

TOXICOLOGIE VAN CHEMISCHE MENGSELS

Over beoordeling van gezondheidsrisico's bij blootstelling
aan combinaties van stoffen.

door prof.dr.ir. J.P. Groten



WAGENINGEN UNIVERSITEIT

Inaugurele rede van John Groten, uitgesproken op 18 november 2004 bij aanvaarding van het ambt van bijzonder hoogleraar in de Combinatietoxicologie aan Wageningen Universiteit, vanwege de Stichting Lorentz-Van Itersonfonds TNO.

1. Inleiding

Mijnheer de Rector Magnificus, hooggeleerde collegae, zeer gewaardeerde toehoorders in de zaal.

Het onderzoeksthema van de leerstoel combinatietoxicologie maakt deel uit van een al jarenlange bestaande samenwerking op het terrein van de toxicologie tussen TNO Voeding en Wageningen Universiteit. Deze samenwerking is 5 jaar geleden formeel bekrachtigd door de start van een gezamenlijk kenniscentrum, het Centre for Food Toxicology (CFT). Met de inrichting van kenniscentra geeft TNO uitdrukking aan het belang van universitaire samenwerking op een aantal strategische onderzoeksgebieden. Het is voor mij dan ook een groot genoegen om tegen het einde van het eerste jaar van mijn aanstelling als hoogleraar hier in Wageningen, de benoeming te kunnen verzegelen met deze oratie.

In de komende 45 minuten zal ik een poging doen om de relevantie van het werkveld van de mengseltoxicologie aan u toe te lichten en daarbij te laten zien met welke uitdagingen de toxicologie in het algemeen, en deze leerstoel in het bijzonder, in de komende jaren te maken zal krijgen. Daarbij zal ik ook stilstaan bij de relatie tussen fundamenteel toxicologisch onderzoek van de universiteit en de toepassing van deze kennis bij de onderzoeksorganisatie TNO.

2. Bruisen de tijden

Als we het internationale werkveld van de toxicologie bekijken, dan is het Nederlandse onderzoek daarin sterk vertegenwoordigd. De Nederlandse Vereniging voor

Toxicologie, NVT, is in grootte na de Amerikaanse, Japanse en Britse verenigingen, de vierde nationale toxicologenvereniging ter wereld. Het aantal geregistreerde toxicologen bij de NVT neemt sinds 2002 elke jaar weer toe en het totale ledenaantal stijgt gestaag (NVT, 2004). Ondanks deze trend, heb ik de indruk dat de populariteit van het werkveld in de laatste jaren iets is afgenomen. Daar zijn mijn inziens een aantal verklaringen voor. Allereerst, lijkt het voor de nieuwe generatie wetenschappers aantrekkelijker en zinvoller om de gezondheid van bijv. voedingsmiddelen en geneesmiddelen te bestuderen in plaats van de veiligheid. Bovendien hebben we in de westerse wereld, dankzij goede regelgeving en controle, in de laatste tien jaar veel minder grote milieu- en voedingsproblemen met chemische stoffen dan in de periode daarvoor. Mijn Wageningse leermeester in de toxicologie, Professor Jan Koeman hanteerde dan ook de stelling: *“vooralsnog worden in de westerse samenleving meer mensen door het milieu betaald dan er onder lijden”*. Ik onderschrijf dit adagium. Daarnaast verscheen recentelijk een RIVM rapport “Ons eten gemeten” waarin wordt gesteld dat onze voeding en vooral de ongezonde samenstelling daarvan, een veel groter gezondheidsprobleem met zich meebrengt dan de chemische en microbiologische verontreinigingen in de voeding (RIVM, 2004). Een studente stelde mij dan ook laatst de volgende vraag:



Is gezondheid “cool” en toxicologie “vet saai”?

Ik beantwoordde die vraag ontkennend en voorspelde haar dat in de komende jaren de toxicologie als onderzoeksdiscipline nog nooit zo noodzakelijk en aantrekkelijk is geweest. Ik zal dat hier beargumenteren.

Ten eerste, op dit moment is het zo dat van alle op de Europese markt geregistreerde chemicaliën, dat zijn er ongeveer 100.000, er slechts van een beperkt aantal een volledig dossier over de toxiciteit is opgesteld. Echter, de Europese commissie heeft recentelijk een wetsvoorstel opgesteld waarin een nieuw chemisch stoffenbeleid wordt voorgesteld. In dit nieuwe systeem dienen ongeveer 30.000 stoffen te worden beoordeeld, via een registratie-, evaluatie- en autorisatie systeem voor chemicaliën (REACH systeem), waarvan bedrijven per jaar een ton of meer vervaardigen of invoeren. Met deze inhaalslag moet binnen 20 jaar van alle stoffen de gevaren en risico's bekend zijn. De kosten bij toepassing van het wetsvoorstel worden beraamd op enkele miljarden euro's (ECN, 2002). Dit staat nog los van de economische impact voor bedrijven. Het is dan ook niet verwonderlijk dat overheid en industrie zoeken naar mogelijkheden om die lijst van duizenden stoffen eerst te prioriteren. Voorstellen om tot valide voorselectiecriteria te komen, worden op dit moment ontwikkeld door de industrie en TNO in wisselwerking met de overheid en het RIVM. Een vergelijkbare uitdaging doet zich voor bij de veiligheidsevaluatie van cosmetica waarbij door introductie van de nieuwe Europese wetgeving (het z.g. "Seventh Amendment") in de komende 5 jaar veel alternatieven voor de huidige dierproeven ontwikkeld dienen te worden.

Deze ontwikkelingen betekenen een geweldige toxicologische klus waarin in ruime mate gebruik gaat worden van in vitro modellen (dwz. in reageerbuis of kweekbakje) en van

computer modelering. Bovendien zal, om het aantal studies tot een minimum te beperken, meer nadruk moet liggen op de kennis per stofklasse en per relevant mengsel van stoffen en minder op het onderzoek naar alle afzonderlijke stoffen.

Een andere, belangrijke ontwikkeling, waarbij de toxicologie een cruciale rol speelt, vindt plaats binnen het (pre)klinisch onderzoek van geneesmiddelen. Door de ontwikkelingen op het terrein van de moleculaire biologie, is het inzicht in werkingsmechanisme van geneesmiddelen sterk toegenomen en is er meer kennis over de gevoeligheid van specifieke patiëntenpopulaties. Bovendien wordt hierbij meer gebruik gemaakt van cocktails voor specifieke doelgroepen en de kans op marktintroductie van z.g. “blockbusters” voor de grotere, algemene doelgroepen zal wellicht verminderen. Daar komt nog bij dat de ontwikkelingskosten per geneesmiddel de laatste jaren fors gestegen zijn (Bain en Co., 2003). Pharma bedrijven zoeken naar wegen om de effectiviteit van preklinisch onderzoek te optimaliseren. Ook hier zullen, vroeg in de productontwikkeling, nieuwe benaderingen in de toxicologie kunnen bijdragen aan effectiviteit van het onderzoek, waaronder de combinatie toxicologie en het gebruik van toxicogenomics. Bij deze laatste ontwikkeling wordt de kennis over genexpressie profielen gebruikt om werkingsmechanismen en verschillen in gevoeligheid tussen mens en dier beter te beoordelen (Lord & Papoian, 2004).

Tenslotte, ook binnen de voedingindustrie zal bij de ontwikkeling van nieuwe gezondheidsbevorderende voedingsmiddelen meer aandacht besteedt worden aan verschillende doelgroepen van consumenten. Hierbij is de kennis over het werkingsmechanisme onontbeerlijk om de bewijslast van een gezondheidsclaim te onderbouwen en de veiligheid

te garanderen. Zowel voor "personalized nutrition" als voor "personalized medication" zal niet zozeer absolute veiligheid en effectiviteit van de stoffen van belang zijn, maar eerder nog de relatie tussen beide, de z.g. Risk-Benefit ratio. Ik kom hier straks nog even op terug.

Op grond van deze ontwikkelingen in de verschillende industriesectoren, ben ik ervan overtuigd dat de toxicologie een uitdagende tijd tegemoet gaat zien waarbij de nadruk ligt op effectiviteit van de risicobeoordeling bij een verminderd gebruik van proefdieren. Ik beantwoordde de vraag van de studente dan ook met de opmerking:

De toxicologie is "vet cool".



3. Alles is een mengsel

In de vorige sectie is de toxicologie van mengsels al enkele malen aan bod gekomen. Mensen hebben al sinds het ontstaan van de mensheid te maken met gifmengsels, temeer omdat deze stoffen overal in de natuur in combinaties voorkomen. Het oudste geschrift, een papyrusrol, dat handelt over de medische toepassingen van giftige stoffen, werd gevonden bij een mummie in een tombe in Egypte (Ebers, 1937). Egyptische artsen uit die tijd werkten met meer dan

800 recepten met bekende giftige stoffen zoals plantextracten (o.a. monnikskap tegen pijn, wonderboom tegen buikklachten, papaver met geestverruimende werking, of gevleete scheerling) en zware metalen als lood, antimoon of arseen. Het zal u niet verwonderen dat de Egyptenaar met buikpijn en hoofdpijn regelmatig een cocktail zal hebben gemengd om beide klachten te verhelpen. In het bovenstaande geval betreft het wel een combinatie preparaat van aconitine, ricine en opium en vandaag de dag zou men daar heel voorzichtig mee zijn omgegaan op grond van de werking van de combinatie.

