

## SZACOWANIE RYZYKA DLA ŁĄCZNEGO NARAŻENIA NA POZOSTAŁOŚCI PESTYCYDÓW W ŻYWNOSCI

### RISK ASSESSMENT FOR CUMULATIVE EXPOSURE TO PESTICIDE RESIDUES IN FOOD

Grażyna Kostka, Katarzyna Urbanek-Olejnik, Monika Liszewska

Zakład Toksykologii Środowiskowej  
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Państwowy Zakład Higieny, Warszawa

**Słowa kluczowe:** pozostałości pestycydów, żywność, NDP, ocena ryzyka, łączne narażenie, mechanizm/charakter działania (MOA)

**Key words:** pesticide residues, food, MRL, risk assessment, cumulative exposure, mechanism/mode of action (MOA)

#### STRESZCZENIE

Badania monitorowe żywności wskazują, że człowiek jest stale narażony na pozostałości środków ochrony roślin (pestycydów) występujące w produktach spożywczych dostępnych w obrocie. Stąd szacowanie ryzyka dla konsumentów związanego ze spożywaniem produktów zawierających pozostałości substancji czynnych pestycydów, stanowi kluczowy etap zarówno procedury rejestracji pestycydów jak i urzędowej kontroli żywności. Jednak w wielu przypadkach dochodzi nie tylko do narażenia na pojedyncze substancje czynne, ale również na mieszaninę pozostałości pestycydów. Poziomy te są zwykle niskie, poniżej skutecznego działania i interakcje takie jak synergizm lub potencjacja nie są spodziewane. Jednocześnie dane literaturowe wskazują, że dla mieszanin charakteryzujących się wspólnym MOA (Mode of Action/Mechanism of Action) nawet przy uwzględnieniu niskich poziomów stężeń współwystępujących pozostałości pestycydów, istnieje duże prawdopodobieństwo wystąpienia działania addytywnego. Stąd szacowanie ryzyka zdrowotnego dla konsumentów narażonych na te mieszaniny (ryzyko skumulowane/łączne) staje się potrzebą chwili. Podjęte inicjatywy na poziomie UE, nad wypracowaniem właściwej metodologii dla szacowania skumulowanego/łącznego ryzyka umożliwiły znaczny postęp w tym zakresie. W artykule omówiono aspekty szacowania skumulowanego ryzyka dla konsumentów związanego z narażeniem na mieszaninę pozostałości pestycydów w żywności.

#### ABSTRACT

The results of food monitoring studies indicate that humans are constantly exposed to residues of plant protection products (pesticides) in marketed food products. Hence, assessment of the risk to consumers associated with the consumption of products containing residues of the active substances of pesticides is a key stage in both the registration of pesticides and official control of foodstuffs. However, there are frequent cases of exposure not only to individual active substances but also to mixtures of pesticide residues. These levels are usually low, below of effective action, and interaction such as synergism or potentiation is not expected to occur. At the same time, literature data indicate that for mixtures sharing a common MOA (Mode of Action/Mechanism of Action), the probability of additive effects is high, even after adjusting for the low levels of the mixed pesticide residues present. Accordingly, health risk assessment for consumers exposed to such mixtures (cumulative/aggregate risk) has become an issue of topical importance. EU-level initiatives regarding the development of appropriate methodology for the estimation of cumulative/aggregate risk have brought about considerable progress in this area. The article discusses various aspects of estimation of cumulative risk for consumers associated with exposure to mixtures of pesticide residues in food.

#### WSTĘP

Chemiczne środki ochrony roślin (pestycydy) stanowią szczególną grupę substancji, na które narażony jest czło-

wiek. Obok niezaprzeczalnych korzyści, jakie niesie ich stosowanie w rolnictwie mogą mieć jednocześnie niepożądany, negatywny wpływ na zdrowie ludzi poprzez zanieczyszczenie gleby, wody, powietrza jak również żywności.

**Adres do korespondencji:** Grażyna Kostka, Zakład Toksykologii Środowiskowej, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny, 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, tel. 22 54 21 356 fax 22 849 74 41, e-mail: gkostka@pzh.gov.pl

Obowiązująca w Unii Europejskiej strategia bezpieczeństwa żywności nakłada na Państwa Członkowskie obowiązek prowadzenia programów monitoringu i urzędowej kontroli żywności pod kątem zanieczyszczeń, w tym pozostałości pestycydów zgodnie z najwyższymi dopuszczalnymi poziomami pozostałości, NDP (ang. MRL, *Maximum Residue Level*). Ich celem jest szacowanie rzeczywistego pobrania pestycydów i dokonywanie na tej podstawie oceny ryzyka dla konsumentów, związanego z narażeniem krótkoterminowym (ostrym) i przewlekłym. Należy jednak podkreślić, że wyznaczone i obowiązujące wartości NDP nie są granicą bezpieczeństwa. Bezpieczny poziom pozostałości pestycydów może być wyznaczony na podstawie Akceptowanego Dziennego Pobrania, ADI (ang. *Acceptable Daily Intake*) lub Ostrej Dawki Referencyjnej, ARfD (ang. *Acute Reference Dose*), odpowiednio dla przewlekłego i ostrego narażenia. Jeżeli w procedurze oceny ryzyka, wartość oszacowanego narażenia konsumentów na pozostałości określonego pestycydu, wyrażanego w mg/kg m.c. x dzień<sup>-1</sup> nie przekracza 100% wartości ADI lub ARfD, to takie pozostałości pestycydów są uważane za dopuszczalne, nie stwarzające zagrożeń dla zdrowia.

Opublikowane w 2007 roku przez Unię Europejską wyniki skoordynowanych badań monitoringowych [3] przeprowadzonych w krajach Wspólnoty, Norwegii, Islandii i Lichtenstein, obejmujące kilkadziesiąt tysięcy próbek żywności wykazały, że 53-64% z nich nie zawierało pozostałości pestycydów powyżej granicy ich oznaczalności. W 32-42% próbek, obecność pozostałości pestycydów była na poziomie niższym niż NDP; przekroczenia NDP dotyczyły 3,0 – 5,5% przebadanych próbek. Jednocześnie w próbkach, w których oznaczone pozostałości pestycydów nie przekraczały NDP, w ponad 20% z nich stwierdzono więcej niż jedną substancję czynną. Wyniki te wskazują, że narażenie konsumentów na pestycydy może być rozpatrywane, jako konsekwencja spożycia określonego, pojedynczego produktu zawierającego pozostałości różnych pestycydów i/lub spożycia kilku produktów zawierających pozostałości wielu lub pojedynczego pestycydu. Tym samym pojawiła się konieczność wprowadzenia do rutynowej oceny ryzyka przeprowadzanej zarówno na etapie rejestracji substancji czynnej, jak i urzędowej

kontroli żywności, szacowania skumulowanego ryzyka, związanego z narażeniem konsumentów na mieszaninę pozostałości pestycydów występującą w produktach spożywczych.

