Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Gewasbeschermingsmiddelen en neurodegeneratieve ziekten: mogelijkheden om de toelatingsvereisten te verbeteren

RIVM-briefrapport 2021-0153
H. Heusinkveld et al.

Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Gewasbeschermingsmiddelen en neurodegeneratieve ziekten: mogelijkheden om de toelatingsvereisten te verbeteren

RIVM-briefrapport 2021-0153
H. Heusinkveld et al.

Colofon

© RIVM 2021
Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de titel van de publicatie en het jaar van uitgave.

Het RIVM hecht veel waarde aan toegankelijkheid van haar producten. Op dit moment is het echter nog niet mogelijk om dit document volledig toegankelijk aan te bieden. Als een onderdeel niet toegankelijk is, wordt dit vermeld. Zie ook www.rivm.nl/toegankelijkheid.

DOI 10.21945/RIVM-2021-0153

H. Heusinkveld (auteur), RIVM
G. Wolterink (auteur), RIVM
E. de Jong (auteur), RIVM
E. Hessel (auteur), RIVM

Contact:
Esther de Jong
Voeding, Preventie en Zorg\Voedselveiligheid
Esther.de.jong@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit in het kader van opdracht 10B.4.3.

Dit is een uitgave van:
Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven
Nederland
www.rivm.nl

Publiekssamenvatting

Gewasbeschermingsmiddelen en neurodegeneratieve ziekten: mogelijkheden om de toelatingsvereisten te verbeteren

Gewasbeschermingsmiddelen beschermen planten tegen organismen waar planten ziek van kunnen worden zoals schimmels en insecten. Om ervoor te zorgen dat deze middelen veilig zijn voor mens, dier en milieu worden ze uitgebreid getest. Er zijn aanwijzingen dat mensen die in het verleden lang met chemische stoffen hebben gewerkt, zoals telers met gewasbeschermingsmiddelen, een grotere kans hebben om ziekten te krijgen die het zenuwstelsel aantasten (neurodegeneratieve ziekten), zoals Parkinson en Alzheimer.

Deze ziekten ontstaan door een combinatie van factoren zoals ouderdom, leefstijl en langdurige blootstelling aan stoffen in het milieu of op het werk. Dit maakt het moeilijk om één stof als oorzaak aan te wijzen. Het is daarom belangrijk om al voor de goedkeuring te bepalen of een stof een aandoening kan veroorzaken.

In dat verband is in Europa de vraag ontstaan of de vereiste informatie voor de risicobeoordeling van gewasbeschermingsmiddelen kan aantonen of werkzame stoffen in deze middelen schadelijk zijn voor het zenuwstelsel. Het RIVM adviseert op basis van een verkennend onderzoek om de datavereisten en testrichtlijnen te verbeteren.

In de datavereisten voor werkzame stoffen in gewasbeschermingsmiddelen wordt niet standaard informatie gevraagd over de effecten van deze stoffen op het zenuwstelsel. Ook geven de huidige testrichtlijnen onvoldoende inzicht of een stof een kleine, onopvallende veranderingen in de hersenen kan veroorzaken waardoor aandoeningen als Parkinson kunnen ontstaan.

Er zijn mogelijkheden om aan de bestaande testrichtlijnen effecten toe te voegen om aandoeningen als Parkinson te kunnen onderzoeken. Voor deze aandoeningen was het lange tijd niet duidelijk welke effecten gemeten moeten worden. Het RIVM raadt aan een werkgroep op te richten waarin alle Europese kennis over mogelijke effecten kan worden samengebracht. De resultaten van dit onderzoek kunnen gebruikt worden om de testrichtlijnen verder te ontwikkelen.

Ook beveelt het RIVM aan om testen zonder dier (in vitro) te ontwikkelen om meer informatie te krijgen of stoffen in gewasbeschermingsmiddelen eraan kunnen bijdragen dat aandoeningen als Parkinson ontstaan.

Kernwoorden: gewasbeschermingsmiddelen, neurodegeneratieve ziekten, Parkinson, ALS, Alzheimer

Synopsis

Pesticides and neurodegenerative diseases: possibilities for improving the market authorisation requirements

Pesticides protect plants against organisms that cause plant diseases such as moulds and insects. Such agents are extensively tested to ensure that they are safe for humans, animals, and the environment. There are indications that persons with a past history of working over a long period of time with chemical substances, such as growers who work with pesticides, are at greater risk of developing diseases that damage the nervous system (neurodegenerative diseases), such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease.

These diseases are caused by a combination of factors such as old age, lifestyle, and long-term exposure to substances in the environment or at work. This makes it difficult to identify a single substance as the cause. It is therefore important to determine whether a substance can cause a disease before it is authorised for market distribution.

Within that context, a discussion has arisen in Europe as to whether the information required for the risk assessment of pesticides can show whether active ingredients in these agents are harmful for the nervous system. Based on an initial study, RIVM recommends improving the relevant data requirements and testing guidelines.

The data requirements for active ingredients in pesticides do not include standard information regarding the effects of these substances on the nervous system. The current testing guidelines also do not provide sufficient insight into whether a substance can cause small inconspicuous changes in the brain that can lead to diseases such as Parkinson's.

It is possible to include effects in the current testing guidelines in order to be able to investigate diseases such as Parkinson's. For a long time, it has not been clear which affects have to be measured in relation to these diseases. RIVM recommends establishing a working group in which all European knowledge with regard to possible effects can be brought together. The results of this research can be used to further develop the testing guidelines.

RIVM also recommends developing in vitro tests (without animals) that can provide additional information to determine whether substances in pesticides can contribute to the development of diseases such as Parkinson's.

Keywords: pesticides, neurodegenerative diseases, Parkinson's, ALS, Alzheimer's

Inhoudsopgave

Samenvatting — 9

1 Inleiding — 11

2 Ziektebeelden en milieublootstelling — 13
2.1 Ziekte van Alzheimer — 13
2.2 Ziekte van Parkinson — 13
2.3 Motor neuron ziekten (ALS) — 13
2.4 Verband met milieufactoren — 14
2.5 Gemene delers in neurodegeneratieve ziekten — 15

3 Richtlijnen en datavereisten — 17
3.1 Datavereisten — 17
3.2 Mogelijkheden en beperkingen van bestaande testrichtlijnen voor het detecteren van neurotoxiciteit en neurodegeneratie — 18
3.3 Indicatoren voor neurodegeneratieve ziekten — 22
3.4 Mogelijkheden voor aanpassingen van de vereisten in de testrichtlijnen — 22

4 Internationale en Europese initiatieven op het gebied van neurodegeneratieve ziekten en gewasbeschermingsmiddelen — 25

5 Conclusies en aanbevelingen — 27

Referenties — 29

Samenvatting

In de afgelopen jaren is het risico op de ontwikkeling van neurologische aandoeningen en neurodegeneratieve ziekten als gevolg van blootstelling aan chemische stoffen een terugkerend punt van discussie. Dit verkennend onderzoek richt zich op de vraag of de huidige EU data- en testvereisten voor de goedkeuring van werkzame stoffen in gewasbeschermingsmiddelen geschikt zijn om te beoordelen of een werkzame stof een effect kan hebben dat bijdraagt aan de ontwikkeling van neurodegeneratieve ziekten.

De oorzaak van de ontwikkeling van neurodegeneratieve ziekten blijkt in de meerderheid van de gevallen een combinatie te zijn van leefstijlfactoren, genetische variaties en milieufactoren waaronder de blootstelling aan gewasbeschermingsmiddelen. Epidemiologische studies tonen een plausibel verband aan tussen de blootstelling aan chemische stoffen, zoals gewasbeschermingsmiddelen, metalen en oplosmiddelen, en neurodegeneratieve ziekten zoals de ziekte van Parkinson, de ziekte van Alzheimer en Amyotrofe lateraal sclerose (ALS). Het aantonen van een causaal verband voor specifieke werkzame stoffen is echter lastig vanwege de kleine onderzoeksgroepen en de blootstelling over langere tijd aan verschillende werkzame stoffen.

