

Studie in opdracht van

Vlaamse overheid
Dienst Milieu & Gezondheid
Departement Leefmilieu, Natuur en Energie (LNE)
Graaf de Ferrarisgebouw
Koning Albert II-laan 20, bus 8
1000 Brussel

Overheidsopdracht
DTG/OL200500031/5170/M&G

Uitwerken en uitvoeren van een pilootproject voor effectgerichte metingen om de luchtkwaliteit in Vlaanderen te kunnen evalueren

Eindrapport
April 2008

TOX/2008/R/010

Studie uitgevoerd door VITO & UA

Van Den Heuvel R., Witters H., Schoeters G. (Vito)
Nobels I., Vanparys C., De Coen W., Robbens J. (UA)

Dit project werd gerealiseerd onder begeleiding van een stuurgroep en met hulp van meerdere personen. De onderzoekspartners zijn dank verschuldigd aan elk van hen die een actieve bijdrage hebben geleverd tot dit onderzoeksproject.

De stuurgroep met

Voorzitster: M. Mampaey (LNE)

En leden: K. Van Campenhout (LNE), J. Vercauteren (VMM), M. Desmedt (VMM), M. Rossier (VMM), E. Roekens (VMM), N. Claeys (VMM), L. Hoebeke (VMM), M. Bossuyt (VMM), H. Reynders (LNE), I. Overmeer (LNE), M. Van der Elst (LNE), D. Wildermeersch (Agentschap Zorg en Gezondheid)

Andere betrokkenen die een belangrijke bijdrage leverden bij de realisatie van dit rapport:

- Wauters E. (VMM, Gent) voor de coördinatie en het uitvoeren van de bemonsteringscampagne en het aanleveren van de PAKs meetresultaten.
- Vercauteren J. (VMM, Antwerpen) voor het aanleveren van de PM10, element analyse meetresultaten

Inhoudstafel

LIJST VAN TABELLEN

LIJST VAN FIGUREN

VERKLARENDE WOORDENLIJST EN AFKORTINGEN

WOORD VOORAF

1	Samenvatting	17
2	Summary	21
3	Inleiding	25
4	Fase I	29
5	Fase II	33
5.1	Filterkeuze	33
5.2	Extractieprocedures	34
5.2.1	Organische extractie: ASE	34
5.2.2	Verzamelen van partikels	34
5.3	Testsystemen	35
5.3.1	Selectie van de biologische testen	35
5.3.2	Beschrijving van de biologische testen	38
5.3.2.1	<i>Salmonella mutageniciteit test</i>	38
5.3.2.2	<i>Cat-tox</i>	38
5.3.2.3	<i>MELN assay</i>	40
5.3.2.4	<i>Cytotoxiciteit</i>	42
5.3.2.5	<i>Immunotoxiciteit</i>	42
5.3.2.6	<i>Endotoxinetest</i>	42
6	Fase III	45
6.1	Testen op het organische extract	45
6.1.1	<i>Salmonella mutageniciteitstest (Ames)</i>	45
6.1.2	<i>Cat-tox</i>	47
6.1.3	<i>MELN assay</i>	51
6.2	Testen op de gecollecteerde partikels	57
6.2.1	<i>Cytotoxiciteit</i>	57
6.2.2	<i>Immunotoxiciteit</i>	58
6.2.3	<i>Endotoxinetest</i>	61
7	Fase IV	63
7.1	Relatie van de gemeten eindpunten tot tijd, plaats en klimatologisch parameters	63
7.1.1	<i>Salmonella mutageniciteit test (Ames)</i>	65
7.1.1.1	<i>Trends in plaats en tijd</i>	65
7.1.1.2	<i>Invloed van klimatologische omstandigheden</i>	68
7.1.2	<i>Cat-tox</i>	69
7.1.2.1	<i>Trends in plaats en tijd</i>	69
7.1.2.2	<i>Verschillen tussen de seizoenen</i>	72
7.1.2.3	<i>Invloed van klimatologische omstandigheden</i>	74
7.1.2.4	<i>Uitzonderlijke situatie</i>	76

7.1.3	MELN.....	77
7.1.3.1	<i>Trends in plaats en tijd.....</i>	77
7.1.3.2	<i>Invloed van klimatologische omstandigheden.....</i>	80
7.1.4	Cytotoxiciteit.....	81
7.1.4.1	<i>Trends in plaats en tijd.....</i>	81
7.1.4.2	<i>Invloed van klimatologische omstandigheden.....</i>	83
7.1.5	Cytokineproductie.....	84
7.1.5.1	<i>Trends in plaats en tijd.....</i>	84
7.1.5.2	<i>Invloed van klimatologische omstandigheden.....</i>	89
7.2	Relatie van de gemeten eindpunten tot pollutie.....	90
7.2.1	Salmonella mutageniciteitstest (Ames).....	92
7.2.2	Cat-tox.....	96
7.2.2.1	<i>PAKs.....</i>	96
7.2.2.2	<i>PM10, OC, EC en TC.....</i>	98
7.2.3	MELN test.....	101
7.2.4	Cytotoxiciteit.....	103
7.2.5	Cytokineproductie.....	104
7.3	Inschatting van gezondheidsrisico's.....	108
7.3.1	Implementatie van genotox, immunotox en hormonale verstoring resultaten voor inschatting gezondheidsrisico.....	108
7.3.2	Implementatie van Cat-tox resultaten voor inschatting gezondheidsrisico	111
8	Conclusie en aanbevelingen.....	115
9	Aanbevelingen voor de ontwikkeling van een effect-gericht meetnet voor evaluatie van stofdeeltjes.....	121
10	Referenties.....	131
11	Annex I: Salmonella mutageniciteit test (Ames).....	137
12	Annex II: Cat-tox.....	151
13	Annex III: MELN-test.....	158
14	Annex IV: Cytotoxiciteit.....	162
15	Annex V: Cytokine productie.....	166