W procedurze skumulowanego ryzyka niezbędna będzie ocena łącznej toksyczności takiej mieszaniny, uwzględniająca prawdopodobieństwo wzajemnych oddziaływań, interakcji jak również ilościowe różnice w skutkach interakcji wynikające ze zróżnicowanych poziomów stężeń pozostałości pestycydów w określonym produkcie spożywczym. Pozwoli to na zdefiniowanie zagrożeń, co w połączeniu z oceną łącznego narażenia (ostrego i przewlekłego) umożliwi z kolei określenie prawdopodobieństwa wystąpienia niekorzystnych skutków zdrowotnych związanych z pobraniem wraz z żywnością mieszaniny pestycydów.

## ŁĄCZNE DZIAŁANIE TOKSYCZNE

Ocena łącznego działania toksycznego dwóch lub więcej substancji chemicznych (toksyczność mieszaniny) jest jednym z podstawowych, ale równocześnie niezmiernie trudnym do rozstrzygnięcia problemem w toksykologii. Ten rodzaj działania toksycznego może być rozpatrywany w aspekcie działania niezależnego poszczególnych składników mieszaniny i działania addytywnego (w obu przypadkach brak interakcji pomiędzy składnikami mieszaniny), albo działania wynikającego z interakcji [2, 4].

Działanie niezależne, określane również jako tzw. „sumowanie odpowiedzi” (ang. *response-addition*) ma miejsce wówczas, gdy mechanizm/charakter działania toksycznego (ang. *Mechanism/Mode of Action*, MOA) składników mieszaniny jest różny i współwystępujące składniki nie wpływają na toksyczność poszczególnych składników mieszaniny. Skutek narażenia na tego typu mieszaninę będzie kombinacją efektów (skutków) toksycznych, które mogą być wywoływane przez każdy samodzielnie działający składnik mieszaniny.

Addytywne działanie toksyczne mieszaniny można uwzględniać, gdy wszystkie jej składniki wykazują ten sam MOA. Efekt (skutek) toksyczny takiej mieszaniny stanowić będzie sumę działań indywidualnych, tj. po-

Tabela 1. Toksykologia mieszanin, na podstawie [2].  
Toxicology of mixtures, based on [2].

Typ toksyczności mieszaniny	Podtyp	Synonimy	Skutki
brak interakcji pomiędzy składnikami mieszaniny	Działanie niezależne	Sumowanie odpowiedzi	Kombinacja skutków, które mogą być wywołane przez każdy samodzielnie działający składnik
	Addytywność	Sumowanie dawek	Suma toksyczności składników
Interakcje pomiędzy składnikami mieszaniny	Potencjacja	Synergizm	Zwiększenie działania toksycznego
	Antagonizm	Inhibicja	Zmniejszenie działania toksycznego

szczególnej jej składników i będzie zależny wyłącznie od stężeń składników mieszaniny. Zwraca się jednak uwagę [1], że aczkolwiek US EPA przy rozpatrywaniu łącznego działania toksycznego substancji chemicznych posługuje się pojęciem „grupy o wspólnym mechanizmie działania” (ang. *Common Mechanism Group*, CMG), to zdaniem niektórych autorów [2] termin „*Common Mode of Action Group*” („Grupa o wspólnym charakterze działania”), wydaje się być bardziej adekwatny, uwzględniając definicję CMG, wprowadzoną przez EPA [8]. Zgodnie z tą definicją wspólny mechanizm działania substancji chemicznych, oznacza toksyczny efekt (skutek) poprzez te same albo zasadniczo podobne, główne biochemiczne zdarzenia wywołwane ich oddziaływaniem. W tym miejscu należy również odnieść się do definicji terminu *Mechanism of Action* („mechanizm działania”) i *Mode of Action* („charakter działania”). Mechanizm działania określa kompletną sekwencję zdarzeń (biochemicznych i fizjologicznych), które prowadzą do skutku toksycznego [1]. Natomiast pojęcie „charakter działania” jest definiowane, jako sekwencja kluczowych zdarzeń, które determinują określony skutek toksyczny [1, 8]. Tak więc, zaklasyfikowanie określonej substancji chemicznej do CMG sugeruje, że przynajmniej jej „charakter działania” jest ustalony, znany. Uwzględniając jednocześnie sugestie [2, 4], że łączne działanie toksyczne może być oceniane na podstawie mniej rygorystycznych kryteriów, tj. uwzględniając w działaniu składników mieszaniny kluczowe zdarzenia toksyczne, pojęcie CMG oznaczać będzie grupę substancji chemicznych wykazującą ten sam mechanizm i/lub charakter działania toksycznego (MOA).

Działanie toksyczne mieszaniny wynikać również może z interakcji jej składników, przebiegających w fazie toksykokinetycznej, obejmującej swym zasięgiem absorpcję, dystrybucję, metabolizm i wydalanie jak i w fazie toksykodynamicznej, tj. konkurencyjnego wpływu składników mieszaniny na receptor komórkowy, docelowy narząd/tkanek [21]. Toksykologiczne interakcje mają charakter złożony, wielostronny. Mogą skutkować zwiększonym (np. synergizm, potencjacja) lub osłabionym (np. antagonizm, inhibicja) działaniem toksycznym mieszaniny, w porównaniu do przewidywanego na podstawie sumowania dawek (*dose-addition*), w przypadku zaliczenia substancji do CMG lub sumowania odpowiedzi (*response-addition*) dla substancji spoza CMG [2, 13].