De huidige datavereisten die gelden voor de toelating van gewasbeschermingsmiddelen leveren beperkt bruikbare informatie om het neurodegeneratief potentieel van een (nieuwe) stof te kunnen inschatten. Zo zijn bijvoorbeeld de histopathologische analyses in de (semi)chronische dierproeven niet geschikt om subtiele veranderingen in de hersenen te detecteren. Verder wordt in de Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) testrichtlijnen niet gespecificeerd welke hersengebieden onderzocht moeten worden en zijn er geen vereisten voor onderzoek van specifieke neurotransmittersystemen.
De detectie van potentiële neurodegeneratieve effecten van een nieuwe werkzame stof kan worden verbeterd door een aanpassing van de huidige OECD-testrichtlijnen. Gezien de complexiteit van neurodegeneratieve ziekten en de lange ontwikkeling ervan is het aan te raden om extra parameters op te nemen in de chronische proefdierstudies. Dit zou gecombineerd kunnen worden met verschillende *in vitro* testen. Voordat de testrichtlijnen aangepast kunnen worden moet echter onderzocht worden welke eindpunten het meest geschikt zijn om als testparameter opgenomen te worden. Er lopen enkele internationale projecten die werken aan *in vitro* modellen voor onder andere parkinson, maar er zijn vooralsnog geen gevalideerde *in vitro* methoden beschikbaar. Voor het testen van de al toegelaten werkzame stoffen is het belangrijk dat er, in plaats van het uitvoeren van aanvullende chronische proefdierstudies, specifieke *in vitro* testen ontwikkeld worden.

1 Inleiding

In de afgelopen jaren is het risico op de ontwikkeling van neurologische aandoeningen en neurodegeneratieve ziekten als de ziekte van Parkinson als gevolg van blootstelling aan chemische stoffen, zoals werkzame stoffen in gewasbeschermingsmiddelen, een terugkerend punt van discussie op zowel nationaal als Europees niveau. Gewasbeschermingsmiddelen mogen uitsluitend stoffen bevatten waarvan op basis van de datavereisten die zijn vast gelegd in de toelatingsprocedure wordt verwacht dat zij geen onaanvaardbaar risico vormen voor mens, dier en milieu. Voor de goedkeuring van een werkzame stof in gewasbeschermingsmiddelen in de EU is een pakket aan toxiciteitsstudies vereist op basis waarvan de mogelijke risico's van de stof bepaald wordt. Het is echter de vraag of het vereiste datapakket doeltreffend is om een mogelijk effect van een stof op het ontwikkelen van neurodegeneratieve ziekten in mensen in te schatten. Het huidige verkennend onderzoek richt zich op die vraag. Binnen de EU lopen er discussies over hoe de datavereisten van gewasbeschermingsmiddelen voor neurotoxiciteit verbeterd zouden moeten worden. De uitkomst van dit verkennend onderzoek zou in deze discussie gebruikt kunnen worden.

Neurodegeneratieve aandoeningen zijn ziektebeelden die worden gekenmerkt door het afsterven van zenuwcellen in specifieke delen van het zenuwstelsel wat leidt tot functieverlies. Verschillen in symptomen tussen neurodegeneratieve aandoeningen zijn terug te voeren op de functie van de aangedane (hersen)gebieden. Hierdoor kenmerkt de ene aandoening zich bijvoorbeeld primair door problemen met coördinatie van beweging (parkinson) terwijl een andere aandoening eerder leidt tot verlies van geheugenfunctie (alzheimer/dementie). Ook al lijken de ziektebeelden daardoor gescheiden, er zijn vele tussenvormen die gekenmerkt worden door overlappende symptomen en pathologie. Zo komt dementie in latere stadia van parkinson meer voor en lijden dementie patiënten vaker aan bewegingsstoornissen.
Ook al worden de meest voorkomende neurodegeneratieve ziekten (parkinson en alzheimer) beschouwd als ouderdomsziekten, het is aangetoond dat leefstijlfactoren en factoren uit het milieu en de werkomgeving een rol spelen in het ontstaan en het verloop van de ziektes ((Aloizou et al. 2020; Pringsheim et al. 2014)). Om die reden is in Frankrijk parkinson aangemerkt als beroepsziekte. Het verband met milieufactoren geldt niet alleen voor parkinson en alzheimer, maar ook voor minder voorkomende neurodegeneratieve motorneuron aandoeningen zoals amyotrofe lateraal sclerose (ALS) ((Pearce and Kromhout 2014)). De term milieufactoren is in dit geval een containerbegrip voor een breed palet aan chemische stoffen inclusief gewasbeschermingsmiddelen waaraan de mens blootgesteld kan worden.

In dit rapport beschrijven we de achtergrond van de ziektebeelden van neurodegeneratieve ziekten en geven we een beeld van de beschikbare kennis vanuit de epidemiologie over de rol van gewasbeschermingsmiddelen bij het voorkomen van neurodegeneratieve

aandoeningen. Verder omschrijven we wat bekend is over onderliggende mechanismen uit de neurotoxicologie. In het vervolg beschrijven we de datavereisten voor de beoordeling van gewasbeschermingsmiddelen en de vereisten in de huidige testrichtlijnen en verkennen of er verbeteringsmogelijkheden zijn.

2 Ziektebeelden en milieublootstelling

2.1 Ziekte van Alzheimer

Alzheimer is de meest voorkomende neurodegeneratieve aandoening in de westerse wereld. De prevalentie van alzheimer in Europa ligt tussen de 4,5 en 5% van de populatie boven de 65 jaar (Niu et al. 2017). Alzheimer is primair een ouderdomsziekte, slechts 1-2% van de gevallen vindt zijn oorsprong in genetische (overerfbare) defecten, zoals varianten van het APOE gen dat codeert voor het apo-lipoprotein E eiwit (Long and Holtzman 2019). De overige gevallen zijn van onbekende oorzaak. De ziekte van Alzheimer wordt histopathologisch gekenmerkt door degeneratie van zenuwcellen in de buitenste lagen van de hersenen (corticale regio). Dit gaat gepaard met de vorming van plaques in het omliggende weefsel bestaande uit geaggregeerde eiwitten zoals amyloid beta en tau. Net als bij parkinson komen deze eiwitten normaal voor in het brein, maar door grotendeels onbekende redenen slaan deze eiwitten neer en vormen plaques (Dos Santos Picanco et al. 2018).

2.2 Ziekte van Parkinson

De ziekte van Parkinson en parkinsonismen vormen de tweede meest voorkomende groep neurodegeneratieve aandoening, na alzheimer. De ziekte treft ongeveer 1-2% van de Europese populatie boven de 65 jaar en komt meer voor bij mannen dan bij vrouwen. In 5-10% van de gevallen is er een genetische oorzaak van de ziekte, maar in 90-95% van de gevallen wordt de ziekte ingeschat als sporadisch en is de oorzaak onbekend (Pringsheim et al. 2014). Histopathologisch wordt parkinson gekenmerkt door het selectief afsterven van de dopaminerge neuronen in de middenhersenen, specifiek in de substantia nigra en de verbindingen met het striatum, de zogeheten nigrostriatale verbinding. In geval van parkinson wordt in de aangedane gebieden eiwit depositie gevonden, voornamelijk bestaande uit alpha synucleine en tau. Neurochemisch kenmerkt parkinson zich door een tekort aan dopamine in de middenhersenen waardoor de signaaloverdracht tussen neuronen stilvalt. De middenhersenen zijn betrokken bij het plannen, coördineren en uitvoeren van bewegingen. Een tekort aan neurotransmitter in deze hersengebieden uit zich daardoor in onvrijwillige bewegingen (trillen) en problemen met het opstarten en stoppen van beweging (Braak et al. 2003).

2.3 Motor neuron ziekten (ALS)

Amyotrofe lateraal sclerose (ALS) is een ziekte die voorkomt bij ongeveer 5 per 100.000 mensen (vaker bij mannen dan vrouwen) in westerse landen (Oskarsson, Horton, and Mitsumoto 2015). De achtergrond van de ziekte is in 5-10% gevallen een genetisch defect en in de rest van de gevallen is de oorzaak onbekend. Het belangrijkste kenmerk van ALS is het afsterven van motorneuronen (de cellen die verantwoordelijk zijn voor de spieraansturing) in ruggenmerg, hersenstam en de motorische schors van het brein. In de aangedane gebieden worden eiwitinsluitsels gevonden die met name bestaan uit beschadigd of verkeerd gevouwen neurofilamenten. Dit zijn eiwitten die in de gezonde cel verantwoordelijk zijn voor de structuur van de

zenuwbanen en transport van eiwitten en moleculen (van Es et al. 2017).