Ook bij de Grieken en Romeinen was het gifmengen aan de orde van de dag en werden bij deze oude culturen combinatiepreparaten uitgeprobeerd om een geneeskrachtige of hallucinerende werking op te roepen en het effect van het preparaat daarmee te versterken.

Tenslotte, bij de traditionele Chinese en Tibetaanse geneeskunde is het gebruik van mengsels tot een ware kunst verheven en hierbij is het gebruikelijk om via combinaties van kruiden het effect van de individuele stoffen te versterken of om de giftigheid in de combinatie te verminderen. In de laatste jaren is er sprake van een heroriëntatie op traditionele Chinese geneeskunde. Kanttekening hierbij is dat productie en samenstelling beter gereguleerd dienen te worden om contaminatie met natuurlijke toxines en/of contaminanten te voorkomen (o.a. zware metalen, alkaloiden). Een schrijnend voorbeeld hiervan was het gebruik van pijpbloemen (*Aristolochia clematis*) in kruidenmengels. In de jaren negentig heeft dit in verschillende Europese landen tot ernstige nierschade geleid bij honderden vrouwen die Chinese kruidenmengels als afslankmiddel gebruikten en daarbij werden blootgesteld aan aristolochiazuur. Deze stof staat bekend om zijn zeer giftige werking (Betz, et al., 2002).

Dit soort incidenten zijn eerder uitzondering dan regel, maar pleiten voor het gebruik van kwaliteitsnormen aan gaande de samenstelling van deze kruidenmengsels

Dit voorbeeld brengt me tot de beschrijving van het werkterrein van de toxicologie. Toxicologie is de medisch-biologische wetenschap die de schadelijke effecten van stoffen op levende organismen beschrijft. Uitgangspunt daarbij is steeds dat er voor iedere stof onder bepaalde omstandigheden een dosis kan worden vastgesteld waarboven ongewenste effecten optreden. Deze dosis-effect relatie werd al treffend beschreven door de in 1541 overleden Duitse geneeskundige Paracelsus in zijn citaat "Nur die dosis macht dass ein gift kein gift is" ("*Dosis sola facit venenum*"). Dit betekent, dat alle stoffen in principe giftig zijn, maar dat de dosis bepaalt wanneer van een vergif (lees: schadelijke stof) kan worden gesproken. Paracelsus heeft daarmee 4 eeuwen geleden aan de basis gestaan van het huidige werkveld van de toxicologie (en homeopathie) toen hij bedacht dat stoffen die de mens ziek maken in hoge concentraties wellicht in lage concentraties geschikt zijn om hem te genezen. Het fenomeen van positieve effecten bij lage dosis wordt in de toxicologie regelmatig beschreven onder het begrip "hormesis". Het verschijnsel hormesis in de toxicologie is nog niet goed onderzocht, temeer omdat onderzoek bij lage lage doseringen vrijwel niet plaatsvindt (Bukowski, 2000). In de huidige tijd geldt Paracelsus als de grootste arts die Duitsland ooit heeft voortgebracht. Dat is echter in schril contrast tot 2 eeuwen geleden toen een medicus over Paracelsus schreef: "*Hij leefde als een zwijn, zag eruit als een voerman, en was de grootste tijd van zijn leven bezopen.*" (de Bruijn, 1999).

Paracelsus moet welhaast een boeiende en sociaal geënga-

geerde wetenschapper zijn geweest. Op 33-jarige leeftijd vestigt hij zich als hoogleraar in Bazel, waar hij veel buitenlandse studenten aantrekt. Op zijn wetenschapstochten (equivalent van de huidige sabbaticals) vertoefde hij tussen adel en het gewone volk. Hij walste echter over allerlei universitaire principes heen. Zo maakte hij bijvoorbeeld niet alleen gebruik van de dure exotische producten, maar ook van mengsels van inheemse kruiden. Ook hing hij een notitie aan het prikbord waarin hij niet alleen studenten maar ook leken uitnodigt voor zijn colleges. Bovendien waren de lessen niet langer in het Latijn maar in het Duits. Ondanks zijn breuk met de traditie, werden de colleges van Paracelsus zeer goed bezocht.

Als ik het succes van de colleges van Paracelsus goed interpreteer, dan begint goed onderwijs bij een goede en vooral benaderbare lector. Dus om aantrekkelijk onderwijs te verzorgen zou ik kunnen overwegen om de college series in het Duits of, beter nog, in het Limburgs te houden. En als mijn collega professor Rietjens dat goedvindt, dan zou ik in dat laatste geval als een "bütereedner" (een Limburgse troubadour op spreekgestoelte) het studentenvolk kunnen verrassen op toxicologie levenslessen, met een dosis humor wel te verstaan.

Dit brengt mij tot het punt kwaliteit van onderwijs aan de universiteit. In haar oratie als hoogleraar biochemie riep mijn directe collega Professor Ivonne Rietjens zeven jaar geleden op tot inspirerend en goed onderwijs (Rietjens, 1997). Voor een deel ligt die uitdaging bij de hoogleraar zelf, maar collega Rietjens vroeg daarbij ook expliciet de aandacht voor de tanende kwaliteit van het huidige studiestelsel waarbij de tijds- en werkdruk voor student en lector hoog is. Voorafgaand aan deze oratie heb ik haar de vraag

gesteld of de situatie is veranderd anno 2004. We kwamen daarbij tot de conclusie dat, hoewel in het huidige IT tijdperk de informatievoorziening in relatief kort tijdbestek kan plaatsvinden, het steeds lastiger lijkt te zijn om voldoende tijd te besteden aan creativiteit en innovatie. Welk een vreemde paradox! Bovendien is het mij, vader van 3 potentiële studenten, niet helder of door het aanreiken van al die informatie op presenteerblaadjes, de student überhaupt wel voldoende wordt uitgedaagd om kritisch te zijn in het verzamelen van de juiste bronnen van informatie. In dit kader zag ik gisteren in het NRC een artikel op de voorpagina onder de volgende kop "Universiteiten zien af van dure uitgaven" waarbij wordt aangegeven dat wetenschappers bij de Nederlandse universiteiten in de komende 3 jaar de helft van de wetenschappelijke tijdschriften van de uitgeverij Reed Elsevier niet meer kunnen raadplegen (NRC, 2004). Dit is mijns inziens een zorgelijke ontwikkeling omdat de universiteit juist toegang dienen te hebben tot alle informatie. Kerndoel van de universitaire opleiding is dat de student leert om uit alle beschikbare bronnen juist die informatie te filteren die als meest kritisch wordt gezien. De toekomst zal dan ook moeten uitwijzen of ik terecht wat bezorgd ben in deze.

Dames en heren, laten we nu eens overstappen naar de nieuwe leerstoel Combinatietoxicologie. Ik ben ervan overtuigd dat Paracelsus niet zozeer gebruik maakte van afzonderlijke stoffen, maar meer nog werkte met mengsels van metalen en mineralen, zoals hij dat van zijn vader had geleerd uit de scheikunde en metallurgie. Bovendien deed hij dagelijks via zijn kruidenkennis ervaring op in gebruik van combinaties. Daarnaast was hijzelf onderhevig aan de combinatiewerking van toxische stoffen tijdens feesten aan het

hof en bij de burgerij waarbij hij werd blootgesteld aan combinaties van spijs, drank en andere genotsmiddelen. Immers, onze voeding samen met alcohol, cosmetica, binnen- en buitenlucht en sigarenrook, vormen een ingewikkeld, variabel mengsel van enkele honderdduizenden chemische verbindingen waaronder de (essentiële) stoffen, natuurlijke bestanddelen, natuurlijke, huishoudelijke en industriële verontreinigingen en tenslotte de additieven, de stoffen die doelbewust worden toegevoegd om de kwaliteit/houdbaarheid te verbeteren.