## KRYTERIA IDENTYFIKACJI CMG

Różne kryteria są proponowane do identyfikacji substancji chemicznych, które można zaliczyć do wspólnej grupy określanej terminem CMG [4, 9]

i dla których ocena skumulowanego ryzyka może być uwzględniana. Zgodnie z EPA [4], podstawą wstępnej identyfikacji takich substancji, powinno być przynajmniej jedno z czterech następujących kryteriów: 1) struktura chemiczna substancji, uwzględniająca podstawową strukturę molekularną, grupy funkcyjne, 2) mechanizm skuteczności działania na organizmy będące przedmiotem zwalczania, ponieważ toksyczność substancji w odniesieniu do ludzi może mieć podobny charakter, 3) ogólny charakter/mechanizm działania toksycznego u ssaków albo 4) szczegółowe określenie skutku toksycznego, ponieważ nie można wykluczyć, że podobne skutki toksyczne mogą być wywoływane przez różne substancje, charakteryzujące się tym samym MOA. To ostatnie kryterium pozwala na identyfikację substancji, które nie wykazują podobieństwa strukturalnego, ale działają poprzez ten sam MOA. Należy również podkreślić, że niespecyficzne efekty toksyczne takie jak np. zmiany w masie ciała albo śmiertelność, które mogą być wynikiem wielu niepowiązanych ze sobą czynników mają znacznie ograniczoną wartość prognostyczną dla identyfikacji CMG.

Na podstawie przynajmniej jednego z powyższych kryteriów, uwzględniając dostępne dane toksykologiczne może być dokonany pierwszy etap selekcji substancji, które wywołują ten sam skutek toksyczny. Kolejny etap to określenie ich MOAs, które determinują zdefiniowane skutki toksyczne, co umożliwi ostateczną identyfikację CMG, poprzez porównanie MOA różnych substancji i wykluczenie tych substancji, które wywołują ten sam skutek toksyczny, ale poprzez różny MOA.

Tak jak już zaznaczono wcześniej nie jest konieczne zdefiniowanie kompletnego mechanizmu działania określonej substancji chemicznej, ale niezbędne jest określenie kluczowych zdarzeń biochemicznych („*Mode of Action*”), które w konsekwencji prowadzą do zdefiniowanego skutku toksycznego. Relatywnie proste będzie to w odniesieniu do substancji, których docelowym miejscem działania jest pojedynczy narząd/tkanek krytyczna. Przykładem mogą być karbaminiany (np. oksamyl, metomyl) czy też związki fosforoorganiczne (np. malation, chlorpiryfos), których działanie toksyczne związane jest z hamowaniem acetylocholinoesterazy, enzymu odgrywającego zasadniczą rolę w powstawaniu i przekazywaniu impulsów nerwowych. Jednak dla substancji, których działanie jest plejotropowe (wielokierunkowe) i dla których mogą być różne docelowe narządy/tkanki, jak w przypadku pyretroidów [16] czy też związków charakteryzujących się mechanizmami sprzężenia zwrotnego, określanymi wspólną nazwą „związki zaburzające homeostazę układu hormonalnego” (ang. *Endocrine Disruptors*, EDs), przypisanie ich do określonej grupy może być niezmiernie trudne. Dlatego, stosowane są różne podej-

ścia i opcje rozpatrujące siłę dowodów dla wspólnego MOA [4]. Optymalne podejście w grupowaniu substancji, to wykorzystywanie silnych podstaw naukowych, uzyskiwanych na podstawie specjalnie nadzorowanych mechanistycznych badań, jak to ma miejsce w US EPA. Takie podejście w UE nie jest możliwe ze względu chociażby na brak obligatoryjnych podstaw legislacyjnych dotyczących przeprowadzania badań mechanistycznych przy rejestracji środków ochrony roślin. Stąd dla wielu pestycydów brak jest zdefiniowanych MOAs. Bardziej konserwatywne podejście, to przyjęcie założenia o wspólnym mechanizmie działania, jeżeli określone substancje wywołują ten sam końcowy skutek i jednocześnie brak jest dowodów wskazujących na różne mechanizmy ich działania. Jednak takie podejście może skutkować dużą niepewnością przy rozpatrywaniu działania addytywnego takiej mieszaniny.

Aktualnie, do grup pestycydów, które rozważane są jako CMGs można zaliczyć insektycydy: fosforoorganiczne i karbaminianowe, fungicydy triazolowe oraz chloroacetanilidy (herbicydy niestosowane na terenie UE; wykorzystywane w USA).

### **TOKSYCZNOŚĆ ŁĄCZNA W ASPEKCIE NARAŻENIA NA POZOSTAŁOŚCI PESTYCYDÓW**

Teoretycznie, narażenie na mieszaninę pozostałości pestycydów w żywności skutkować może każdym, z powyżej przedstawionych rodzajów toksyczności łącznej. Jednak przy rozważaniu najbardziej prawdopodobnego mechanizmu łącznego działania, priorytetowe znaczenie będzie miało określenie poziomu narażenia na określoną mieszaninę pestycydów.

Pestycydy przed wprowadzeniem do obrotu i stosowaniem podlegają autoryzacji, której istotnym elementem jest właściwe zarządzanie ryzykiem poprzez wybór optymalnych rozwiązań dla określonych zagrożeń. Mają one zapewnić takie stężenia pozostałości pestycydów w żywności, na które mogą być narażeni konsumenci produktów spożywczych, które byłyby na poziomach akceptowalnych. Te akceptowalne poziomy gwarantują, że maksymalne narażenie będzie poniżej wartości NOAEL (poziom nie wywołujący, dających się zaobserwować szkodliwych skutków; ang. *No Observed Adverse Effect Level*), wyznaczonej dla krytycznych skutków toksykologicznych i stanowiącej podstawę w procedurze szacowania ryzyka. Dlatego, w przypadku narażenia na mieszaninę pozostałości pestycydów przy założeniu, że ich stosowanie było zgodne z zasadami Dobrej Praktyki Rolniczej, DPR (ang. *Good Agricultural Practice*, GAP), poziom każdego pestycydu w mieszaninie powinien być poniżej wartości NOAEL. Stąd można oczekiwać, że łączna toksyczność mieszaniny

pozostałości pestycydów będzie rzadko, o ile w ogóle będzie wykazywać efekt „sumowania odpowiedzi”. Z drugiej jednak strony, można spodziewać się występowania addytywności i interakcji. Addytywność może mieć miejsce, kiedy suma stężeń pozostałości pestycydów będzie przewyższała wartość NOAEL.