2.4 Verband met milieufactoren

De oorzaak van de ontwikkeling van neurodegeneratieve ziekten in de meerderheid van de gevallen wordt beschreven als multifactorieel met een bijdrage van leefstijlfactoren, (niet oorzakelijke) genetische variaties, en milieufactoren.
Een groeiende hoeveelheid epidemiologische data wijst blootstelling aan gewasbeschermingsmiddelen, al dan niet in combinatie met blootstelling aan andere chemische stoffen, aan als risicofactor voor het ontwikkelen van parkinson (Allen and Levy 2013; Ascherio et al. 2006; Kamel et al. 2007; Kenborg et al. 2012; Moisan and Elbaz 2011; Moisan et al. 2015; Narayan et al. 2017; Narayan et al. 2013; Shrestha et al. 2020; Singh, Ahmad, and Kumar 2007; Van Der Mark et al. 2014; Van Maele-Fabry et al. 2012; Wang et al. 2011), alzheimer (Aloizou et al. 2020; Baldi et al. 2003; Baltazar et al. 2014; Hayden et al. 2010; Jones 2010; Richardson et al. 2014; Yan et al. 2016) en ALS (Bonvicini et al. 2010; Kamel et al. 2012; Malek et al. 2012; McGuire et al. 1997).

Bij meer voorkomende ziekten zoals parkinson en alzheimer is het vanwege de groepsgrootte in de studies mogelijk om aanwezige verbanden tussen blootstelling aan stofgroepen of zelfs individuele stoffen en het voorkomen van de ziekte aan te tonen. In het geval van een minder voorkomende ziekte zoals ALS is het lastiger om epidemiologisch een verband te leggen met specifieke milieufactoren (Oskarsson, Horton, and Mitsumoto 2015). Uit de beschikbare epidemiologische data blijkt toch dat beroepsmatige blootstelling aan gewasbeschermingsmiddelen een risicofactor is voor het ontwikkelen van ALS (Bonvicini et al. 2010; Kamel et al. 2012; Malek et al. 2012; McGuire et al. 1997). Binnen beroepsmatig blootgestelde personen blijken mannen een groter risico voor ALS te lopen dan vrouwen (Malek et al. 2012). Voor het aantonen van verbanden met specifieke stoffen of klassen gewasbeschermingsmiddelen zijn de meeste onderzoeksgroepen echter vaak te klein. Desalniettemin suggereert de beschikbare data een verband tussen ALS en organochloor-insecticiden (Kamel et al. 2012).

Naast gewasbeschermingsmiddelen zijn er nog andere chemische stoffen waarvoor aanwijzingen zijn dat ze (bij gecombineerde blootstelling) een rol kunnen spelen in het ontstaan van neurodegeneratieve aandoeningen. Dit zijn onder andere silica (Rondeau et al. 2009), metalen zoals onder andere mangaan, aluminium en lood (Gamache et al. 2019; Rondeau et al. 2000; Rondeau et al. 2009; Santibañez, Bolumar, and García 2007; Van Dyke et al. 2020) en oplosmiddelen (De Miranda and Greenamyre 2020; Reis et al. 2016; Santibañez, Bolumar, and García 2007). Specifiek voor parkinson blijkt de combinatie van blootstelling aan metaal via lasrook (met name mangaan) en gewasbeschermingsmiddelen blootstelling de leeftijd bij diagnose met gemiddeld 5 jaar te vervroegen (Gamache et al. 2019; Ratner et al. 2014).

Het is aangetoond dat de blootstelling aan milieufactoren in combinatie met bepaalde varianten van genen het risico op het ontwikkelen van

neurodegeneratieve ziekten verhoogd. Hier is sprake van in het geval van alzheimer bij APOE varianten en blootstelling aan aluminium (Van Dyke et al. 2020) en bij varianten van cytochroom P450 ontgiftingsenzymen en blootstelling aan organochloor-gewasbeschermingsmiddelen (Singh, Ahmad, and Kumar 2007)). In het geval van parkinson en motorneuron ziekten is het bekend voor varianten van het PON1 gen en blootstelling aan organofosfaat gewasbeschermingsmiddelen (Paul et al. 2017) en GST polymorfismen en blootstelling aan herbiciden (Wilk et al. 2006). In deze gevallen laten de data zien dat de ontwikkeling van het ziektebeeld versneld wordt door de interactie tussen het gen en de blootstelling.

In veel gevallen zijn studiepopulaties klein en is het lastig om een causaal verband aan te tonen tussen de ontwikkeling van neurodegeneratieve ziekten en blootstelling aan specifieke stoffen of stofgroepen. De conclusie over de bijdrage van de blootstelling aan gewasbeschermingsmiddelenblootstelling aan het risico op de ontwikkeling van zulke ziektebeelden is dan ook vaak generiek. Andere redenen hiervoor zijn de relatief lange tijd die nodig is om een (klinisch detecteerbare) neurodegeneratieve ziekte te ontwikkelen en dat het lastig is om de blootstelling in kaart te brengen vanwege de grote overlap in stoffen waaraan mensen gedurende deze periode zijn blootgesteld. In een beperkt aantal studies is in meer detail gekeken naar groepen van werkzame stoffen in gewasbeschermingsmiddelen of zelfs individuele stoffen, in relatie tot het risico op parkinson. Hieruit blijken verbanden met onder andere de in de EU niet meer goedgekeurde stoffen paraquat (Shrestha et al. 2020; Tangamornsuksan et al. 2019; Tanner et al. 2011; Vaccari et al. 2019), rotenone (Dhillon et al. 2008; Tanner et al. 2011), chloorpyrifos (Dhillon et al. 2008) en de combinatie van dithiocarbamaten met diquat/paraquat (Costello et al. 2009). Of hetzelfde geldt voor werkzame stoffen die momenteel nog wel op de markt zijn is onbekend wegens gebrek aan specifieke data. Hierbij dient opgemerkt te worden dat dit gebrek ook geldt voor chemische stoffen wegens binnen andere regulatoire kaders.

2.5 Gemene delers in neurodegeneratieve ziekten

In vrijwel alle neurodegeneratieve ziekten speelt een langzaam oplopend verlies aan neuronen een rol, waarbij het klinisch beeld pas gezien wordt als een groot deel van de neuronen verloren gegaan is. In het geval van parkinson is dit bijvoorbeeld 60-80% van de dopaminerge neuronen in de middenhersenen (Jellinger 2009). In alle hierboven beschreven ziektebeelden treedt daarbij een verstoring van de eiwithomeostase op wat resulteert in stapeling van eiwitten (bijv. tau, amyloid beta, alpha synucleine of neurofilamenten) en vorming van plaques en insluitsels. Mechanismen die hieraan ten grondslag liggen of er een aanjagende rol in kunnen spelen zijn neuroinflammatie, verstoring van mitochondriale energiehuishouding, oxidatieve stress en schade aan de bloed-hersenbarrière of het vaatbed (bijv. (Miller et al. 2009; Taetzsch and Block 2013))

Het ontwikkelen van een neurodegeneratieve aandoening kost tijd. De blootstelling aan werkzame stoffen in gewasbeschermingsmiddelen of

andere chemische stoffen kan, afhankelijk van het neurotoxisch mechanisme, zorgen voor de initiatie van een neurodegeneratieve ziekte of versnelde ontwikkeling van een bestaand proces (Doi et al. 2006; Ratner et al. 2014). Het effect kan optreden door een langdurige lage blootstelling, maar ook een kortdurende hogere blootstelling.
Het lange proces voordat mogelijke effecten op neurodegeneratieve ziekten waargenomen kunnen worden in de epidemiologische studies illustreert de noodzaak om al tijdens de goedkeuring van stoffen informatie te (kunnen) verzamelen over de mogelijke effecten van stoffen op processen die bijdragen aan de ontwikkeling van neurodegeneratieve ziekten. Daarom is het relevant om te verkennen in welke mate de huidige datavereisten in staat zijn om neurodegeneratieve effecten van werkzame stoffen te detecteren.