Om gezondheidsrisico's van inname van deze chemische stoffen te vermijden, worden aanvaardbare dagelijkse inname vastgesteld (bijvoorbeeld ADI, Acceptable Daily Intake). Deze advieswaarde is meestal gebaseerd op toxicologisch onderzoek in mens en dier, waarbij een drempelwaarde voor de stof, de zogenaamde "No observed adverse effect level" (NOAEL, ofwel "Geen-nadelig-effect-niveau") wordt vastgesteld. De aanvaardbare inname norm wordt vervolgens afgeleid van deze drempelwaarden waarbij in vele gevallen een veiligheidsfactor van 100 als uitgangspunt wordt genomen. Deze veiligheidsfactor compenseert voor variatie in gevoeligheid tussen verschillende individuele dieren (intraspecies variatie) en variatie tussen mensen en dier (interspecies variatie) (ICPS, 1987, 1994). De veiligheidsfactor kan zelfs groter zijn dan 100 indien er van de stof geen chronische toxiciteitsgegevens voor handen zijn, of indien er geen drempelwaarde kon worden vastgesteld in de experimentele studies, of indien het werkingsmechanisme in de mens sterk afwijkend is. Echter, de hele risico evaluatie is gebaseerd op het testen van de effecten van afzonderlijke stoffen. Eventuele interacties tussen de stoffen na opname in het lichaam, die het effect van de afzonderlijke

stoffen versterken dan wel verzwakken, worden tot op heden niet meegenomen bij het vaststellen van de veiligheidsfactoren. In 1985 verscheen in Nederland een rapport van de Gezondheidsraad over normstelling voor niet-kanker-
verwekkende stoffen waarbij door een adviescommissie onder voorzitterschap van Prof. Dr. Herman van Genderen het probleem van gecombineerde blootstelling aan meerdere stoffen vanuit het milieu wordt beschreven. In de tijd dat Prof van Genderen zich boog over deze materie in Nederland, was er wel al enige ervaring opgedaan met mengsels van verontreinigde stoffen in water op waterdieren. Zo was het fenomeen van dosis-additie onderzocht in vissen en waterdieren (Könemann, 1979, Hermens 1983). Het betrof hier veelal onderzoek naar de acute toxiciteit van stoffen in water via (deels) narcotische werking. Echter, langdurige orale belasting van warmbloedige dieren en de mens bij herhaalde blootstelling aan lage doseringen met meer dan twee stoffen tegelijk, was nauwelijks onderzocht. Weliswaar worden er bij pharmaceutisch onderzoek geneesmiddelencombinaties getest op ongewenste bijwerkingen in de mens, maar hierbij is er juist sprake van een kortdurende, hoge dosering waarbij een geneesmiddel of combinatie ook therapeutisch zal werken. De gezondheidsraad adviseerde dan ook om "aanvullende toxiciteitonderzoek uit te voeren met mengsels van stoffen met uiteenlopende werking ter hoogte van het Geen-nadelig-effect-niveau" (GR, 1985).

Tegelijkertijd verscheen in de USA bij het Amerikaanse ministerie voor milieubescherming, de "Environmental Protection Agency" (EPA) een vergelijkbaar document waarin gerichte adviezen worden voorgesteld voor de risicoevaluatie van mengsels van stoffen in het milieu (EPA, 1986). De belangrijke aanjagers van het mengselonderzoek

bij de EPA zijn Dr. Richard Hertzberg en Dr. Patrick Durkin (Stara et al., 1985) waarmee we in Nederland tegenwoordig nauw samenwerken.

Deze en andere, recente rapporten geven aan de bewustwording van het probleem van gecombineerde blootstelling pas langzaam op gang is gekomen.

De combinatie werking van de stoffen in de voeding en het milieu (drinkwater, lucht) waarbij de mens langdurig wordt blootgesteld aan een groot aantal verbindingen in een lage dosering is onvoldoende onderzocht.



4. Zoektocht naar de toxiciteit van chemische mengsels

In de afgelopen 15 jaar is de interesse in toxiciteitoronderzoek van chemische mengsels enorm toegenomen en zowel in Europa als in de Verenigde Staten is een ware zoektocht begonnen om een systematiek te ontwikkelen waarmee de gezondheidsrisico's voor blootstelling aan chemische mengsels kan worden voorspeld. Veel van het pionierswerk op het terrein van gedefinieerde mengsels is verricht door Professor Victor Feron bij TNO in opdracht van het Ministerie voor Ruimtelijke Ordening en Milieu (VROM) en het Ministerie voor Sociale Zaken (Jonker et al., 1990, Feron et

al., 1995, Jonker et al., 1996, DVA, 2003). De verschillende aspecten van die zoektocht wil ik kort toelichten.

4.1 Toxiciteit van simpele, gedefinieerde mengsels

Wat is de definitie van een mengsel? Als de precieze samenstelling (kwalitatief en kwantitatief) van het mengsel bekend is, dan spreekt men van gedefinieerde mengsels. Vaak zijn dit relatief simpele mengsels, dat wil zeggen dat het aantal mengselcomponenten beperkt is. Dit is in tegenstelling tot complexe mengsels, die ik niet zal bespreken tijdens deze voordracht, maar wel zal opnemen in het boekje dat zal verschijnen naar aanleiding van deze oratie (zie noot 6)⁶. Doelstelling van de combinatietoxicologie is om aan te tonen dat er sprake is van gecombineerde werking tussen de individuele stoffen in een mengsel. Om dit te onderzoeken, kan men het mengsel in zijn geheel testen of men kan overwegen om alle, afzonderlijke componenten in het mengsel te testen (Zie noot 1)¹. Als de gecombineerde werking van afzonderlijke stoffen wordt onderzocht, samen met de dosis-effect relatie daarvan, dan wordt daarbij gebruikt gemaakt van een empirisch model of een mechanistisch model.

Laten we beginnen met de empirische benadering. Deze methode is verreweg het meest toegepast in de afgelopen 15 jaar. Bij de empirische methode wordt de gecombineerde werking uitgedrukt in de termen "additie" en "interactie". Allereerst wordt voor alle stoffen en hun mengsels een kwantitatieve dosis-respons relatie bepaald. De term "interactie" wordt gebruikt als het effect van het mengsel significant afwijkend is van hetgeen op basis van de optelsom van de afzonderlijke effecten kan worden voorspeld. Bij een

grote positieve afwijking wordt vaak gesproken van syner-gisme. Een effect kleiner dan verwacht op grond van additie, wordt betiteld als antagonisme. Heel wat knappe mathematici hebben zich in het verleden bezig gehouden met de nomenclatuur voor gecombineerde werking. Het maakt in de praktijk niet zoveel uit welke theorie je aanhangt, maar het is wel van groot belang om consequent te zijn in het gebruik van een bepaalde definities. Ik verwijs naar de noten voor een nadere uitleg van de verschillende vormen van additie (effect additie, dosis additie, interactie)².

Bij de eerste mengsel studies die werden uitgevoerd, werd het effect van het mengsel als geheel vergeleken met het effect van de afzonderlijke stoffen zonder nadruk op interacties. Deze aanpak vereist het minimale aantal testgroepen ($n+1$, n =aantal stoffen). Een belangrijk voordeel van studies met hele mengsels, is dat ze relatief eenvoudig zijn uit te voeren waarbij de interactie (ofwel "afwijking van additie") kan worden aangetoond voor het mengsel als geheel. Echter, het is daarbij niet mogelijk om interacties tussen specifieke stoffen in het mengsel aan te tonen. Om dat laatste te bestuderen, dient gebruikt te worden gemaakt van statistische ontwerpen waarin de effecten en interacties van verschillende factoren (lees stoffen) getest worden in een experiment. Bij deze zogenaamde factoriele experimenten wordt niet alleen het hele mengsel, maar elke concentratie en elke chemische stof apart getest. Het aantal groepen in een factoriele proefopzet is n^k , n =aantal concentraties, k =aantal stoffen.

Om een uitspraak te kunnen doen over vermeende interacties in een mengsel, neemt de complexiteit van deze factoriële experimenten exponentieel toe met het aantal stoffen, zeker wanneer de afzonderlijke stoffen op meerdere dosis-

niveaus worden getest. Uitgaande van slechts 1 dosisniveau en alle mogelijke combinaties, omvat een experiment met 3 stoffen 7 testgroepen (2^3-1) en met 4 stoffen 15 testgroepen (2^4-1). Daarentegen, een experiment met 4 stoffen, 3 doseringen per stof omvat al 63 testgroepen.

Een markant voorbeeld van een experiment waarbij een factoriële proefopzet werd gebruikt, is de reproductietoxicologie studie die werd uitgevoerd door de Amerikaanse EPA (Narotsky et al., 1995). In deze studies werden de interacties van een mengsel van 3 stoffen op 5 concentraties getest met behulp van een volledig $5 \times 5 \times 5$ factorieel experiment hetgeen 125 experimentele groepen opleverde.

Echter, de sterke toename in complexiteit en de hiermee samenhangende praktische, economische en ethische bezwaren van dit type studies, hebben ertoe geleid dat de meeste mengselexperimenten zijn uitgevoerd met hooguit een paar stoffen. Gaandeweg de jaren negentig is sprake van doorbraak in de mengseltoxicologie en wordt het gebruik van efficiëntere statistische ontwerpen geïntroduceerd waarbij niet alle mogelijke combinaties van stoffen worden getest, maar slechts fracties van de volledige proefopzet. Hierdoor werd het uitvoeren van meer complexere mengselexperimenten mogelijk (Groten et al. 2001, Tajima et al., 2002). Een van de eerste studies op dit terrein was een studie om de subacute toxiciteit van een mengsel van 9 stoffen met 2 concentraties uit te voeren. Hierbij zouden 2^9 experimentele groepen nodig zijn in een volledig factorieel experiment. Echter, in plaats daarvan, werd een fractionele, factoriële studie uitgevoerd met 16 experimentele groepen, de $1/16$ fractie van een volledig design (Groten et al., 1997).