Teoretycznie, interakcje pomiędzy składnikami mieszaniny mogą w konsekwencji prowadzić do skutku toksycznego nawet w przypadku, gdy narażenie na każdy obecny w mieszaninie składnik będzie niewystarczające do jego wywołania. Jednak przeprowadzona przez *Moretto* [13] analiza badań (*in vitro* i *in vivo*) mieszanin substancji chemicznych, w tym pestycydów, wskazuje na małe prawdopodobieństwo ich wystąpienia. Zgodnie ze spostrzeżeniami *Autora*, składniki mieszaniny charakteryzujące się tym samym MOA, przy niskich dawkach wykazują efekt addytywności; efekt taki można również przypisać mieszaninom charakteryzującym się tym samym MOA przy dawkach wysokich, aczkolwiek w tym przypadku nie można wykluczyć pozostałych efektów łącznej toksyczności. Natomiast mieszaniny, których składniki charakteryzują się różnym MOA, przy stężeniach składników poniżej wyznaczonych dla nich wartości NOAEL, nie wywołują efektu addytywności. Przy stężeniach wyższych od wartości NOAEL, wykazują natomiast wszystkie efekty łącznej toksyczności, włączając antagonizm i synergizm.

Powyższe spostrzeżenia o małym prawdopodobieństwie wystąpienia interakcji przy założeniu, że stężenia pestycydów w mieszaninie będą poniżej wyznaczonych dla nich wartości NOAELs, potwierdzają między innymi badania *Gordona* i wsp. [10] i *Richardsona* i wsp. [17]. W przypadku, kiedy narażenie przewyższa NOAELs pestycydów w mieszaninie zarówno toksykokinetyczne jak i toksykodynamiczne interakcje mogą występować [14, 15].

### **OCENA ŁĄCZNEGO NARAŻENIA NA POZOSTAŁOŚCI PESTYCYDÓW**

Ocena narażenia stanowi jeden z etapów szacowania ryzyka, której celem jest oszacowanie dawki lub stężenia substancji chemicznej, na którą może być narażony człowiek. W kontekście szacowania skumulowanego ryzyka mogą być rozważane 4 różne scenariusze narażenia [6].

Dwa z nich obejmują oszacowanie teoretycznego narażenia, zarówno ostrego (1) jak i przewlekłego (2) na pozostałości pestycydu odpowiadające wyznaczonej wartości NDP. Scenariusze te są określane terminem „*MRL-setting*”. Kolejne dwa scenariusze, rozpatrują oszacowanie rzeczywistego narażenia, wynikającego z aktualnie stosowanego pestycydu w praktyce (dane uzyskiwane z badań monitoringowych). Również

w tym przypadku rozważane jest ostre (3) i przewlekłe narażenie (4).

Scenariusz (1) jest adresowany do sytuacji, kiedy pozostałości pojedynczego pestycydu w określonym produkcie spożywczym występują na poziomie ustalonego NDP i w kontekście skumulowanego ryzyka jego pozostałości mogą występować w kilku produktach spożywczych lub gdy narażenie uwzględniać będzie pozostałości wielu pestycydów, ale charakteryzujących się tym samym MOA. Taki scenariusz narażenia daje możliwość odpowiedzi na pytanie czy istnieje ryzyko dla skumulowanego pobrania (wielokrotnego, w tym samym dniu) określonego pestycydu na poziomie NDP, czy też wielu pestycydów o tym samym MOA.

Scenariusz (2) umożliwia rozważanie ryzyka przy narażeniu na dany pestycyd występujący w określonym, pojedynczym produkcie spożywczym na poziomie NDP, ale narażenie może mieć miejsce z różną częstotliwością, np. codziennie, raz każdego roku (narażenie przewlekłe). W tym przypadku, podobnie jak w scenariuszu (1), łączne narażenie uwzględniać powinno obecność pestycydu w wielu produktach spożywczych jak również narażenie na kilka pestycydów, ale charakteryzujących się tym samym MOA.

Reasumując, scenariusze (1) i (2) pozwalają określić czy narażenie konsumentów (ostre i przewlekłe) na pozostałości mieszaniny pestycydów zaliczanych do CMG i których stężenia w mieszaninie są na poziomie NDP, jest akceptowalne. Natomiast scenariusze narażenia (3) i (4) umożliwiają odpowiedzieć na pytanie, czy aktualnie oszacowane narażenie konsumentów (ostre i przewlekłe) na mieszaninę pozostałości pestycydów tworzących CMG jest na akceptowalnym poziomie.

Przy szacowaniu łącznego narażenia na pozostałości pestycydów pobranych z żywnością, może być wykorzystywana zarówno metoda deterministyczna jak i probabilistyczna [7]. W metodzie deterministycznej (konwencjonalna procedura), szacowane narażenie jest obliczane z punktowych wartości zmiennych (parametrów) stanowiących wartości średnie lub medianę, np. stężenia pestycydu w próbce produktu spożywczego, masy ciała określonej populacji. Wynikiem końcowym jest konkretna wartość liczbowa, która nie uwzględnia niepewności uzyskanego wyniku (rozrzutu wyniku). Model ten nie wymaga skomplikowanego oprogramowania i jest relatywnie prosty w odróżnieniu od metody probabilistycznej, w której szacowane narażenie (symulacja Monte Carlo) jest obliczane przy losowo wybieranych wartościach zmiennych (parametrów), co umożliwia uzyskanie rozkładu prawdopodobieństwa narażenia.

Aktualnie, brak jest jednoznacznych ustaleń na poziomie UE, który model obliczeniowy powinien być zastosowany przy szacowaniu łącznego narażenia na pozostałości pestycydów, aczkolwiek podkreśla się [6],

że precyzyjna analiza łącznego narażenia nie może być przeprowadzona bez uwzględnienia probabilistycznych metod. Jednocześnie sugeruje się [7], że w przypadku określonego, pojedynczego produktu spożywczego zawierającego mieszaninę pozostałości pestycydów zaliczanych do CMG, model deterministyczny może być zastosowany. W takim przypadku, podobnie jak dla pobrania pojedynczego pestycydu z żywnością, w szacowaniu narażenia wykorzystywać można wartości IESTI/NESTI (oszacowane międzynarodowe/krajowe krótkoterminowe pobranie pestycydu z żywnością, ang. *International/National Estimated Short-Term Intake*) i TMDI (teoretyczne najwyższe dzienne pobranie, ang. *Theoretical Maximum Daily Intake*).

Z dokładnym omówieniem zagadnienia szacowania narażenia (ostrego i przewlekłego) konsumentów na pojedynczy pestycyd pobrany z żywnością, można zapoznać się w artykule *Strucińskiego* i wsp. [18].

## METODY SZACOWANIA SKUMULOWANEGO RYZYKA DLA CMG

Zgodnie z definicją IUPAC [12], skumulowane ryzyko to prawdopodobieństwo wystąpienia zdefiniowanego szkodliwego skutku będącego wynikiem łącznego działania toksycznego, związanego z jednoczesnym narażeniem na grupę substancji chemicznych, które wykazują wspólny mechanizm/charakter działania toksycznego (MOA).