3 Richtlijnen en datavereisten

Zoals beschreven in hoofdstuk twee zijn er aanwijzingen dat er neurodegeneratieve effecten op zouden kunnen treden als gevolg van blootstelling aan gewasbeschermingsmiddelen. Dit roept de vraag op in welke mate degeneratieve neurotoxische effecten in de huidige datavereisten en testrichtlijnen zichtbaar kunnen worden en of hier nog ruimte voor verbetering is.

3.1 Datavereisten

De gegevensvereisten voor de werkzame stoffen in gewasbeschermingsmiddelen zijn beschreven in Verordening (EU) Nr. 283/2013. De humaan relevante toxische eigenschappen van de werkzame stof moeten onder meer worden onderzocht in studies naar acute toxiciteit, studies met herhaalde blootstelling over 28 en 90 dagen, chronische studies, reproductietoxiciteitsstudies (meer-generatiestudies) en ontwikkelingstoxiciteitsstudies.
Er kunnen ook neurotoxiciteitsstudies gevraagd worden, maar uit Verordening (EU) Nr. 283/2013 blijkt dat specifieke neurotoxiciteitsstudies niet standaard hoeven te worden aangeleverd. In paragraaf 5.7, *"Onderzoek naar neurotoxiciteit"* van de bijlage van de Verordening wordt aangegeven onder welke omstandigheden neurotoxiciteitsstudies moeten worden aangeleverd:

"Onderzoek naar neurotoxiciteit", bijlage 5.7 bij Verordening (EU) Nr. 283/2013:

5.7.1. Onderzoek naar neurotoxiciteit bij knaagdieren
Onderzoek naar neurotoxiciteit bij knaagdieren moet voldoende gegevens opleveren om de potentiële neurotoxiciteit van de werkzame stof (neurologische/gedragseffecten en neuropathologische effecten) na eenmalige en herhaalde blootstelling te kunnen evalueren.

Gevallen waarin de proef vereist is
Dit onderzoek moet worden uitgevoerd voor werkzame stoffen met structuren die vergelijkbaar zijn met of verwant zijn aan de structuren van stoffen die vertraagd intredende neurotoxiciteit tot gevolg kunnen hebben en voor werkzame stoffen waarvoor toxiciteitsonderzoek bij doseringsniveaus die geen verband houden met een uitgesproken algemene toxiciteit aanwijzingen oplevert voor potentiële neurotoxiciteit, neurologische tekenen of neuropathologische laesies. De uitvoering van zulk onderzoek moet eveneens worden overwogen voor stoffen met een neurotoxische of bestrijdende werking.
Er moet worden overwogen om neurotoxiciteitsonderzoek op te nemen in routinematig toxicologisch onderzoek.

5.7.2. Onderzoek naar vertraagd intredende polyneuropathie
Het onderzoek naar vertraagd intredende polyneuropathie moet voldoende gegevens opleveren om te kunnen evalueren of de werkzame stof vertraagd intredende polyneuropathie tot gevolg kan hebben na acute en herhaalde blootstelling. Een onderzoek naar herhaalde

blootstelling hoeft mogelijk niet te worden uitgevoerd, tenzij er aanwijzingen bestaan dat de verbinding zich ophoopt en dat er een belangrijke belemmering van de neuropathy target esterase of klinische/histopathologische tekenen van vertraagd intredende polyneuropathie optreden rond de LD_{50} voor kippen, zoals bepaald bij de proef met eenmalige toediening.

Gevallen waarin de proef vereist is
Dit onderzoek moet worden uitgevoerd voor werkzame stoffen met structuren die vergelijkbaar zijn met of verwant zijn aan de structuren van stoffen die vertraagd intredende polyneuropathie tot gevolg kunnen hebben, zoals organofosfaatverbindingen.

Samengevat: indien uit de reguliere toxiciteitsstudies blijkt dat een stof neurotoxische eigenschappen heeft of wanneer de moleculaire structuur van een stof aangeeft dat de stof neurotoxisch zou kunnen zijn of gerelateerd is aan een stof met bekende neurotoxiciteit, kunnen specifieke neurotoxiciteitsstudies, inclusief studies naar de ontwikkelingsneurotoxiciteit, gevraagd worden door beoordelende instanties, zoals het College voor de toelating van gewasbeschermings-middelen en biociden (Ctgb). In alle andere gevallen zijn neurotoxiciteitsstudies niet vereist.

3.2 Mogelijkheden en beperkingen van bestaande testrichtlijnen voor het detecteren van neurotoxiciteit en neurodegeneratie

De gevraagde toxiciteitsstudies dienen te worden uitgevoerd volgens de testrichtlijnen zoals die zijn opgesteld door de Organisatie voor Economische Samenwerking en Ontwikkeling (OESO), hierna aangeduid met de meer gebruikelijke Engelse afkorting OECD. De testrichtlijnen zijn gepubliceerd op de website OECD Test Guidelines for Chemicals - OECD onder sectie 4: Health Effects.

Hieronder wordt besproken welke parameters in de verschillende OECD testrichtlijnen onderzocht worden en welke parameters een indicatie zouden kunnen geven over neurotoxiciteit van een stof, en in het bijzonder over de mogelijke potentie van een stof om neurodegeneratieve effecten te veroorzaken.

Acute toxiciteitstesten
De huidig voorgeschreven acute orale, dermale, en inhalatoire toxiciteitsstudies dienen te worden uitgevoerd volgens OECD-testrichtlijnen 402, 403, 420, 423, 425 of 436, en zijn vooral bedoeld om een indruk te krijgen bij welke doseringen van een stof zeer ernstige effecten of letaliteit optreden. Deze testen worden uitgevoerd met een beperkt aantal proefdieren (meestal vrouwtjesratten). Na een eenmalige toediening van de teststof worden de dieren regelmatig geobserveerd en klinische verschijnselen van toxiciteit en het optreden van mortaliteit worden geregistreerd. Aan het eind van de studie (na 14 dagen) worden de dieren geëuthanaseerd en macroscopisch onderzocht. Indien macroscopische effecten van de stof op organen worden gevonden kunnen deze verder histologisch worden onderzocht, maar dit is geen verplichting.

Deze richtlijnstudies bieden de mogelijkheid om acute neurotoxische effecten van een stof te detecteren, echter in de richtlijnen zijn hiervoor geen methodes aangewezen. Aangezien de gebruikte doseringen van de teststof hoog zijn is het moeilijk om specifieke neurotoxische verschijnselen te onderscheiden van verschijnselen die worden veroorzaakt door ernstige systemische toxiciteit van de stof. Door de beperkte groepsgroottes en het beperkte aantal parameters dat wordt onderzocht zijn de acute toxiciteitstesten ook weinig sensitief en vaak niet geschikt om met enige zekerheid een uitspraak te kunnen doen over de acuut-neurotoxische effecten van een stof.

Toxiciteitsstudies met herhaalde toediening
De toxische effecten van een stof bij herhaalde dagelijkse blootstelling worden onderzocht in 28-dagen studies (OECD 407), in 90-dagen of 1-jaar studies (OECD 408 voor onderzoek in knaagdieren (meestal ratten of muizen) en OECD 409 voor onderzoek in niet-knaagdieren, meestal honden) en in chronische studies in knaagdieren (OECD 451, 452 en 453).

De 28-dagen studie wordt in het algemeen gebruikt als range-finding studie om de doseringen voor de langdurige studies te bepalen. Het aantal dieren per doseringsgroep is beperkt. Deze studie kan informatie geven over mogelijke neurotoxische potentie van een teststof, maar de statistische power is laag en de duur is kort, zeker voor het detecteren van eventuele effecten van een stof op processen betrokken bij neurodegeneratie.

Ook de 90-dagen studies in knaagdieren zijn waarschijnlijk te kortdurend om functionele neurodegeneratieve effecten van de stoffen aan te kunnen tonen. Echter, de 90 dagen studie biedt wel de ruimte om vroege effecten op bijvoorbeeld neuroinflammatie of effecten op specifieke neuronale subtypen aan te tonen.