In de afgelopen jaren is er veel vooruitgang geboekt met de

toepassing en validatie van dit type statistisch onderzoek en de belangrijkste meerwaarde van dit proces is dat de mathematici, statistici en toxicologen elkaar opzoeken voordat mengselstudies worden opgezet (Groten et al., 2004). Welk ontwerp wordt gekozen is een zaak van het afwegen van praktische uitvoerbaarheid en winst aan nuttige informatie die uit een ingewikkeldere studie kan worden gehaald. Ik refereer naar collega onderzoeker Dr. Eric Schoen, die recentelijk op het thema experimentele designs en toepassing in onder meer toxicologie is gepromoveerd (Schoen, 1996, 2000). Parallel aan de ontwikkeling in Nederland, ontstond ook in de Verenigde Staten interesse in deze aanpak en er loopt nu een actief onderzoeksprogramma op het terrein van experimenteel design met nadruk op toepassing in de (combinatie)toxicologie. Ik refereer hier naar het werk van de Professoren Hans Carter en Chris Gennings (Gennings and Garter, 1995; Garter en Gennings et al., 2001).

4.2 Van empirische modellering naar mechanistische onderbouwing

Naast empirische modellen kan de interactie tussen 2 stoffen ook beschreven worden met behulp van een op het mechanisme gebaseerde mathematische vergelijking. Interacties tussen stoffen kunnen optreden in de toxicokinetische dan wel toxicodynamische fase. De meest bekende gevallen van interacties treden op in de toxicokinetische fase (de fase waarin het gedrag van de stof wordt bestudeerd tussen opname en uitscheiding in het lichaam). De interacties worden veelal gekenmerkt door inductie dan wel inhibities van biotransformatie enzymen of tijdens de opname en excretie op het niveau van pompen en carriers in de cel

membraan. Veel van deze toxicokinetische interacties zijn te beschrijven met modellen die gebaseerd zijn op mechanistische kennis (bijv. competitief agonisme, substraat-inhibitie) (Ishigam et al., 2001).

Een van de eerste voorbeelden uit de toxicodynamiek waarbij een mechanistische benadering werd gekozen voor evaluatie van mengsels van meer dan 2 stoffen, vormt het onderzoek van Cassee et al. (1996). Hierbij werd sensorische irritatie van mengsels van aldehyden bestudeerd, zoals aanwezig in binnen en buitenlucht. Sensorische irritatie wordt veroorzaakt door activatie van de Nervus trigeminus in het gehemelte in de mond. Als gevolg van blootstelling aan irriterende stoffen in de lucht lijdt dit tot een afname van de ademhalingsfrequentie. In een experimentele studie met mengsels van aldehydes (formaldehyde, acroleïne, acetaldehyde) was het irritatie effect van het mengsel groter dan voor de individuele stoffen. Toepassing van een competitie model voor de binding van 3 stoffen aan een gezamenlijke receptor kon de effecten van het mengsel nauwkeurig voorspellen. Bovendien konden de uitkomsten van het mechanistisch model, ook nauwkeurig voorspeld worden met een empirisch model, uitgaande van dosis-additie. Deze, en andere studies, tonen aan dat aanvullende kennis over het werkingsmechanisme de scheidslijn tussen empirisch en mechanistisch modelleren zullen slechten (Groten et al, 2004).

Elk mechanistisch model dat de gecombineerde werking van 2 of meer stoffen weergeeft, zal ook beschreven kunnen worden met een empirisch model gebaseerd op dosis-additie, en vice versa.



Tot nu toe zijn het aantal mechanistische studies op het terrein van de combinatietoxicologie nog zeer beperkt. Bovendien is de kennis over werkingmechanisme en mogelijke combinatiewerking op verschillende niveau's (weefsel, cel, eiwit, gen) slechts fragmentarisch bekend.. Hier staan de ontwikkeling natuurlijk niet stil. Mede door de wetenschappelijke vooruitgang op het terrein van de moleculaire biologie en chip technologie het nu mogelijk om de expressie van duizenden genen gelijktijdig te meten. Ook het werkveld van de metabolomics, waarbij simultaan metabolieten niveaus kunnen worden vastgesteld, is dusdanig verfijnd dat hiermee in biologische weefsels en vloeistoffen (bloed, urine) nauwkeurig informatie wordt verkregen over de toxicokinetiek en dynamiek. Een nieuw werkveld, de functional genomics, neemt hierbij een onmisbare plaats in waarbij de toxicologische kennis over metabole routes uit bestaande studies wordt gekoppeld aan de resultaten uit nieuwe studies. Deze methodes lijken bij uitstek geschikt voor het bestuderen van interacties tussen metabole routes bij mengsels van stoffen.

Deze aanpak werd recentelijk gevolgd door dr Stierum e.a. om de combinatie werking van voedingsadditieven nader te bestuderen en daarbij meer inzicht te krijgen in moge-

lijke overlap in werkingsmechanisme in het doelorgaan lever. De uitdaging voor de toekomst in de toxicologie is om inzicht te krijgen in de ingewikkelde mechanismen, en schakelingen die de cel tegelijkertijd activeert en deactiveert⁵. De eerste Nederlandse promovendus op het terrein van de toxicogenomics, Wilbert Heijne, promoveert over 2 weken in Wageningen bij het eerder genoemde kenniscentrum (Heijne et al., 2004).

4.3 Implicaties voor risico evaluatie

Ik hoop dat mijn betoog duidelijk maakt dat er in de afgelopen jaren veel adequaat onderzoek is uitgevoerd op het terrein van de toxiciteit van de chemische mengsels. Het is nog te vroeg om harde conclusies te trekken uit dit, relatief schaarse, onderzoek. Echter vooralsnog blijkt uit de studies dat stoffen die een (deels) vergelijkbaar werkingsmechanisme vertonen, ook gezamenlijke werking in de combinatie zullen vertonen. De gecombineerde werking van het mengsel kan vaak worden voorspeld op basis van dosis-additie. In deze situatie kunnen de blootstellingsniveaus van twee stoffen die de respectievelijke drempelwaarden niet overschrijden een groter nadelig effect vertonen in de combinatie dan verwacht is op grond van deze individuele drempelwaarden.

Gelijktijdige blootstelling aan stoffen met verschillende aangrijpingspunten en verschillende werkingsmechanismen veroorzaakt geen gecombineerd effect zolang de concentraties van de afzonderlijke stoffen maar laag is, dwz. de drempelwaarde niet te boven gaat. Bij blootstelling aan deze stoffen boven de drempelwaarde is er juist dikwijls sprake van interacties.

Een andere belangrijke uitkomst van dit onderzoek is dan ook dat de combinatie effecten bij hoge doseringen niet voorspellend bleken te zijn voor de effecten bij lagere doseringen. Dat betekent dat de interacties waargenomen in proefdieren bij hoge doseringen, niet zonder meer geëxtrapoleerd kunnen worden naar lagere, realistische blootstelling scenario's bij de mens.

Eén van de methodes waarmee het mogelijk is om interacties te voorspellen in de toxicokinetische fase is door z.g. pbbk (physiologically based biokinetic) modellen van afzonderlijke stoffen aan elkaar te koppelen. In een pbbk-model wordt de verdeling van de stof en zijn metabolieten over het lichaam en over organen mathematisch beschreven. Bij het voorspellen van mogelijke interactie tussen 2 stoffen kan de competitie voor een receptor, enzym of transporteiwitten voorspeld worden en vervolgens geëxtrapoleerd worden naar een lage dosis. Deze aanpak wordt gevolgd in de studies van Andreas Freidig bij TNO en in het huidige promotie onderzoek van Maaïke Schutte in Wageningen waarbij voor bekende milieucontaminanten en voor antioxidanten in de voeding interacties worden voorspeld bij realistische lage doseringen (Freidig et al., 2003).

In 2002 verscheen een nieuw rapport van de Gezondheidsraad aangaande de blootstelling aan combinaties van stoffen (GR 2002). De raad adviseert prioriteitstelling waarbij rekening moet worden gehouden met (klassen van) stoffen met een gecombineerde werking. Dit kan door per stof een z.g. "Hazard-Quotient" vast te stellen, waarbij de feitelijke blootstelling wordt gedeeld door een blootstellingslimiet. Vervolgens worden de quotiënten van de combinatie samengevoegd. Bij een overeenkomstig werkingsme-

chanisme gebeurt dit door het sommeren van quotiënten, en bij een verschillende werking door het kiezen van de grootste quotiënt. De gezondheidsraad benadrukt dat de hazard index niet verdisconteert voor de mogelijkheid van interacties en adviseert juist hiervoor, in navolging van de collega's van de EPA, een verfijningslag te introduceren. Bij de EPA wordt gebruikt gemaakt van bewijskracht scores, door voor elk paar van stoffen, gegevens te verzamelen over mogelijke chemisch en toxicologische relevante interacties. De methode dient nader gevalideerd te worden (Mumtaz et al., 1992, 1998) en ook dit type onderzoek zal binnen de leerstoel worden aangepakt. Vergelijkbare aanbevelingen zijn opgesteld door de Deense en Engelse overheid (FSA, 2002, DVA, 2003).