W propozycjach szacowania ryzyka wynikającego z narażenia łącznego na substancje chemiczne zaliczane do CMG, uwzględniane są różne metody [9, 11, 19]. Każda z nich ma swoje zalety oraz wady; żadna nie jest metodą idealną. Wszystkie natomiast wykorzystują te same pakiety danych i charakteryzują się podobną koncepcją obliczeniową. Różnią się tylko sposobem wyrażania wyników.

Jedna z metod opiera się na wyznaczeniu indeksu zagrożenia (ang. *Hazard Index*, HI), który jest definiowany, jako suma wartości dwóch lub więcej współczynników zagrożenia (ang. *Hazard Quotients*, HQ). Uwzględniając, że HQ stanowi iloraz wartości narażenia przez wartość referencyjną<sup>1</sup> (ang. *Reference*

1 wartość referencyjna (RV) - oszacowana dawka lub stężenie określonego czynnika, na który może być narażony człowiek przez określony czas bez znacznego ryzyka. W szacowaniu ryzyka dla środków ochrony roślin, wartościami referencyjnymi są ADI, ARfD i AOEL (akceptowany poziom narażenia operatora; ang. *Acceptable Operator Exposure Level*). Wartości te są obliczane z ilorazu wartości NOAEL (wyznaczonej z badań toksykologicznych) przez współczynnik niepewności (współczynnik bezpieczeństwa) uwzględniający zmienność wewnątrzosobniczą i niepewność naukową [5].

Value, RV) wyznaczoną dla każdego stwarzającego zagrożenie składnika mieszaniny, HI wyrażane jest następującym wzorem:

$$HI = \frac{NAR_1}{RV_1} + \frac{NAR_2}{RV_2} + \frac{NAR_3}{RV_3} + \text{itd} \dots$$

gdzie:

$NAR_1, NAR_2, NAR_3 \dots$  itd. - oszacowane narażenie na poszczególne (1, 2, 3... itd.) składniki mieszaniny

$RV_1, RV_2, RV_3 \dots$  itd. - odpowiednie wartości referencyjne dla poszczególnych (1, 2, 3... itd.) składników mieszaniny.

Wartość  $HI < 1$  oznacza, że oszacowane narażenie jest niższe niż RV i w konsekwencji skumulowane ryzyko jest akceptowalne.

Operowanie HI wydaje się być zrozumiałe i oczywiste, ponieważ odnosi się bezpośrednio do wartości referencyjnych, które wyznaczane są przy zastosowaniu, co najmniej jednego ze współczynników niepewności (ang. *Uncertainty Factor*, UF), z uwzględnieniem grupy populacji najbardziej wrażliwej. Ponadto, ponieważ wartości referencyjne w większości przypadków są dostępne, zastosowanie tej metodologii jest relatywnie proste i szybkie.

Bardziej kompleksowe szacowanie skumulowanego ryzyka może być dokonane stosując indeks skumulowanego ryzyka (ang. *Cumulative Risk Index*, CRI). W metodologii tej niezbędne jest wyznaczenie indeksu ryzyka (ang. *Risk Index*, RI), który stanowi iloraz RV przez narażenie, czyli RI jest odwrotnością współczynnika zagrożenia (ang. *Hazard Quantification*, HQ).

Indeks ryzyka (RI) wyrażany jest wzorem:

$$RI = \frac{RfP}{NAR \times UF} = \frac{RV}{NAR} = \frac{1}{HQ}$$

gdzie:

RfP - punkt referencyjny<sup>2</sup>

NAR - narażenie

UF - współczynnik niepewności

RV - wartość referencyjna

HQ - współczynnik zagrożenia

Indeks skumulowanego ryzyka (CRI) jest natomiast odwrotnością sumy indeksów zagrożenia (HI) wyliczonych dla poszczególnych składników mieszaniny.

$$CRI = \frac{1}{\frac{NAR_1}{RV_1} + \frac{NAR_2}{RV_2} + \frac{NAR_3}{RV_3}} = \frac{1}{HQ_1 + HQ_2 + HQ_3} \text{ itd}$$

gdzie:

$NAR_1, NAR_2, NAR_3 \dots$  itd. - oszacowane narażenie na poszczególne (1, 2, 3... itd.) składniki mieszaniny

$RV_1, RV_2, RV_3 \dots$  itd. - odpowiednie wartości referencyjne dla poszczególnych (1, 2, 3... itd.) składników mieszaniny.

$HQ_1, HQ_2, HQ_3 \dots$  itd. - współczynniki zagrożenia dla poszczególnych (1, 2, 3... itd.) składników mieszaniny

Metoda ta, aczkolwiek może być rozpatrywana, jako odmienna droga wyrażania HI, jest jednak mniej przejrzysta i mniej zrozumiała. W przypadku, gdy CRI jest  $> 1$ , skumulowane ryzyko jest akceptowalne.

Kolejna metoda opiera się na wyznaczeniu indeksu punktu referencyjnego (ang. *Reference Point Index*, RfPI), który odpowiada sumie narażenia na każdy składnik mieszaniny, wyrażanej ułamkami punktów referencyjnych (ang. *Reference Points*, RfPs) składników mieszaniny.

Jako RfPs może być zastosowana: 1/ wartość BMD10 (ang. *Benchmark Dose*, BMD), definiowana jako dawka wyznaczająca, wywołująca 10% wzrost skutku toksycznego, 2/ wartość NOAEL.

Indeks punktu referencyjnego (RfPI) ma postać:

$$RfPI = \frac{NAR_1}{RfP_1} + \frac{NAR_2}{RfP_2} + \frac{NAR_3}{RfP_3} + \text{itd} \dots$$

gdzie:

$NAR_1, NAR_2, NAR_3 \dots$  itd. - oszacowane narażenie na poszczególne (1, 2, 3... itd.) składniki mieszaniny

$RfP_1, RfP_2, RfP_3 \dots$  itd. - punkty referencyjne składników mieszaniny (1, 2, 3... itd.)

Następnie RfPI, jest mnożony przez powszechny w użyciu współczynnik niepewności, (ang. *Uncertainty Factor*, UF), który zwykle wynosi 100 (10 x 10; odpowiednio dla różnic międzygatunkowych i wewnątrzgatunkowych). Jeżeli wartość RfPI jest  $< 1$ , skumulowane ryzyko jest rozważane za akceptowalne.