De 90-dagen of 1-jaar studie in honden heeft daarbij slechts een lage statistische power vanwege het geringe aantal dieren per doseringsgroep (meestal 4 per geslacht per dosering).

Mogelijk zou een gedetailleerd neurotoxicologisch onderzoek, zoals beschreven in de OECD-testrichtlijn 424 in chronische dierstudies wel functionele veranderingen als gevolg van een neurodegeneratieve werking van een stof kunnen detecteren.

Alle studies met herhaalde blootstelling worden uitgevoerd met zowel mannetjes- als vrouwtjesproefdieren. In al deze studies worden de proefdieren dagelijks geobserveerd op klinische verschijnselen. Een week na de start van de studie wordt een gedetailleerd klinisch onderzoek verricht. In de 28- en 90-dagen studies wordt vereist dat het detailleerde klinisch onderzoek wekelijks wordt herhaald. In de chronische toxiciteitsstudies wordt vereist dat zo’n klinische onderzoek na de 1e week maandelijks wordt herhaald. Bij het klinisch onderzoek wordt met behulp van een testen naar functionele eindpunten (de Functional Observational Battery, of FOB) onder meer gekeken naar gedrag en motoriek van het proefdier en worden de dieren gecheckt op

verschijnselen die duiden op effecten op het autonome zenuwstelsel, zoals speekselvorming, pupilgrootte, traanvorming.

In de 90-dagen studie in knaagdieren is het in principe ook vereist dat aan het eind van de studie (week 11 of later) de dieren worden onderzocht op de reactie op sensorische stimuli (auditief, visueel en proprioceptief), gripkracht en hun motorische activiteit als maat voor mogelijke neurotoxiciteit. Echter, deze onderzoeken hoeven niet te worden uitgevoerd als deze parameters in andere studies zijn onderzocht of wanneer de dagelijkse klinische observaties geen functionele stoornissen op dit gebied hebben aangetoond.

Aan het eind van de studie worden de dieren geëuthanaseerd en macroscopisch onderzocht. Een brede selectie van organen of weefsels, waaronder hersenen, ruggenmerg en een perifere zenuw, wordt histologisch onderzocht. De hersenen dienen op verschillende niveaus histologisch te worden onderzocht en dienen in ieder geval delen van de grote hersenen, kleine hersenen en de medulla/pons te bevatten. Met behulp van deze histologische analyse kunnen onder andere, vrij grove, aspecifieke veranderingen in grootte van hersenkernen, diktes van hersenschorslagen, neurondichtheden in hersengebieden, vacuole vorming en tumorvorming waargenomen worden. De histologische analyse is in het algemeen niet geschikt om subtiele veranderingen te detecteren. De OECD-testrichtlijnen specificeren niet welke hersengebieden dienen te worden onderzocht en vereisen ook geen onderzoek naar specifieke neurotransmittersystemen, zoals het dopaminerge systeem. Met specifieke kleuringen van bepaalde hersengebieden en zenuwweefsel zouden neurodegeneratie of processen die hieraan bijdragen (zoals neuroinflammatie en schade aan een specifieke celpopulatie) kunnen worden gedetecteerd. Zo zou een stof die de ziekte van Parkinson kan veroorzaken eerder worden gedetecteerd wanneer in een chronische studie bij het histologisch onderzoek de dopamine neuronen in de substantia nigra van het proefdier zouden worden aangekleurd. Hetzelfde geldt voor specifieke aankleuring van motorneuronen in het ruggenmerg in het geval van ALS.

Kortom, studies met herhaalde blootstelling kunnen in principe ingezet worden om neurotoxische effecten van stoffen aan te tonen. In de huidige OECD-testrichtlijnen worden echter geen specifieke kleuringen van hersenen of perifeer zenuwweefsel vereist wat de bruikbaarheid van de gegevens voor het bepalen van mogelijke neurotoxiciteit sterk beperkt. Daarnaast zijn de resultaten van de functionele observationele testen sterk afhankelijk van de bekwaamheid van de observator en puur gericht op functionele eindpunten en wordt de waarde van deze FOB testen voor het bepalen van neurotoxiciteit in toenemende mate in twijfel getrokken (Gauvin et al. 2016).

Reproductie- en ontwikkelingstoxiciteitstudies
Naast de hierboven beschreven dierstudies met herhaalde blootstelling worden ook in reproductie- en ontwikkelingstoxiciteitsstudies teststoffen herhaaldelijk dagelijks toegediend. Echter, in deze OECD testrichtlijnen ligt de focus op het detecteren van effecten van een stof op de fertiliteit en reproductie, dan wel op de vroege ontwikkeling van de hersenen.

Deze studies zijn minder geschikt om algemeen neurotoxische effecten van stoffen te detecteren. Daarnaast vormen de ontwikkelende hersenen geen representatief model voor het testen van neurodegeneratieve effecten van stoffen.

Gerichte neurotoxiciteitsstudies
Onder bepaalde voorwaarden dienen voor gewasbeschermingsmiddelen neurotoxiciteitsstudies in volwassen dieren te worden uitgevoerd (zie inleiding). Deze studies moeten worden uitgevoerd volgens OECD-testrichtlijn 424. Deze testrichtlijn is bedoeld voor neurotoxiciteitsstudies met acute of herhaalde blootstelling (28 of 90 dagen of 1 jaar), primair met orale blootstelling tenzij stofeigenschappen anders dicteren (bijv. vluchtige stoffen). Volgens deze testrichtlijn moeten de dieren dagelijks worden gecheckt op het optreden van klinische verschijnselen en moet regelmatig een gedetailleerd klinisch onderzoek worden uitgevoerd. Daarnaast moet op een aantal tijdstippen gedurende de studie testen worden uitgevoerd, waarin een breed scala aan parameters moet worden gemeten, zoals de reactie op sensorische stimuli (auditief, visueel en proprioceptief), gripkracht en hun motorische activiteit. Optioneel kunnen testen naar de sensorische, motorische functies en cognitieve functies (leren en geheugen), specifiek neurologisch gedrag en/of elektrofysiologie worden uitgevoerd. De keuze voor het aanvullend onderzoek kan zijn gebaseerd op bepaalde waarnemingen die gedaan zijn of op de verwachting dat de teststof een specifieke neurotoxische werking heeft. Naast de standaard histologische kleuringen van het zenuwweefsel kunnen ook specifieke kleuringen worden uitgevoerd. Samengevat is de OECD-testrichtlijn 424 erg open opgesteld is en kan ingevuld worden al naar gelang de onderzoeksvraag.
Studies die opgezet zijn volgens OECD TG 424 zijn geschikt om specifieke neurotoxische effecten van stoffen na acute of herhaalde blootstelling aan te tonen. Door hun specifieke opzet en uitgebreidere scala aan testen is de gevoeligheid van deze studies groter dan van de reguliere testrichtlijnen voor acute en herhaalde blootstelling aan een stof.
Echter, de meeste neurotoxiciteitsstudies hebben een maximale duur van 90 dagen en zijn daarom waarschijnlijk alleen geschikt om de vroege cellulaire en histopathologische effecten van teststoffen die kunnen leiden tot neurodegeneratie te detecteren.

Specifiek histopathologisch onderzoek naar neurodegeneratieve effecten in verschillende regio’s van de hersenen kan relevante informatie opleveren over de neurodegeneratieve potentie van een stof. Momenteel zal dit type specifiek aanvullend onderzoek alleen worden uitgevoerd wanneer er experimentele waarnemingen zijn met de teststof of met een structureel verwante stof die erop duiden dat de teststof deze potentie heeft (bijv. effecten op het gedrag, histopathologie of neurochemie). Aangezien de beschikbare testrichtlijnen weinig geschikt zijn om deze gegevens te leveren, ontbreekt deze informatie over het algemeen en zal specifiek onderzoek naar de mogelijk neurodegeneratieve effecten van een stof in de praktijk niet worden uitgevoerd.

