats. *J. Lipid Res.* 7: 3.