Voor de risicoschatting van chemische mengsels biedt de "hazard index" methode een handvat om relatieve risico's te schatten. De methode gaat echter voorbij aan de mogelijkheid dat interacties tussen stoffen de toxiciteit van het mengsel vergroten of verkleinen. Validatie van methoden die de interactie tussen stoffen kunnen verdisconteren is dan ook gewenst.



Een praktijkvoorbeeld over de prioriterisering van stoffen met mogelijke gecombineerde werking, is de recente evaluatie van de mogelijke combinatiewerking van voedseladdi-

tieven. Hierbij werden 350 verschillende additieven, verdeeld in 65 klassen, beoordeeld op de kans op interacties tussen de klassen. Als uitgangspunt werd verondersteld dat gecombineerde werking mogelijk is, wanneer er sprake is van overeenkomstige doelorgaan met een vergelijkbare werking tussen de stoffen. In de praktijk bleven er slechts 4 additieven over waarbij een kleine, theoretische kans aanwezig was op gecombineerde werking in de lever (Groten et al., 1991). Om deze conclusie te onderbouwen, wordt op dit moment door de Britse Food Standard Agency studies uitgevoerd om het effect van deze combinatie van deze 4 additieven in de praktijk te testen (Stierum et al., 2004). Een vergelijkbare aanpak wordt voorgesteld voor mengsels van pesticiden (FSA, 2002).

Ik refereer ook graag nog even naar een praktijkvoorbeeld uit de golffoorlog dat vandaag in de Volkskrant stond onder de kop "London moet bestaan Golfsyndroom erkennen". In dit artikel wordt gemeld dat Britse regering erkent dat er een verband bestaat tussen de blootstelling in de golffoorlog aan (combinaties van) van o.a. bestrijdingsmiddelen, antibacteriele middelen en uranium en de klachten die soldaten vertoonden, die bekend staan als het Golffoorlogsyndroom (Volkskrant, 2004).

Een interessant praktijkvoorbeeld over de implicatie van de hazard index, was de commotie die ontstond naar aanleiding van een artikel in Science, begin dit jaar, waarin Amerikaanse en Canadese wetenschappers adviseerden om de consumptie van gekweekte zalm te beperken tot een keer per maand. Vergeleken met wilde zalm, bevat gekweekte zalm, die wordt grootgebracht met visvoer, vaak meer verontreinigingen zoals Pcb's, toxafeen, mirex, DDT, lindaan (zogeheten organochloorverbindingen die tot de jaren ze-

ventig van de vorige eeuw veelvuldig werden ingezet als pesticide, en zich via het water en de bodem uiteindelijk opstapelen in vogels, vissen en zoogdieren). De wetenschappers telden de risico's van drie soorten chemicaliën bij elkaar op (dielddrin, toxafeen en pcb's) conform de EPA richtlijn betreffende het gebruik van de "Hazard Index". Echter, hierbij is een kanttekening op zijn plaats. Omdat het werkingsmechanisme van deze drie stofklassen niet zonder meer vergelijkbaar zijn, is het optellen van de kankerrisico's via additie wellicht te conservatief en daardoor lijkt het of de huidige normering in de vis al snel wordt overschreden (Hites et al. 2004, NRC, 2004).

Bovendien zitten aan de consumptie van zalm ook positieve kanten. Van de zogeheten omega-3-vezuren in de vis is bekend, dat ze de kans op hart- en vaatziekten verkleinen. Deze afweging van de veiligheid ("risk") versus de gezondheid ("benefits") van ingrediënten in een voedingsproduct is niet zonder meer mogelijk omdat de voedingskundige advieswaarden van macronutriënten en de veiligheids-grenswaarden van contaminanten niet op een vergelijkbare manier worden afgeleid met vergelijkbare onzekerheidsfactoren. Persoonlijk denk ik dat door toepassing van de chip technologie en metabolomics de grens tussen voedingsfysiologie en toxicologie vervagen (Ommen en Groten, 2004). Deze risk-benefit benadering is ook een van speerpunten van het huidige Europese nutrigenomics onderzoek aangevoerd door Dr van Ommen van TNO. Ook speelt mee dat de gezondheidsbevorderende of beperkende eigenschappen van producten als vis, fruit, groente wellicht voortkomt uit de gezamenlijke werking van een macronutriënten cocktail, terwijl de risico's van contaminanten juist worden afgeleid voor de afzonderlijke stoffen. Iets dat in de toekomst beter geanalyseerd dient te worden.

Bij de evaluatie van het "risk-benefit" profiel van stoffen in onze voeding is het te adviseren om de gezamenlijke werking van macronutriënten en/of contaminanten in beschouwing mee te nemen.



4.4 Op weg naar de volgende queeste?

De zoektocht van meer dan 15 jaar heeft veel kennis opgeleverd over de manier waarop mengsels een gecombineerde werking vertonen. Door het gebruik van deze in vitro- en moleculaire technieken wordt het mogelijk om tegelijkertijd veranderingen in eiwit en genexpressie door toxicologische agentia te meten en, samen met de kennis over metabole routes en computer modelering, dit te vertalen in een netwerk van onderlinge processen/reacties. Door integratie van deze verschillende onderzoeksdisciplines ontstaat een nieuw toxicologisch werkveld aangeduid als *geïntegreerde toxicologie*. Een belangrijk deel van het onderzoek binnen de leerstoel zal gewijd zijn aan het werkveld van de geïntegreerde toxicologie. De doelstelling daarbij is om de toepassing van de moleculaire toxicologie en de combinatie-toxicologie voor de analyse van interacties tussen stoffen te intensiveren en een voorspelling te geven voor de cumulatieve risico's na combinatieblootstelling.

De zoektocht in de combinatietoxicologie, die 15 jaar geleden gestart is door mijn illustere voorgangers, zal dan ook worden voortgezet in een nieuwe queeste, waarbij de moleculaire biologie, de statistiek, de toxicologie en de bioinformatica geïntegreerd zullen worden.

Vrienden van het nieuwe genootschap, maakt u klaar voor een uitdagende reis...



Tot slot kom ik nog even terug op de samenwerking tussen TNO en de universiteit. In alle voorbeelden die ik u vandaag heb getoond, is er sprake van verschillende gradaties in de kennisontwikkeling. Het onderzoek wordt opgestart aan de fundamentele zijde binnen de muren van de universiteit en gaandeweg zullen een aantal van deze kennisprojecten worden toegepast bij TNO in samenwerking met bedrijven. Zo functioneert ook de samenwerking op het terrein van de toxicologie. Met de opgedane kennis over het gebruik van in vitro transport systemen, farmacokinetiek en moleculaire toxicologie worden nieuwe modellen en inzichten verworven in de toxicologie die uiteindelijk weer ten dienste staan van het bedrijfsleven. Juist omdat TNO en WUR kiezen om deze kennis te focuseren op een werkgebied, in dit geval dat van de toxicologie, is er sprake van een samenwerking met voldoende kritische massa. Dat de samenwerking succesvol is, blijkt bijv. uit het feit dat er sinds de oprichting van het Centrum, elke jaar weer nieuwe promovendi binnen het centrum starten en alle oud-ai-o's vinden snel een nieuwe baan bij TNO of elders. Daarbij sluit het kenniscentrum goed aan bij ander precompetitief onderzoek in de "food-valley" op het terrein van voedselkwaliteit, microbiologie en gezondheid. Een goed uitgangspunt voor een gezonde toekomst in een "post Wijffels" periode (Wijffels et al., 2004).

Dankwoord

Aan het eind van deze rede wil ik graag nog enkele woorden van dank uitspreken naar een aantal mensen.

Meneer de Rector, geachte leden van het bestuur van het LIFT fonds, en de leden van de benoemingsadviescommissie,

Ik dank u voor het vertrouwen dat u in mij heeft gesteld en dat geleid heeft tot deze benoeming.

Geachte leden van de Raad van Bestuur van TNO en de directie van het kerngebied Kwaliteit van Leven,

Ik ben u buitengewoon dankbaar dat u de relatie tussen TNO en universiteit zo stimuleert en koestert en mij de gelegenheid biedt daarin te participeren. In het bijzonder voor zeergeleerde Colijn en Snoeij, beste Tiny en Niek, ik stel jullie directe betrokkenheid met dit vakgebied enorm op prijs en ik heb er vertrouwen in dat we "deze nieuwe kar" op succesvolle wijze zullen voorttrekken. Hooggeleerde Pot, Beste Frank, ik beschouw het als een grote eer dat je vandaag deel wilde uitmaken van het Cortège.

Wageningse Collegas en studenten in de leerstoelgroep Toxicologie en het departement Agrotechnologie en Voedingswetenschappen,

Ik hoop op vele toekomstige samenwerkingen met sterke synergie tussen gecombineerde disciplines. De queeste is begonnen!