3.3 Indicatoren voor neurodegeneratieve ziekten

Zoals hierboven beschreven kenmerken neurodegeneratieve ziekten in de mens zich door specifieke veranderingen in het centrale en/of perifere zenuwstelsel. Een aantal van deze veranderingen kunnen ook in proefdierstudies worden gevonden maar die zijn nu niet standaard onderdeel van de huidige datavereisten voor gewasbeschermingsmiddelen. Zo is aangetoond dat de stoffen rotenon, paraquat en maneb die in de mens in verband worden gebracht met de ziekte van Parkinson, in proefdieren mitochondriale disfunctie en celdood van dopaminerge neuronen in de substantia nigra veroorzaken (Drechsel and Patel 2008; Hatcher, Pennell, and Miller 2008). In diermodellen voor alzheimer zijn verschillende biomarkers voor alzheimer geïdentificeerd (Drummond and Wisniewski 2017; Sabbagh, Kinney, and Cummings 2013; Vitek et al. 2020). Ook voor ALS worden in diermodellen biomarkers gepostuleerd (Morrice, Gregory-Evans, and Shaw 2018; Vejux et al. 2018) Stephenson en Amor, 2017). Dit biedt mogelijkheden om in proefdierstudies die worden uitgevoerd in het kader van toelating van gewasbeschermingsmiddelen parameters toe te voegen die als indicatoren voor neurodegeneratieve potentie van werkzame stoffen kunnen dienen.

3.4 Mogelijkheden voor aanpassingen van de vereisten in de testrichtlijnen

De detectie van potentiële neurodegeneratieve effecten van een werkzame stof in een gewasbeschermingsmiddel kan worden verhoogd door een aanpassing van de huidige OECD-testrichtlijnen voor *in vivo* studies in proefdieren. Door specifieke testparameters toe te voegen kan informatie worden verkregen of een stof bepaalde effecten veroorzaakt die indicatief zijn voor het optreden van neurodegeneratieve ziekten. Voorbeelden hiervan zijn de in eerdere paragrafen genoemde markers voor neuroinflammatie, mitochondriale schade, verstoring van de eiwit homeostase in het brein, effecten op dopamine neuronen of schade aan perifere motorneuronen. Voordat de OECD testrichtlijnen kunnen worden aangepast moet echter eerst worden onderzocht welke biomarkers het meest geschikt zijn om als testparameter in de testprotocollen te worden opgenomen. Hierbij moet worden gekeken naar aspecten zoals betrouwbaarheid als indicator, relevantie voor de humane pathofysiologie, gevoeligheid van de meting en technische haalbaarheid van routinematig meten. Ook zal gekeken moeten worden naar welke OECD testrichtlijnen qua blootstellingsduur het meest geschikt zijn om deze parameters in op te nemen. In plaats van het toevoegen van nieuwe aanvullende proefdierstudies aan de bestaande testrichtlijnen kunnen deze extra testparameters worden geïncorporeerd in de nu al vereiste toxiciteitsstudies. Gebaseerd op de relatief trage ontwikkeling van neurodegeneratieve ziekten zouden de chronische proefdierstudies (OECD 451, 452 en 453) hiervoor in aanmerking komen.

Aanvullend moeten er *in vitro* testen worden samengesteld die indicatief zijn voor een neurodegeneratieve werking van een stof met betrekking tot de veelvoorkomende neurodegeneratieve aandoeningen in de mens (parkinson, alzheimer, ALS). Deze *in vitro* testmethode kan mechanistische informatie opleveren en dienen als screening methode

voor reeds goedgekeurde werkzame stoffen. Op dit moment zijn er nog weinig (gevalideerde) *in vitro* testen voor neurodegeneratieve effecten van stoffen beschikbaar. Recent heeft het Joint Research Centre (JRC) een lijst uitgebracht van de op dit moment beschikbare *in silico, in vitro* en *ex vivo* modellen die de mens als uitgangspunt hebben[1]. Wanneer er meer *in vitro* testen ontwikkeld en gevalideerd zijn kan een getrapte benadering in de teststrategie worden gevolgd. Indien een stof positief wordt bevonden in een of meer van de *in vitro* testen zouden vervolgens in de vereiste, hierboven beschreven proefdierstudies specifieke testparameters kunnen worden onderzocht om te onderzoeken of de stof de *in vitro* waargenomen potentie ook in proefdieren kan veroorzaken. Tot het moment dat deze toegepaste *(in vitro)* testmethode ontwikkeld en gevalideerd is zal uitgegaan moeten worden van additionele parameters uit aangepaste chronische richtlijnstudies in proefdieren.

[1] https://ec.europa.eu/jrc/en/science-update/tackling-neurodegenerative-diseases-more-human-relevant-research

4 Internationale en Europese initiatieven op het gebied van neurodegeneratieve ziekten en gewasbeschermingsmiddelen

Om een beeld te krijgen van de lopende ontwikkelingen omtrent testmethoden voor neurodegeneratieve ziekten is een inventarisatie gemaakt van de internationale en Europese initiatieven die gaande zijn op dit onderwerp.
Voor zover bekend loopt er binnen de EU één project dat specifiek kijkt naar een mogelijke beoordelingsmethodiek van werkzame stoffen in gewasbeschermingsmiddelen voor neurodegeneratieve ziekten. In dit project wordt in de lopende herbeoordelingsprocedure van de werkzame stof tebufenpyrad gekeken naar de toepasbaarheid van zogeheten New Approach Methodologies (NAMs) voor parkinson aan de hand van de door de Europese Voedselveiligheidsautoriteit (European Food Safety Authority (EFSA) opgetekende Adverse Outcome Pathway (AOP) voor mitochondriale ontkoppeling gerelateerd aan parkinson. Dit project wordt uitgevoerd door EFSA in samenwerking met Anses (verantwoordelijk instituut voor de beoordeling van gewasbeschermingsmiddelen in Frankrijk).
Binnen een aantal onderzoeksprojecten is aandacht voor de ontwikkeling van AOPs en NAMs die als basis zouden kunnen dienen voor een nieuwe strategie om de risico's van o.a. gewasbeschermingsmiddelen voor het ontwikkelen van neurodegeneratieve aandoeningen beter te kunnen inschatten. Een voorbeeld hiervan is het NWA-ORC gefinancierde project “Virtual Human Platform for Safety” waarbinnen gewerkt wordt aan een integrale AOP voor parkinson. Daarnaast wordt internationaal door diverse groepen gewerkt aan betere *in vitro* modellen voor o.a. parkinson.

5 Conclusies en aanbevelingen

Conclusies:

1. De relatie tussen blootstelling aan chemische stoffen, inclusief gewasbeschermingsmiddelen, en neurodegeneratieve aandoeningen is plausibel. Het aantonen van een causaal verband voor specifieke werkzame stoffen in epidemiologische studies is echter lastig vanwege de kleine onderzoeksgroepen en de blootstelling aan meerdere werkzame stoffen, vaak gedurende langere tijd.
2. Ontbrekende gegevens over de neurotoxische potentie van (nieuwe) werkzame stoffen leidt ertoe dat aanvullende studies zelden gevraagd worden.
3. In de huidige vereisten in de OECD-testrichtlijnen zijn de neurodegeneratieve parameters niet expliciet benoemd. Hoewel onderzoek naar deze aanvullende parameters niet uitgesloten is in de testrichtlijn komt het in de praktijk niet voor dat dit ook daadwerkelijk wordt uitgevoerd.
4. Het op dit moment beschikbare arsenaal aan *in vitro* testen naar neurodegeneratieve eigenschappen van stoffen is nog te beperkt en onvoldoende gevalideerd om een alternatief voor proefdierstudies te kunnen bieden.

Aanbevelingen:

1. Als oplossing voor de middellange termijn: Aanpassen van de bestaande OECD-testrichtlijnen voor een betere inschatting van mogelijke effecten op neurodegeneratieve ziekten. Hiertoe zou een (internationale) expert werkgroep ingesteld moeten worden die bepaalt welke van de in hoofdstuk 3 benoemde parameters of andere aanvullende parameters in de huidige OECD testrichtlijnen opgenomen zouden moeten worden.
2. Als oplossing voor de lange termijn: Ontwikkelen van een gevalideerde *in vitro* testmethode die ingezet kan worden als primair screeningsinstrument in een getrapte teststrategie.
3. Als oplossing voor de lange termijn: vastlegging van de gevalideerde *in vitro* testmethode in de Europese wetgeving en eisen omtrent mogelijke *in vivo* (follow-up) studies bij positieve resultaten.