Koncepcja RfPI, podobnie jak HI jest prosta i przejrzysta. Należy jednak podkreślić, że w metodzie tej zakłada się, że ekstrapolacja wartości NOAEL wyznaczonej w badaniach na zwierzętach, na oszacowane (rozważane) narażenie ludzi będzie bezpieczne, bez znacznego ryzyka uwzględniając jedynie wspólny UF dla łącznego narażenia. Jednak, gdy zaistnieje potrzeba oszacowania i przystosowania współczynników, specyficznych dla określonego składnika/składników mieszaniny, wtedy zastosowanie w praktyce tej metody może nie być już tak proste.

2 punkt referencyjny (RfP) - termin używany przez Komitet Naukowy EFSA w miejsce pojęcia POD (Punkt odejścia; naruszenia zależności funkcyjnej; ang. *Point of Departure*), stosowanego przez US EPA i definiowanego, jako punkt zależności dawka-odpowiedź wyznaczający początek ekstrapolacji do obszaru niskich dawek.

Końcowy etap w procedurze oceny ryzyka indywidualnej substancji chemicznej, obejmuje m.in. wyznaczenie marginesu narażenia, MOE (ang. *Margin of Exposure*, MOE), którego wartość wyznaczana jest z ilorazu wartości RfP przez szacunkową lub teoretyczną wartość narażenia ludzi na daną substancję chemiczną.

$$MOE = \frac{RfP}{NAR}$$

gdzie:

RfP - punkt referencyjny

NAR - narażenie

MOE jest odwrotnością RfPI. Na przykład, jeżeli wartość BMD10 jest zastosowana jako RfP, to MOE = BMD10/narażenie.

Przy szacowaniu skumulowanego ryzyka, stosowany jest parametr MOE<sub>T</sub>, który wyrażany jest następującym wzorem:

$$MOE_T = \frac{1}{\left(\frac{1}{MOE_1}\right) + \left(\frac{1}{MOE_2}\right) + \left(\frac{1}{MOE_3}\right)} \dots \text{itd.}$$

gdzie:

MOE<sub>1</sub>, MOE<sub>2</sub>, MOE<sub>3</sub>... itd. - marginesy narażenia, wyznaczone dla poszczególnych (1, 2, 3... itd.) składników mieszaniny.

Jeżeli wartość MOE<sub>T</sub> jest > niż wybrany UF (zwykle 100, ale w procedurze zarządzania ryzykiem może być wytypowany inny UF), skumulowane ryzyko jest akceptowalne.

W szacowaniu ryzyka wynikającego z narażenia łącznego na substancje chemiczne zaliczane do CMG może być również wykorzystany współczynnik relatywnej siły działania (ang. *Relative Potency Factor*, RPF). Metoda ta wymaga wyznaczenia tzw. indeksowej substancji chemicznej (ang. *Index Compound*, IC), dla której dobrze zdefiniowana jest relacja między pobraną lub wchłoniętą dawką tej substancji, a prawdopodobieństwem wystąpienia określonego efektu biologicznego działania (zależność dawka-odpowiedź), a jej profil toksykologiczny/biologiczny odpowiada określonej grupie CMG, którą reprezentuje. IC jest wykorzystywana w standaryzacji łącznej toksyczności mieszaniny składników tworzących CMG. Zazwyczaj siła działania określonej substancji chemicznej jest wyznaczana z zależności dawka-odpowiedź, jako wartość BMD10 (mogą być również wykorzystywane wartości NOAELs albo LOAELs<sup>3</sup>). Przykłady sposobu obliczeń RPFs dla

poszczególnych składników mieszaniny przedstawia tabela 1.

Tabela 2. Przykład zastosowania metody RPF, wg [6].

Example of the application of the RPF method, according to [6].

Składnik mieszaniny	BMD10* mg/kg x dzień <sup>-1</sup>	RPF**
I	100	5/100 = 0,05
II	500	5/500 = 0,01
III	25	5/25 = 0,2
IC (substancja indeksowa)	5	5/5 = 1,0

\* BMD10 - dawka wyznaczająca

\*\* RPF - współczynnik relatywnej siły działania

Jeżeli wartość BMD10 dla składnika mieszaniny (np. składnik III) jest 5-krotnie wyższa (tj. wynosi 25 mg/kg x dzień<sup>-1</sup>) od wartości BMD10 dla IC (tj. 5 mg/kg x dzień<sup>-1</sup>) to RPF dla substancji III wynosić będzie 0,2. W konsekwencji narażenie na ten składnik mieszaniny, powinno być skorygowane o wyznaczony współczynnik 0,2, ponieważ dla wywołania tego samego skutku toksycznego co przez IC, wymagałoby 5-krotnie wyższego stężenia analizowanej substancji.

Tabela 3. Sposób wyliczenia łącznego narażenia na mieszaninę substancji chemicznych; metoda RPF, wg [6].

Example of the calculation of cumulative exposure for mixture of chemicals; RPF method, according to [6].

Składnik mieszaniny	Narażenie mg/kg x dzień <sup>-1</sup>	Narażenie po uwzględnieniu współczynnika IC
I	0,5	0,025
II	0,5	0,005
III	0,01	0,002
IC (substancja indeksowa)	0,01 (RV)	0,01
Łączne narażenie		0,042

RV - wartość referencyjna dla IC

Aktywność toksykologiczna mieszaniny jest określana sumą narażenia na składniki mieszaniny (w tym przypadku 0,042). Jeżeli wartość narażenia na mieszaninę będzie < niż wartość RV dla IC, to skumulowane ryzyko dla mieszaniny jest akceptowalne. W przytoczonym przykładzie łączne narażenie jest > od wartości referencyjnej wyznaczonej dla IC (tj. 0,01); skumulowane ryzyko powinno być rozważane za nieakceptowalne.

Metodą pozwalającą na oszacowanie stężenia substancji chemicznej w docelowej tkance/narządzie i proponowaną również dla szacowania ryzyka wyni-

3 LOAEL (ang. *Lowest Observed Adverse Effect Level*), najniższa dawka lub poziom narażenia wyznaczony w badaniach i umożliwiający wyznaczenie zależności dawka-odpowiedź, przy której występuje jeszcze statystycznie

lub biologicznie istotny wzrost częstości występowania szkodliwych skutków działania substancji.

kającego z narażenia łącznego na substancje chemiczne zaliczane do CMG, jest model toksykodynamiki (PBTD) i toksykokinetyki (PBTK), modele mające podstawy fizjologiczne. Ich rutynowe zastosowanie w najbliższej przyszłości jest jednak kwestionowane [6]. Metody te wymagają olbrzymiej ilości danych, jak również specjalistycznych ekspertyz.