Zeer geleerde oud- en nieuw Promovendi Cassee, Duizer, Oomen, Dulfert, Verweij, Heijne en Schutte, Dank voor uw genoegelijke samenwerking in Wageningen en Utrecht. Volharding is een kernwoord voor een onderzoeksbaan in deze

Collega's van TNO Voeding,

Een medewerker van TNO in Zeist legt zijn ene oor te luister in de wetenschap terwijl het met zijn ander oor een klant te woord staat. Dit vergt echt bijzonder talenten van u allen en ik weet dat uit ervaring. Uw voortdurende drang naar innovatie en de toepassing daarvan geef momenten van ultieme "flow" (Csikszentmihalyi, 2003). Via de samenwerking met Wageningen UR ga ik proberen die kennisbeweging te onderhouden en waar mogelijk samen met u te verbreden.

Graag ook een woord van dank naar mijn leermeesters.

Hooggeleerde Koeman, beste Jan

Als student was ik tijdens jouw college niet alleen diep onder de indruk van je zeer bekwame manier van doceren, maar tevens van je brede kennis van het vakgebied. Wellicht dat jij, als eerste voorzitter van de NVT, aan de basis staat van mijn grote interesse in de toxicologie.

Hooggeleerde Feron, beste Vic

Jouw pionierswerk in de mengseltoxicologie bij TNO is van onschatbare waarde geweest voor het vakgebied wereldwijd. Daarnaast was jij het die op de meest aimabele en gezond kritische wijze in staat was om hazard aarf risk evaluatie te koppelen. Je bent daarin echt een kei. En dat is in mijn hoofd geprent.

Hooggeleerde van Bladeren, beste Peter

Jij was het die me overhaalde om terug te komen uit Amerika voor een baan in Nederland, in Wageningen notabene! Wellicht had mijn loopbaan zonder jou er wel heel anders uitgezien, maar ik heb er geen moment spijt van ge-

had. Ik zie er dan ook naar uit om hier in Wageningen de samenwerking als bijzonder hoogleraar duo te kunnen voorzetten.

Hooggeleerde Rietjens, beste Ivonne,

Peter was snel, jij bent soms nog sneller. Ik geniet van onze levendige voortgangsoverleggen. Hopelijk houden de aio's ons een beetje in toom.

Met jou als de huidige voorzitter van de NVT, verkeer ik in elke geval goed gezelschap. Het wordt een super tijd, ik voel dat ...

Weledele Heer Groten, beste pap,

Wellicht dat je dit al voor ogen had toen je me 29 jaar geleden afleverde op Gymnasium Rolduc en later in het kraakpand in Wageningen. De volharding om dit te verwezenlijken heb ik van jou en ik ben er trots op.

Beste familie en vrienden,

Dank voor je aanwezigheid en steun hier en op andere plaatsen!

Lieve Miel, Stijn, en Finn,

Het domme professortje heeft zijn verhaaltje gedaan. En vanaf nu mogen jullie me niet meer plagen.

Zeergeleerde Janssen, lieve Bernie,

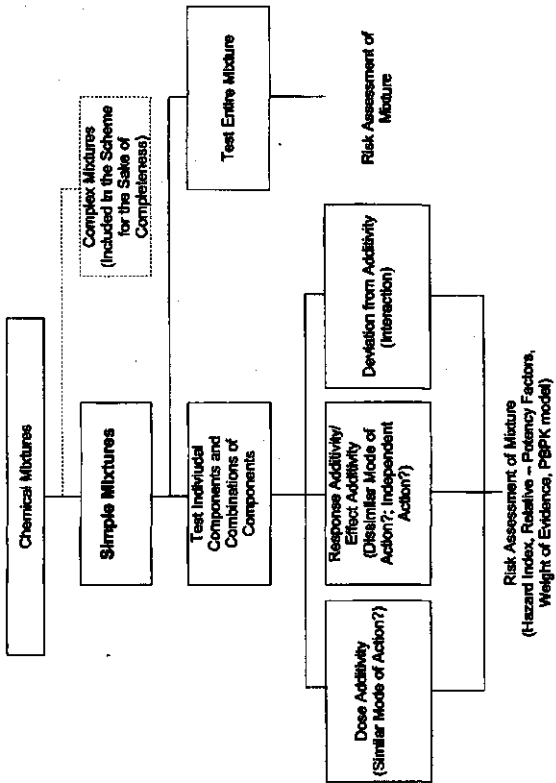
Als een ieder eens wist hoe zeer jij aan de basis staat van mijn reilen en zeilen, dan hadden ze beter jou tot hoogleraar kunnen benoemen. Ik zal proberen deze klus "ons waardig" te klaren.

Beste mensen, ik dank u voor uw aandacht,
De cocktails staan beneden voor u klaar en vergeet daarbij
voor een moment de mogelijke gecombineerde werking
daarvan !

Ik heb gezegd.

Noten

1. Schema voor evaluatie van toxiciteit van simpele mengsels.



2. Begrippen in de combinatietoxicologie

Voor het beschrijven van de gecombineerde werking van stoffen wordt een groot aantal begrippen gehanteerd, die zijn terug te voeren naar de definities van mathematici uit de jaren '50 voor additie (het optellen van effecten) en interactie. Een en ander is terug te voeren op het feit dat vanuit verschillende disciplines (farmacologie, toxicologie, statistiek, epidemiologie, radiobiologie) en vanuit verschillende theorieën wordt getracht de effecten van combinaties van stoffen te beschrijven. In de voetnoot zijn alle gangbare definities weergegeven. Een kwantitatieve uitspraak over de mate van interactie is alleen mogelijk als de dosis-effect relaties van de afzonderlijke stoffen en het mengsel bekend zijn en worden getoetst met behulp van een mathematisch model waarin interactie op een bepaalde manier kwantitatief gedefinieerd is. Het merendeel van de studies is echter niet ontworpen voor een kwantitatieve evaluatie van combinatie-toxiciteit (Groten et al., 2001)

Interacties

Van groot belang is of een mengsel van stoffen een interactie vertoont, dat wil zeggen dat het gecombineerde effect van de stoffen groter of kleiner is dan op grond van de toxiciteit van de afzonderlijke stoffen verwacht zou worden. Studies uitgevoerd met mengsels van stoffen -veelal betreffen dit binaire mengsels - hebben altijd een uitspraak over wel of niet vermeende interactie tussen de stoffen tot gevolg. Of de gecombineerde werking van stoffen wordt gekenmerkt als een interactie, hangt echter, altijd af van het referentiepunt, dat wil zeggen de definitie van 'geen-interactie' (de nulhypothese). Er is sprake van interactie als het effect van het mengsel significant afwijkend is van hetgeen op basis van de gemiddelde effecten van de afzonderlijke stoffen kan worden voorspeld. Bij een grote positieve afwijking van de nulhypothese wordt in de toxicologie vaak gesproken van 'synergisme'. Een negatieve afwijking van geen-interactie wordt in het algemeen betiteld als 'antagonisme'. Afhankelijk van de definitie van geen-interactie (bijvoorbeeld dosis- of effectadditie) kunnen dezelfde stu-

dieresultaten tot verschillende uitspraken leiden. Duidelijke begrippenkaders voor de combinatiewerkingen tussen stoffen werden gegeven door Bliss en in navolging hiervan, later door Hewlett en Plackett. Het onderstaande overzicht van mogelijke combinatiewerkingen gaat uit van het begrippenkader gehanteerd door Plackett & Hewlett (1952, zie ook Cassee et al., 1998).

Dosis-additie of concentratie-additie

Dit is het fenomeen dat de verschillende stoffen in een mengsel zich gedragen als ware het verdunningen van eenzelfde stof. Dosis-additie komt overeen met 'simple, similar action' zoals gehanteerd wordt door Finney, en Hewlett en Plackett. De aanname die aan dosis-additie ten grondslag ligt is dat de stoffen op vergelijkbare wijze op eenzelfde biologisch systeem (receptor, enzyme, orgaan) werken. Hieruit volgt dat de variaties voor gevoeligheid voor de toxicanten als compleet positief gecorreleerd wordt verondersteld ($r = 1$). De bijdrage van de stoffen aan de uiteindelijke respons is afhankelijk van de individuele potentie. Een belangrijke aanname hierbij is dat de relatieve potentie van de mengselcomponenten gelijk is bij de verschillende doseringsniveaus. Dosis-additie kan theoretisch gezien dus optreden bij alle dosisniveaus, ook bij dusdanig lage doseringen dat er geen effecten voor de afzonderlijke stoffen waarneembaar zijn. Door het optreden van dosis-additiviteit kunnen stoffen op doseringen die afzonderlijk niet tot effecten leiden, in een mengsel wel toxisch zijn.

Respons-additie of effect-additie

Dit zijn termen die vergelijkbaar zijn met "independent action" zoals beschreven door Plackett en Hewlett. De gecombineerde werking van stoffen wordt verkregen door de response van de afzonderlijke stoffen te sommeren. Respons-additiviteit is gebaseerd op de aanname dat de afzonderlijke stoffen op geheel verschillende fysiologische systemen werken, of op hetzelfde fysiologische systeem werken maar functioneel onafhankelijk zijn. Stoffen zullen echter alleen additief werken als de afzonderlijke stoffen de tolerantie-drempel overschreden hebben. Dit wil zeggen dat de afzonderlijke stoffen alleen responsadditief werken als zij zelf al een effect bewerkstelligen.