Referenties

Allen, M. T., and L. S. Levy. 2013. 'Parkinsons disease and pesticide exposure - A new assessment', *Critical Reviews in Toxicology*, 43: 515-34.

Aloizou, A. M., V. Siokas, C. Vogiatzi, E. Peristeri, A. O. Docea, D. Petrakis, A. Provatas, V. Folia, C. Chalkia, M. Vinceti, M. Wilks, B. N. Izotov, A. Tsatsakis, D. P. Bogdanos, and E. Dardiotis. 2020. 'Pesticides, cognitive functions and dementia: A review', *Toxicology Letters*, 326: 31-51.

Ascherio, A., H. Chen, M. G. Weisskopf, E. O'Reilly, M. L. McCullough, E. E. Calle, M. A. Schwarzschild, and M. J. Thun. 2006. 'Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease', *Annals of Neurology*, 60: 197-203.

Baldi, I., P. Lebailly, B. Mohammed-Brahim, L. Letenneur, J. F. Dartigues, and P. Brochard. 2003. 'Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly', *American Journal of Epidemiology*, 157: 409-14.

Baltazar, M. T., R. J. Dinis-Oliveira, M. de Lourdes Bastos, A. M. Tsatsakis, J. A. Duarte, and F. Carvalho. 2014. 'Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases-A mechanistic approach', *Toxicology Letters*, 230: 85-103.

Bonvicini, F., N. Marcello, J. Mandrioli, V. Pietrini, and M. Vinceti. 2010. 'Exposure to pesticides and risk of amyotrophic lateral sclerosis: A population-based case-control study', *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 46: 284-87.

Braak, Heiko, Kelly Del Tredici, Udo Rüb, Rob A. I. de Vos, Ernst N. H. Jansen Steur, and Eva Braak. 2003. 'Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson’s disease', *Neurobiology of Aging*, 24: 197-211.

Costello, S., M. Cockburn, J. Bronstein, X. Zhang, and B. Ritz. 2009. 'Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California', *American Journal of Epidemiology*, 169: 919-26.

De Miranda, B. R., and J. T. Greenamyre. 2020. 'Trichloroethylene, a ubiquitous environmental contaminant in the risk for Parkinson's disease', *Environ Sci Process Impacts*, 22: 543-54.

Dhillon, A. S., G. L. Tarbutton, J. L. Levin, G. M. Plotkin, L. K. Lowry, J. T. Nalbone, and S. Shepherd. 2008. 'Pesticide/environmental exposures and Parkinson's disease in East Texas', *Journal of agromedicine*, 13: 37-48.

Doi, H., H. Kikuchi, H. Murai, Y. Kawano, H. Shigeto, Y. Ohyagi, and J. Kira. 2006. 'Motor neuron disorder simulating ALS induced by chronic inhalation of pyrethroid insecticides', *Neurology*, 67: 1894-5.

Dos Santos Picanco, L. C., P. F. Ozela, M. de Fatima de Brito Brito, A. A. Pinheiro, E. C. Padilha, F. S. Braga, C. H. T. de Paula da Silva, C. B. R. Dos Santos, J. M. C. Rosa, and L. I. da Silva Hage-Melim. 2018. 'Alzheimer's Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment', *Curr Med Chem*, 25: 3141-59.

Drechsel, D. A., and M. Patel. 2008. 'Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease', *Free Radic Biol Med*, 44: 1873-86.
Drummond, E., and T. Wisniewski. 2017. 'Alzheimer's disease: experimental models and reality', *Acta Neuropathol*, 133: 155-75.
Gamache, P. L., I. Haj Salem, N. Roux-Dubois, J. Le Bouthillier, Z. Gan-Or, and N. Dupré. 2019. 'Exposure to Pesticides and Welding Hastens the Age-at-Onset of Parkinson's Disease
L'exposition à des pesticides et à des métaux toxiques associés à la soudure diminue l'âge d'apparition de la maladie de Parkinson', *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 46: 711-16.
Gauvin, D. V., J. D. Yoder, D. L. Holdsworth, M. L. Harter, J. R. May, N. Cotey, J. A. Dalton, and T. J. Baird. 2016. 'The standardized functional observational battery: Its intrinsic value remains in the instrument of measure: The rat', *J Pharmacol Toxicol Methods*, 82: 90-108.
Hatcher, J. M., K. D. Pennell, and G. W. Miller. 2008. 'Parkinson's disease and pesticides: a toxicological perspective', *Trends in Pharmacological Sciences*, 29: 322-29.
Hayden, K. M., M. C. Norton, D. Darcey, T. Østbye, P. P. Zandi, J. C. S. Breitner, and K. A. Welsh-Bohmer. 2010. 'Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: The Cache County Study', *Neurology*, 74: 1524-30.
Jellinger, K. A. 2009. 'Parkinson’s Disease and Other Movement Disorders', *European Journal of Neurology*, 16: e58-e58.
Jones, N. 2010. 'Alzheimer disease: Risk of dementia and Alzheimer disease increases with occupational pesticide exposure', *Nature Reviews Neurology*, 6: 353.
Kamel, F., C. M. Tanner, D. M. Umbach, J. A. Hoppin, M. C. R. Alavanja, A. Blair, K. Comyns, S. M. Goldman, M. Korell, J. W. Langston, G. W. Ross, and D. P. Sandler. 2007. 'Pesticide exposure and self-reported Parkinson's disease in the agricultural health study', *American Journal of Epidemiology*, 165: 364-74.
Kamel, F., D. M. Umbach, R. S. Bedlack, M. Richards, M. Watson, M. C. R. Alavanja, A. Blair, J. A. Hoppin, S. Schmidt, and D. P. Sandler. 2012. 'Pesticide exposure and amyotrophic lateral sclerosis', *NeuroToxicology*, 33: 457-62.
Kenborg, L., C. F. Lassen, F. Lander, and J. H. Olsen. 2012. 'Parkinson's disease among gardeners exposed to pesticides - a Danish cohort study', *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, 38: 65-69.
Long, J. M., and D. M. Holtzman. 2019. 'Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies', *Cell*, 179: 312-39.
Malek, A. M., A. Barchowsky, R. Bowser, A. Youk, and E. O. Talbott. 2012. 'Pesticide exposure as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis: A meta-analysis of epidemiological studies. Pesticide exposure as a risk factor for ALS', *Environmental Research*, 117: 112-19.
McGuire, V., W. T. Longstreth Jr, L. M. Nelson, T. D. Koepsell, H. Checkoway, M. S. Morgan, and G. Van Belle. 1997. 'Occupational exposures and amyotrophic lateral sclerosis: A population- based case-control study', *American Journal of Epidemiology*, 145: 1076-88.