### DOTYCHCZASOWE USTALENIA NA POZIOMIE UE DOTYCZĄCE METODOLOGII SZACOWANIA SKUMULOWANEGO RYZYKA

Przedstawione powyżej metody szacowania skumulowanego ryzyka dla CMGs były przedmiotem dyskusji panelu naukowego EFSA ds. produktów ochrony roślin i pozostałości (PPR), który rekomendował [6] metodologię z zastosowaniem indeksu zagrożenia (HI), indeksu punktu referencyjnego (RfPI), współczynnika relatywnej siły działania (RPF) oraz model toksykokinetyki (PBTK), którego rutynowe zastosowanie jak już wcześniej zasygnalizowano jest aktualnie problematyczne. Jednocześnie zaproponowano wielopoziomowe podejście do szacowania ryzyka skumulowanego, poprzez zastosowanie czterech poziomów narażenia z wykorzystaniem modelu deterministycznego (poziom 1-3) i modelu probabilistycznego (poziom 4) oraz czterech poziomów dla charakterystyki zagrożeń (A-D). Schemat zaproponowanej metodologii przedstawia tabela 4.

Każdy poziom narażenia (1-4) uwzględniał scenariusze obejmujące zarówno ostre jak i przewlekłe narażenie na pozostałości pestycydów odpowiadające wyznaczonym wartościom NDP dla określonego pe-

stycydu („MRL-setting”) jak i oszacowane z danych monitoringowych. Modele deterministyczne (poziom 1-3) przy narażeniu ostrym uwzględniał pobranie pestycydu z tzw. „dużą porcją” (ang. *Large Portion*, LP) pojedynczego produktu spożywczego tj. 97,5 percentyla wielkości dziennego spożycia, a przy narażeniu przewlekłym, pobranie pestycydu uwzględniając średnie wartości dziennego spożycia określonego produktu spożywczego. Do obliczeń skumulowanego ryzyka zaproponowano Indeks zagrożenia (HI) oraz Współczynnik Relatywnej Siły Działania (RPF).

W drugim etapie prac zmierzających do ustalenia metodologii szacowania ryzyka skumulowanego, panel PPR przetestował zaproponowany model na grupie fungicydów-triazoli. W przedsięwzięciu tym wziął udział Instytut Bezpieczeństwa Żywności –RIKILT w Holandii, któremu zlecono przeprowadzenie oszacowania narażenia na triazole z wykorzystaniem modelu probabilistycznego.

Jako efekty krytyczne (ang. *endpoints*) działania triazoli wytypowano: deformacje twarzowo-czaszkowe stwierdzone w badaniach rozwojowych (dla narażenia ostrego) i hepatotoksyczność (dla narażenia przewlekłego).

Poddane ocenie przez panel PPR-EFSA wyniki skumulowanego ryzyka dla triazoli [7, 20] stały się podstawą weryfikacji proponowanej wcześniej metodologii (Tab. 5) i zaproponowania następujących rekomendacji:

- w każdym przypadku, punktem startowym szacowania ryzyka powinno być ustanowienie właściwej CMG,
- należy wypracować konsensus na międzynarodowym poziomie w ustalaniu kryteriów dla CMG,
- scenariusz narażenia powinien uwzględniać 1 mo-

Tabela 4. Szacowanie skumulowanego ryzyka, zaproponowane przez panel - PPR uwzględniające wielopoziomowe podejście do szacowania zagrożenia i narażenia [7].

A proposed cumulative risk assessment process, using a tiered approach both on exposure and hazard assessment by PPR Panel [7].

Poziomy zagrożenie	Poziomy narażenia/model			
	1	2	3	4
	deterministyczny	deterministyczny	deterministyczny, dla produktu przetworzonego	probabilistyczny
<b>A</b> ADI, ARfD	HI			
<b>B</b> dostosowane* ADI, ARfD	dostosowane * HI	dostosowane* HI	dostosowane* HI	
<b>C</b> NOAEL*			RPF	
<b>D</b> BMD*			RPF	RPF

\* dla wspólnego efektu

ADI – akceptowane dzienne pobranie

ARfD – ostra dawka referencyjna

NOAEL – poziom nie wywołujący, dających się zaobserwować szkodliwych skutków

BMD – dawka wyznaczająca

HI – indeks zagrożenia

RPF – współczynnik relatywnej siły działania



Tabela 5. Zweryfikowana propozycja dla wielopoziomowego szacowania ryzyka, wg [7].

Revised proposal for tiered risk assessment, according to [7].

Zagrożenie	Narażenie / model	
	deterministyczny	probabilistyczny
ADI, ARfD	HI-A1	HI-A2
dostosowane* ADI, ARfD	dostosowane* HI-B1	dostosowane* HI-B2
NOAEL*/ BMD*	RPF-C1/D1	RPF-C2/D2

\* dla wspólnego efektu

ADI – akceptowane dzienne pobranie

ARfD – ostra dawka referencyjna

NOAEL – poziom nie wywołujący, dających się zaobserwować szkodliwych skutków

BMD – dawka wyznaczająca

HI – indeks zagrożenia

RPF – współczynnik relatywnej siły działania

del deterministyczny i 1 probabilistyczny; model probabilistyczny wymaga dalszego dopracowania,

- wytypowane poziomy szacowania zagrożeń mogą być wykorzystane dla każdej, ustanowionej CMG,
- aktualna metodologia szacowania skumulowanego ryzyka nie pozwala jeszcze na jej rutynowe stosowanie.

## PODSUMOWANIE

Badania monitoringowe przeprowadzone w państwach Unii Europejskiej wskazują, że narażenie konsumenta na pojedynczy pestycyd występuje na poziomach poniżej jego dawki skutecznej, jeżeli stosowanie pestycydu było zgodne z zasadami Dobrej Praktyki Rolniczej. Jednocześnie dostępne dane sugerują, że w przypadku mieszanin substancji, charakteryzujących się różnym MOAs narażenie na taką mieszaninę prawdopodobnie nie będzie zwiększało ryzyka zagrożeń zdrowia, gdy poziom narażenia będzie poniżej skutecznej dawki określonej dla składników mieszaniny. Przeciwnie, dla mieszanin charakteryzujących się wspólnym MOAs nawet przy uwzględnieniu niskich poziomów stężeń współwystępujących pozostałości pestycydów, istnieje duże prawdopodobieństwo wystąpienia działania adytywnego i szacowanie ryzyka dla takich mieszanin będzie niezbędne.