Bliss wees erop dat respons op blootstelling aan twee verschillende stoffen niet alleen afhankelijk is van de respons op de afzonderlijke stoffen, maar ook van de correlatie die bestaat tussen de individuele toleranties. Deze kan variëren van compleet positief ($r = +1$) tot compleet negatief ($r = -1$). In geval van een compleet positieve correlatie zal een individu dat het meest gevoelig is voor de ene stof, ook het meest gevoelig zijn voor de andere stof. Omgekeerd zal bij een compleet negatieve correlatie een individu dat het meest gevoelig is voor de ene stof, het minst gevoelig zijn voor de andere stof.

3. Isobologram

In een isobologram geeft een rechte lijn, de isobole, eenzelfde toxicologische respons weer bij verschillende combinaties van doseringen van twee toxicanten. Door uit te gaan van een gelijk effect (iso-effect) niveau wordt het aantal variabelen (dosis stof 1, 2 en effect) gereduceerd van drie naar twee (dosis 1 en 2). Hierdoor is een tweedimensionale weergave mogelijk. Afhankelijk van waar het isoeffect niveau van de combinatie van twee stoffen zich bevindt, den is er sprake van versterking (synergisme) den wel verzwakking (antagonisme) van het effect. Bovendien werkt de methode alleen bij duidelijke effect niveau's (Groten et al., 2001; Cassee et al., 1998).

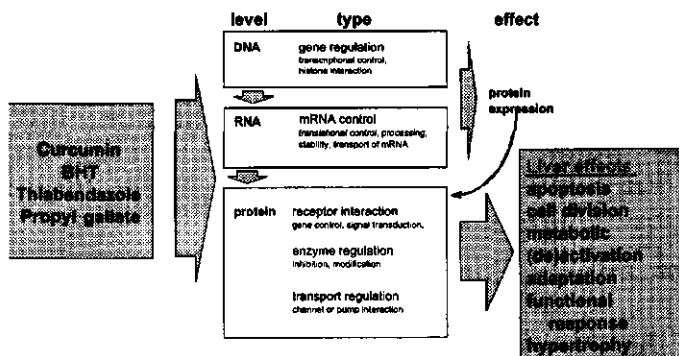
4. Response-surface analyse

Isobogrammen hebben als nadeel dat veel experimentele data punten verzameld moeten worden, terwijl slechts beperkt aantal gebruikt worden voor samenstellen iso-effects curve. Bovendien is aanvullende statistische analyse nodig om "deviatie van additiviteit" te kwantificeren. Bij de response-surface wordt een op statistiek gebaseerd mathematische vergelijking tussen dosis en effect opgesteld (Suhnel, 1992, Carter & Gennings, 2002). Voordeel hiervan dat alle experimentele data punten worden gebruikt en niet per se de dosis-effect curves van alle individuele stoffen in het mengsel bepaald dienen te worden (Groten et al., 2001).

5. Evaluatie van lever toxiciteit van mengsels van voedseladditieven met behulp van functional genomics (Stierum et al., 2004).

A functional genomics approach:

Integrate cellular responses of mixtures of food additives

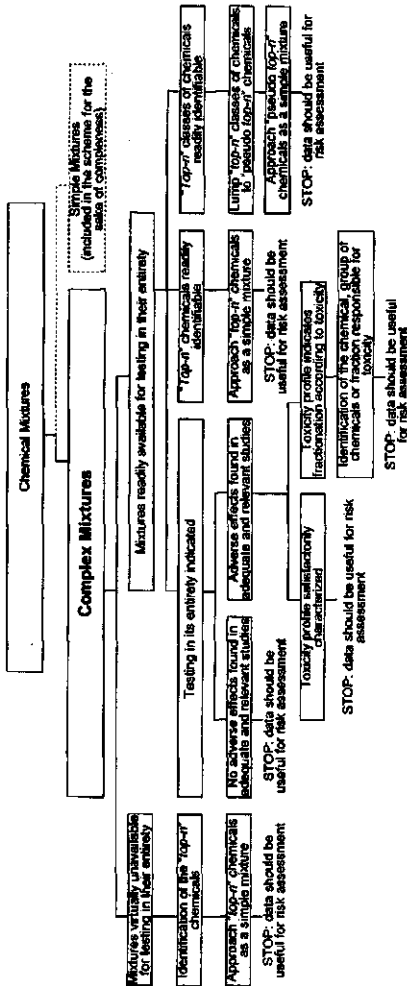


6. Toxiciteit van complexe mengsels

In tegenstelling tot gedefinieerde mengsels, is van complexe mengsels de precieze samenstelling niet bekend. Complexe mengsels kunnen uit tientallen of honderden stoffen bestaan en kunnen afkomstig zijn uit eenzelfde bron of van verschillende bronnen. Soms zijn de bestudeerde complexe mengsels vanuit epidemiologisch onderzoek al aangemerkt vanwege effecten op de volksgezondheid, zoals mengsels van polycyclische koolwaterstoffen (PAKs), sigarettenrook, fijnstof en diesel emissies. Toxiciteitsstudies met complexe mengsels richten zich op het karakteriseren van de toxiciteit van het mengsel als geheel. Elke studie wordt per definitie met een, weliswaar vergelijkbaar, maar verschillend mengsel uitgevoerd. Door de slechte mengselkarakterisatie zijn toxiciteitsstudies met complexe mengsels ongeschikt om de toxiciteit van het mengsel te verklaren of te voorspellen op grond van de bekende mengselcomponenten (Feron en Groten, 2002). In de bijbehorende figuur is dit schematisch weergegeven. Patroonherkenningstechnieken kunnen worden gebruikt om in bestanden met samenstellings- en toxiciteitsgegevens van meng-

sels andere mengsels identificeren. Bovendien kan met deze techniek de toxiciteit van mengsels worden afgeleid uit fysisch-chemische gegevens en toxiciteitgegevens van andere mengsels. Collega Professor Ingvær Eide werkzaam bij Statoil heeft dit toegepast voor verschillende olie destillaten en dieseluutlaatgas (Eide, 1998).

Schema voor evaluatie van toxiciteit van complexe mengsels (Groten et al., 2001).



Referenties

- Bain and Company , 2003. Has the pharmaceutical blockbuster model gone bust? Persbericht door Cheryl Krauss, Bain&Company (www.bain.com).
- Betz W., 2002. Herbal Crisis In Europe: A review of the Epidemic of Renotoxicity from Chinese Herbal Remedies. *The Scientific Review of Alternative Medicine*, 4, 23- 27.
- Box, G.E., Hunter, W.G. and Hunter, J.S., 1978. *Statistics for Experimenters*. p.653. Wiley, New York.
- Bliss, C.I. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol.* 26, 585-615, 1939.
- Bukowski, J.A., Lewis, R.J., 2000. Hormesis and health. *S.Med. J.*, 93, 371-377.
- Csikszentmihalyi, Mihaly. 2003. *Flow*. Boom Uitgevers
- Carter, W.H. and Gennings, C., 2001, Response surface methodology for analyzing data from chemical mixture studies. In *Application of Technology to Chemical Mixture Research*, Conference on Application of Technology to Chemical Mixtures Research, January 9-11, 2001, National Institute of Environmental Health Sciences & Colorado State University, Fort Collins. Abstract Book, Abstract S-21.
- Cassee, F.R., Arts, J.H.E., Groten, J.P. and Feron, V.J., 1996. Sensory irritation to mixtures of formaldehyde, acrolein and acetaldehyde in rats. *Arch. Tox.* 70, 329-337.

Cassee, F.R., Groten, J.P., van Bladeren, P.J. and Feron, V.J., 1998. Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. *Crit.Rev.Tox.* 28, 73-101.

De Bruijn, S.M., 1999. Paracelsus. *Refermatisch dagblad*. 27 April 1999, Bron; G.A. Lindeman. *Inleiding tot de geschiedenis der geneeskunde* (1993), door G. A. Lindeboom, uitg. Erasmus Publishing, Rotterdam.

DVA, Danish Veterinary and Food Administration, Combined actions and interactions of chemicals in mixtures, The toxicological effects of exposure to mixtures of industrial and environmental chemicals, *FødevareRapport 2003:12*, 1st Edition, 1st Circulation, August 2003.

Ebers, 1937. The papyrus Ebers. The greatest Egyptian Medical document. Translated by B. Ebbell. Copenhagen, Levin & Munksgaard, 1937.

Eide, I. et al., 2001. Resolution of GC-MS data of complex PAC Mixtures and regression modeling of mutagenicity by PLS. *Environ. Science Tech.*

ECN, 2002. *European Chemical News*, 4-10, 21-23.

EPA 1986. Guidelines for the health risk assessment of chemical mixtures. Federal register 51 (185).34014-34025. US Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

Finney, D.J., The analysis of toxicity tests on mixtures of poisons. *Ann. Appl. Biol.* 29, 82-94, 1942.

Feron, V.J., Groten, J.P., Jonker, D., Cassee, F.R. and van Bladeren P.J., 1995. Toxicology of chemical mixtures: challenges for today and the future. *Toxicology* 105, 415-427.