Miller, R. L., M. James-Kracke, G. Y. Sun, and A. Y. Sun. 2009. 'Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease', *Neurochem Res*, 34: 55-65.
Moisan, F., and A. Elbaz. 2011. 'Parkinson disease and pesticide exposure
Maladie de Parkinson et exposition aux pesticides', *Environnement, Risques et Sante*, 10: 372-84.
Moisan, F., J. Spinosi, L. Delabre, V. Gourlet, J. L. Mazurie, I. Bénatru, M. Goldberg, M. G. Weisskopf, E. Imbernon, C. Tzourio, and A. Elbaz. 2015. 'Association of parkinson's disease and its subtypes with agricultural pesticide exposures in men: A case-control study in France', *Environmental Health Perspectives*, 123: 1123-29.
Morrice, J. R., C. Y. Gregory-Evans, and C. A. Shaw. 2018. 'Animal models of amyotrophic lateral sclerosis: A comparison of model validity', *Neural Regen Res*, 13: 2050-54.
Narayan, S., Z. Liew, J. M. Bronstein, and B. Ritz. 2017. 'Occupational pesticide use and Parkinson's disease in the Parkinson Environment Gene (PEG) study', *Environmental International*, 107: 266-73.
Narayan, S., Z. Liew, K. Paul, P. C. Lee, J. S. Sinsheimer, J. M. Bronstein, and B. Ritz. 2013. 'Household organophosphorus pesticide use and parkinson's disease', *International Journal of Epidemiology*, 42: 1476-85.
Niu, H., I. Alvarez-Alvarez, F. Guillen-Grima, M. J. Al-Rahamneh, and I. Aguinaga-Ontoso. 2017. 'Trends of mortality from Alzheimer's disease in the European Union, 1994-2013', *Eur J Neurol*, 24: 858-66.
Oskarsson, B., D. K. Horton, and H. Mitsumoto. 2015. 'Potential Environmental Factors in Amyotrophic Lateral Sclerosis', *Neurol Clin*, 33: 877-88.
Paul, K. C., J. S. Sinsheimer, M. Cockburn, J. M. Bronstein, Y. Bordelon, and B. Ritz. 2017. 'Organophosphate pesticides and PON1 L55M in Parkinson's disease progression', *Environment International*, 107: 75-81.
Pearce, N., and H. Kromhout. 2014. 'Neurodegenerative disease: the next occupational disease epidemic?', *Occup Environ Med*, 71: 594-5.
Pringsheim, T., N. Jette, A. Frolkis, and T. D. Steeves. 2014. 'The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis', *Mov Disord*, 29: 1583-90.
Ratner, M. H., D. H. Farb, J. Ozer, R. G. Feldman, and R. Durso. 2014. 'Younger age at onset of sporadic Parkinson's disease among subjects occupationally exposed to metals and pesticides', *Interdisciplinary Toxicology*, 7: 122-33.
Reis, J., E. Benbrick, V. Bonneterre, and P. S. Spencer. 2016. 'Parkinson's disease and solvents: Is there a causal link?', *Revue Neurologique*, 172: 761-65.
Richardson, J. R., A. Roy, S. L. Shalat, R. T. Von Stein, M. M. Hossain, B. Buckley, M. Gearing, A. I. Levey, and D. C. German. 2014. 'Elevated serum pesticide levels and risk for Alzheimer disease', *JAMA Neurology*, 71: 284-90.

Rondeau, V., D. Commenges, H. Jacqmin-Gadda, and J. F. Dartigues. 2000. 'Relation between aluminum concentrations in drinking water and Alzheimer's disease: An 8-year follow-up study', *American Journal of Epidemiology*, 152: 59-66.

Rondeau, V., H. Jacqmin-Gadda, D. Commenges, C. Helmer, and J. F. Dartigues. 2009. 'Aluminum and silica in drinking water and the risk of Alzheimer's disease or cognitive decline: Findings from 15-year follow-up of the PAQUID cohort', *American Journal of Epidemiology*, 169: 489-96.

Sabbagh, J. J., J. W. Kinney, and J. L. Cummings. 2013. 'Alzheimer's disease biomarkers: correspondence between human studies and animal models', *Neurobiol Dis*, 56: 116-30.

Santibañez, M., F. Bolumar, and A. M. García. 2007. 'Occupational risk factors in Alzheimer's disease: A review assessing the quality of published epidemiological studies', *Occupational and Environmental Medicine*, 64: 723-32.

Shrestha, S., C. G. Parks, D. M. Umbach, M. Richards-Barber, J. N. Hofmann, H. Chen, A. Blair, L. E. Beane Freeman, and D. P. Sandler. 2020. 'Pesticide use and incident Parkinson's disease in a cohort of farmers and their spouses', *Environmental Research*, 191.

Singh, C., I. Ahmad, and A. Kumar. 2007. 'Pesticides and metals induced Parkinson's disease: Involvement of free radicals and oxidative stress', *Cellular and Molecular Biology*, 53: 19-28.

Taetzsch, T., and M. L. Block. 2013. 'Pesticides, microglial NOX2, and Parkinson's disease', *J Biochem Mol Toxicol*, 27: 137-49.

Tangamornsuksan, W., O. Lohitnavy, R. Sruamsiri, N. Chaiyakunapruk, C. Norman Scholfield, B. Reisfeld, and M. Lohitnavy. 2019. 'Paraquat exposure and Parkinson’s disease: A systematic review and meta-analysis', *Archives of Environmental and Occupational Health*, 74: 225-38.

Tanner, C. M., F. Kame, G. W. Ross, J. A. Hoppin, S. M. Goldman, M. Korell, C. Marras, G. S. Bhudhikanok, M. Kasten, A. R. Chade, K. Comyns, M. B. Richards, C. Meng, B. Priestley, H. H. Fernandez, F. Cambi, D. M. Umbach, A. Blair, D. P. Sandler, and J. W. Langston. 2011. 'Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease', *Environmental Health Perspectives*, 119: 866-72.

Vaccari, C., R. El Dib, H. Gomaa, L. C. Lopes, and J. L. de Camargo. 2019. 'Paraquat and Parkinson’s disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies', *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 22: 172-202.

Van Der Mark, M., R. Vermeulen, P. C. G. Nijssen, W. M. Mulleners, A. M. G. Sas, T. Van Laar, M. Brouwer, A. Huss, and H. Kromhout. 2014. 'Occupational exposure to pesticides and endotoxin and Parkinson disease in the Netherlands', *Occupational and Environmental Medicine*, 71: 757-64.

Van Dyke, N., N. Yenugadhati, N. J. Birkett, J. Lindsay, M. C. Turner, C. C. Willhite, and D. Krewski. 2020. 'Association between aluminum in drinking water and incident Alzheimer's disease in the Canadian Study of Health and Aging cohort', *NeuroToxicology*.

van Es, Michael A., Orla Hardiman, Adriano Chio, Ammar Al-Chalabi, R. Jeroen Pasterkamp, Jan H. Veldink, and Leonard H. van den Berg. 2017. 'Amyotrophic lateral sclerosis', *The Lancet*, 390: 2084-98.

Van Maele-Fabry, G., P. Hoet, F. Vilain, and D. Lison. 2012. 'Occupational exposure to pesticides and Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis of cohort studies', *Environment International*, 46: 30-43.

Vejux, A., A. Namsi, T. Nury, T. Moreau, and G. Lizard. 2018. 'Biomarkers of Amyotrophic Lateral Sclerosis: Current Status and Interest of Oxysterols and Phytosterols', *Front Mol Neurosci*, 11: 12.

Vitek, M. P., J. A. Araujo, M. Fossel, B. D. Greenberg, G. R. Howell, S. J. S. Rizzo, N. T. Seyfried, A. J. Tenner, P. R. Territo, M. Windisch, L. J. Bain, A. Ross, M. C. Carrillo, B. T. Lamb, and R. M. Edelmayer. 2020. 'Translational animal models for Alzheimer's disease: An Alzheimer's Association Business Consortium Think Tank', *Alzheimers Dement (N Y)*, 6: e12114.

Wang, A., S. Costello, M. Cockburn, X. Zhang, J. Bronstein, and B. Ritz. 2011. 'Parkinson's disease risk from ambient exposure to pesticides', *European Journal of Epidemiology*: 1-9.

Wilk, J. B., J. E. Tobin, O. Suchowersky, H. A. Shill, C. Klein, G. F. Wooten, M. F. Lew, M. H. Mark, M. Guttman, R. L. Watts, C. Singer, J. H. Growdon, J. C. Latourelle, M. H. Saint-Hilaire, A. L. DeStefano, R. Prakash, S. Williamson, C. J. Berg, M. Sun, S. Goldwurm, G. Pezzoli, B. A. Racette, J. S. Perlmutter, A. Parsian, K. B. Baker, M. L. Giroux, I. Litvan, P. P. Pramstaller, G. Nicholson, D. J. Burn, P. F. Chinnery, P. Vieregge, J. T. Slevin, F. Cambi, M. E. MacDonald, J. F. Gusella, R. H. Myers, and L. I. Golbe. 2006. 'Herbicide exposure modifies GSTP1 haplotype association to Parkinson onset age: The GenePD study', *Neurology*, 67: 2206-10.

Yan, D., Y. Zhang, L. Liu, and H. Yan. 2016. 'Pesticide exposure and risk of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis', *Scientific reports*, 6: 32222.

RIVM
De zorg voor morgen begint vandaag