Podjęte inicjatywy na poziomie UE nad wypracowaniem właściwej metodologii dla szacowania skumulowanego ryzyka umożliwiły znaczny postęp w tym zakresie, aczkolwiek jeszcze wiele kwestii powinno być rozwiązane dla osiągnięcia zamierzonego celu. Zgodnie z ustaleniami panelu EFSA- PPR [7] dalszy postęp wymagać będzie:

- ustanowienia na poziomie UE podstaw dla identy-

fikacji pestycydów, które zaliczyć można do określonych CMGs,

- potwierdzenia, że zarówno deterministyczne jak i probabilistyczne podejście w szacowaniu łącznego narażenia zapewni właściwy poziom ochrony zdrowia konsumenta, jak również
- opracowania dalszych wytycznych, umożliwiających zastosowanie właściwej metodologii w szacowaniu łącznego narażenia na pozostałości pestycydów.

## PIŚMIENNICTWO

1. Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V., McGregor D., Meek M.E., Vickers C., Willcocks D., Farland W.: IPCS framework for analyzing the relevance of a cancer mode of action for humans. *Crit. Rev. Toxicol.* 2006, 36, 781-792.
2. Boobis A.R., Ossendorp B.C., Banasiak U., Hamey P.Y., Sebestyen I., Moretto A.: Cumulative risk assessment of pesticide residues in food. *Toxicol. Lett.* 2008, 180, 137-150.
3. CEC (Commission of the European Communities), 2007. Monitoring of pesticide residues in products of plant origin in the European Union, Norway, Iceland and Liechtenstein. ([http://ec.europa.eu/food/fvo/special-reports/pesticides\\_index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/fvo/special-reports/pesticides_index_en.htm))
4. EFSA (European Food Safety Authority), 2007. Cumulative risk assessment of pesticides to human health: The way forward. Summary report, EFSA Scientific Colloquium 7, 28-29 November 2006, Parma, Italy.
5. EFSA (European Food Safety Authority). Opinion of the Scientific Panel PPR related to the revision of Annexes II ad III to Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market-Toxicological and metabolism studies. *EFSA J.* 2007, 449, 1-60.
6. EFSA (European Food Safety Authority). Opinion of the Scientific Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR Panel) on a request from the EFSA evaluate the suitability of existing methodologies and, if appropriate, the identification of new approaches to assess cumulative and synergistic risks from pesticides to human health with a view to set MRLs for those pesticides in the frame of regulation (EC) No. 396/2005. *EFSA J.* 2008, 704, 1-84.
7. EFSA (European Food Safety Authority). Scientific Opinion on Risk Assessment for a Selected Group of Pesticides from the Triazole Group to Test Possible Methodologies to Assess Cumulative Effects from Exposure through Food from these Pesticides on Human Health. *EFSA J.* 2009, 7 (9), 1-103.
8. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 1999. Guidance for Identifying Pesticide Chemicals and Other Substances That have a Common Mechanism of Toxicity. January 29, 1999. Office of pesticide Programmes, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances, Washington. (<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-EST/1999/February/Day-05/>).

9. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2002. Guidance on cumulative risk assessment of pesticide chemicals that have a common mechanism of toxicity. Washington, DC. ([http://www.epa.gov/pesticides/trac/science/cumulative\\_guidance.pdf](http://www.epa.gov/pesticides/trac/science/cumulative_guidance.pdf))
10. Gordon C.J., Herr D.W., Gennings C., Graff J.E., McMurray M., Stork L., Coffey T., Hamm A., Mack, C.M.: Thermoregulatory response to an organophosphate and carbamate insecticide mixture: Testing the assumption of dose-additivity. *Toxicology* 2006, 217, 1-13.
11. Jonker D., Freidig A.P., Groten J.P., de Hollander A.E., Stierum R.H., Woutersen R.A., Feron V.J.: Safety evaluation of chemical mixtures and combinations of chemical and non-chemical stressors. *Rev. Environ. Health* 2004, 19, 83-139.
12. IUPAC. Stephenson G.R., Ferris I.G., Holland P.T., Nordberg M.: Glossary of terms relating to pesticides (IUPAC Recommendations 2006), *Pure Appl. Chem.* 2006, 78, 11, 2075-2154.
13. Moretto A.: Exposure to multiple chemicals: when and how to assess the risk from pesticide residues in food. *Trends in Food Sci. & Technol.* 2008, 19, S56-S63.
14. Moser V. C., Casey M., Hamm A., Carter W. H., Jr. Simmons J. E., Gennings C.: Neurotoxicological and statistical analyses of a mixture of five organophosphorus pesticides using a ray design. *Toxicol. Sci.* 2005, 86, 101-115.
15. Moser V.C., Simmons J.E., Gennings C.: Neurotoxicological interactions of a five-pesticide mixture in preweaning rats. *Toxicol. Sci.* 2006, 92, 235-245.
16. Ray D.E.: Toxicology of Pyrethrins and synthetic Pyrethroids. In: *Pesticide Toxicology and International Regulation*, ed. T.C. Maars and B. Ballantyne, John Wiley & Sons 2004, 129-158.
17. Richardson J.R., Chambers H.W., Chambers J.E.: Analysis of the additivity of *in vitro* inhibition of cholinesterase by mixtures of chlorpyrifos-oxon and azinphos-methyl-oxon. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2001, 172, 128-139.
18. Struciński P., Góralczyk K., Czaja K., Hernik A., Korcz W., Ludwicki J.K.: Ocena ryzyka związana z narażeniem na pozostałości pestycydów w żywności pochodzenia roślinnego na etapie rejestracji środka ochrony roślin. *Roczn. PZH* 2006, 4, 303-315.
19. Van den Berg M., Birnbaum L.S., Denison M., De Vito M., Farland W., Feeley M., et al.: The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol. Sci.* 2006, 93, 223-241.
20. Van Klaveren J.D., van Donkersgoed G., van der Voet H., Stephenson C., Boon P.E.: Cumulative Exposure Assessment of Triazole Pesticides. RIKILT – Institute of Food Safety, Wageningen University and Research Centre. Project ID:ND/EFSA/PPR/2009/01. Accepted for Publication on 15 January 2010.
21. WHO/IPCS (World Health Organization/ International Programme on Chemical Safety). Assessment of Combined Exposure to Multiple Chemicals: Report of a WHO/IPCS International Workshop. WHO 2009.

Otrzymano: 23.11.2011

Zaakceptowano do druku: 07.03.2011