Feron V.J., Groten J.P., 2002. Toxicological evaluation of chemical mixtures. *Fd Chem Tox.* 40, 825-839.

Feron, V.J., Cassee, F.R. and Groten, J.P., 1998. Toxicology of chemical mixtures: international perspective. *Environ.Hlth Perspect.* 106 (Supplement 6), 1281-1289.

Food Standards Agency, Risk Assessment of mixtures of pesticides and similar substances, Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment, FSA/0691/0902, 2002.

Freidig, A.P., Bogaards, J.P.P., Bouzom, F., Jochemsen, R., 2003. Evaluation of in vitro drug interaction data using PBPK models. *ISSX Proceedings 2003.*

Gennings, C., 1996. Economical designs for detecting and characterizing departure from additivity in mixtures of many chemicals. *Fd Chem. Toxicol.* 34, 1053-1059.

Gennings, C. and Carter, W.H. Jr., 1995. Utilizing concentration-response data from individual components to detect statistically significant departures from additivity in chemical mixtures. *Biometrics* 51, 1264.

GR, 1985. Gecombineerde blootstelling aan meerdere stoffen vanuit het milieu. In: Advies inzake uitgangspunten voor normstelling. De inzichtelijke opbouw van advieswaarden voor niet-mutagene, niet-carcinogene en niet-immunotoxische stoffen. Gezondheidsraad, Den Haag, 1985, p. 103-118.

GR, 2002. Blootstelling aan combinaties van stoffen: een systematiek voor het beoordelen van gezondheidsrisico's. Gezondheidsraad: Den Haag, 2002; publicatie nr 2002/05.

Groten, J.P., Schoen E.D., Feron V.J., 1996. Use of factorial designs in combination toxicity studies. *Fd Chem. Toxicol.* 34, 1083-1091.

Groten, J.P., Schoen E.D., van Bladeren P.J., Kuper C.F., van Zorge J.A. and Feron V.J., 1997. Subacute toxicity of a combination of nine chemicals in rats: detecting interactive effects with a two-level factorial design. *Fund.Appl.Tox.* 36, 15-29.

Groten, J.P., Cassee, F.R., van Bladeren, P.J., DeRosa, C. and Feron, V.J., 1999. Mixtures. In *Toxicology*, ed. H. Marquardt, S. G. Schäfer, R. McClellan and F. Welsch. pp. 257-270. Academic Press, San Diego.

Groten, J.P., 2000. Mixtures and interactions. *Fd.Chem.Tox.* 38. (Supplement 1), S65- S71.

Groten, J.P., Butler W., Feron V.J., Kozianowski G., Renwick A.G. and Walker R., 2000. An analysis of the possibility for health implications of joint actions and interactions between food additives. *Reg.Tox Pharm.* 31, 77-91.

Groten, J.P., Feron V.J. and Sühnel J., 2001. Toxicology of simple and complex mixtures. *Trends in Pharmacological Sciences* 22, 316-322.

Groten, J.P., Heijne, W.H.M., Stierum, R.H., Freidig, A.P., Feron, V.J., 2004. Toxicology of chemical mixtures: a challenging quest along empirical sciences. *Environ.Tox. Pharm*, in press.

Hites, R.A., Foran, J.A., Carpenter, D.O., Coreen Hamilton, M., Knuth, B.A., Schwager, S.J., Global assessment of organic contaminants in farmed salmon, 2004, *Science*, 303, pp. 226-229.

Hermens J., 1983. Quantitative structure toxicity relationships and mixture toxicity studies of aquatic pollutants. Proefschrift, Universiteit van Utrecht.

- Heijne, W., 2004. Toxicogenomics; Applications of new functional genomics technologies in toxicology, Proefschrift Wageningen Universiteit.
- Ishigam, M. Uchiyama, T. Kondo, H. Iwabuchi, S. Inoue, W. Takasaki, T. Ikeda, T. Komai, K. Ito, and Y. Sugiyama., 2001. Inhibition of in vitro metabolism of simvastatin by itraconazole in humans and prediction of in vivo drug-drug interactions. *Pharm.Res.* 18 (5), 622-631.
- IPCS, 1987. Principles for the safety assessment of food additives and contaminants in food. *Environmental Health Criteria No. 70.* International Programme on Chemicals Safety, WHO, Geneva.
- IPCS, 1994. Assessing human health risk: derivation of guidance values for health-based exposure limits *Environmental Health Criteria No. 170.* International Programme on Chemicals Safety, WHO, Geneva.
- Jonker, D., Woutersen, R.A., van Bladeren, P.J., Til, H.P. and Feron, V.J., 1990. 4-Week oral toxicity study of a combination of eight chemicals in rats: comparison with the toxicity of the individual chemicals. *Fd. Chem. Tox.* 28, 623-631.
- Jonker, D., Woutersen, R.A. and Feron, V.J., 1996. Toxicity of mixtures of nephrotoxicants with similar and dissimilar mode of action. *Fd Chem.Tox.* 34, 1075-1082.
- Könemann, H., 1980. Structure-activity relationships for kinetics and toxicity of aquatic pollutants and additivity in fish toxicities of environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ Safety* 4, 415-421.
- Lord, P.G., Papoian, Th., 2004, *Genomics and Drug Toxicity*, Science, 306, 575

Mumtaz, M.M, DeRosa, C.R., Groten, J.P., Feron, V.J., Hansen, H. and Durkin, P.R.,1998. Evaluation of chemical mixtures of public concern: estimation vs. experimental determination of toxicity. *Environ.Hlth Persp.* 106, 1353-1361.

Mumtaz, M.M. and Durkin, P.R., 1992. A weight of evidence approach for assessing interactions in chemical mixtures. *Toxicology and Industrial Health* 8, 377-406.

Narotsky, M.G. et al., 1995. Non-additive developmental toxicity of mixtures of trichloroethylene, (di(2-ethyl-hexyl)phtalate, and heptachlor in a 5x5x5 design. *Fund. Appl. Toxicol.* 27, 203-216.

NRC Handelsblad. Te veel gif in gekweekte Schorse zalm?, Pagina 1, bijlage 1, 13 januari 2004.

NRC Handelsblad. Universiteiten zien af van dure uitgaven, Pagina 1, 17 November 2004, .

NVT, 2004. Jaarverslagen en persoonlijke communicatie van M. Kooistra, Bureau Registratiecommissie toxicologie, KNCV.

Ommen, B. and Groten J.P., 2004. Nutrigenomics in efficacy and safety evaluation of food components. In: *Nutrigenetics and Nutrigenomics.* World Rev. Nutr. Diet, Basel, Karger, 93, 134-152

Plackett, R.L., Hewlett, P.S., 195. Quantal responses to mixtures of poisons. *J. Roy. Stat.Soc. Series B*, 14, 143-163

RIVM, 2004. Ons eten gemeten. Gezonde voeding en veilig voedsel in Nederland. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. Bilthoven, 2004.

- Rietjens, I.M.C.M., 1997. Fundamentele genoegens. Inaugurele rede, uitgesproken op 19 december 1997. Landbouwniversiteit Wageningen.
- Schoen, E.D., 1996. Statistical designs in combination toxicology: a matter of choice. *Fd Chem Tox.*, 34, 1059-1065.
- Schoen, E.D., 2000. Issues in applying statistical design of experiments. With special reference to toxicology of mixtures. Proefschrift Technische Universiteit Eindhoven.
- Sühnel, J., 1992. Assessment of interaction of biologically active agents by means of the isobole approach: fundamental assumptions and recent developments. *Archives of Complex Environmental Studies* 4, 35-47.
- Sühnel, J., 1992. Zero interaction response surfaces, interaction functions and difference response surfaces for combinations of biologically active agents. *Drug Res.* 42, 1251-1258.
- Sühnel, J., 1996. Zero interaction response surfaces for combined-action assessment. *Fd Chem. Tox* 34, 1151-1153.
- Stara, J.F., Hertzberg, R.C., Bruins, R.J., Dourson, M.L., Durkin, P.R., Erdrich, L.S., Pepekko, W.E., 1995. Approaches to risk assessment of chemical mixtures. In: *Chemical Safety Regulation and Compliance*. Ed. Homburger, F., Marquis, J., Published by S.Karger, Basel.
- Stierum, R., A. Conesa, Bv Ommen, R.Price, C. Merdedith, B.Lake. J. Groten., 2004. Transcriptome analysis provides new insights into liver effects induced inrats upon 4-wk dietary administration of the food additives BHT, curcumin, thiabendazole and propyl gallate. *Tox. Sciences*. submitted

Tajima, O., Schoen, E.D., Feron, V.J., and Groten, J.P., 2002. Statistically designed experiments in a tiered approach to screen mixtures of Fusarium mycotoxins for possible interactions. *Fd Chem. Toxicol.*, 40, 685-695.

Volkskrant. London moet bestaan Gultsyndrome erkennen. Pagina 5, 18 November 2004.

Wijffels H.H.F. et al., 2004. De kracht van directe verbindingen. Ad-hoc commissie 'Brugfunctie TNO en GTI's' (de Commissie Wijffels) 14 mei, 2004, Den Haag, Ministerie OCW.