LIJST VAN TABELLEN

Tabel 4.1: Overzicht van de bemonsteringscampagne.....	32
Tabel 5.1: Overzicht van verschillende filtertypes.....	33
Tabel 5.2: Overzicht van de toepassing van partikels en organisch extract in de bioassays	36
Tabel 5.3: Prioriteitenlijst voor testen met organische extracten van beladen filters	36
Tabel 5.4: Overzicht Cat-tox promotors (HepG2, promotor:cat).....	40
Tabel 6.1: Significante ($FI > 1$) en niet significante ($FI = 1$) fold inducties per staal en per gen. De resultaten zijn het gemiddelde van drie experimenten Hoogste (oranje) en tweede hoogste (geel) inductie per gen over de hele meetcampagne worden weergegeven in kleur.	49
Tabel 6.2: Gemiddelde meetwaarden en ranges voor relatieve inductie oestrogene activiteit voor alle stalen, per test concentratie	55
Tabel 6.3: Gemiddelde SI per partikel concentratie waarden voor de verschillende cytokines.....	60
Tabel 6.4: Meetwaarde voor endotoxine in de verschillende filterextracten.....	62
Tabel 7.1: Overzicht van de meteorologische gegevens.....	64
Tabel 7.2 :Overzicht van de positieve filterextracten: aantal positieve extracten t.o.v. het aantal geteste filters.....	65
Tabel 7.3: Top 10 van de dagen met de hoogste mutagene activiteit in de filterextracten.	67
Tabel 7.4: Spearman's rank correlatie analyses van genen met klimatologische parameters. De individuele r-waarden worden gegeven, de vetgedrukte zijn significant ($p < 0.05$)......	74
Tabel 7.5: Interpretatie van de backward trajectories. Ws: windstil, zee: luchtstromen van over zee	76
Tabel 7.6: Verdeling van aandeel stalen, % van totaal positief of negatief voor relatieve inductie score van oestrogene activiteit per locatie en per geteste concentratie	79
Tabel 7.7: Vergelijking van parameters voor meteo met relatieve inductie score voor oestrogene potentie (RIS). Bij significant verband werd de p-waarde ingekleurd. ..	80
Tabel 7.8: Cytokineproductie (SI t.o.v. controle) na blootstelling van partikels uit verschillende locaties. (gemiddelde \pm SD, tussen haakjes min. en max. waarden) ..	85
Tabel 7.9: Verschillende chemische aspecten van fijn stof die een rol kunnen spelen in de toxicologische verklaring van effecten	91
Tabel 7.10: Overzicht van dagen gerangschikt volgens gemeten mutagene activiteit en de PM10 concentratie op die dagen.	94
Tabel 7.11: Correlatie tussen mutagene respons en pollutanten.(Spearman rank correlatie, r =correlatiecoëfficiënt)	96
Tabel 7.12: Individuele Spearman's rank correlaties tussen genen en de individuele PAKs data. R-waarden worden weergegeven, vetgedrukte zijn significant ($p < 0.05$)......	97
Tabel 7.13: Spearman's Rank correlaties tussen individuele genen en de gesommeerde PAKs. R-waarden worden weergegeven, vetgedrukte r-waarden zijn significant ($p < 0.05$).	98
Tabel 7.14: Enkelvoudige Spearman rangorde correlaties, r-waarden worden weergegeven. Vetgedrukte r-waarden zijn significant ($p < 0.05$)......	99

Tabel 7.15: Vergelijking van pollut parameters en totaal partikels met relatieve oestrogene inductie. Bij significant verband werd p-waarde ingekleurd.	102
Tabel 7.16: Correlatie tussen cytotoxische respons en pollutanten.(Spearman rank correlatie, r=correlatiecoëfficiënt).....	104
Tabel 7.17: Correlatie tussen cytokineproductie en pollutanten.(Spearman rank correlatie, r=correlatiecoëfficiënt).	105
Tabel 7.18: Inflammatoire potentie per m ³ bemonsterde lucht (fold inductie TNF- α /m ³ , fold inductie il-6/m ³).	107
Tabel 7.19: Relatieve mutagene potentie van de filterextracten (t.o.v. mutagene activiteit van BaP in de Ames test).....	109

LIJST VAN FIGUREN

Figuur 4.1: Geselecteerde meetstations in Vlaanderen	30
Figuur 6.1: Cat-tox genexpressie profielen voor de verschillende seizoenen voor de locatie Zelzate (n = 3).Looptijd campagne september 2006-september 2007.	50
Figuur 6.2: Voorbeeld van concentratierespons curve voor staal 79 (Zelzate, 13/7/2007) en overeenkomstige filterblanco in de MELN assay met meting van oestrogene activiteit uitgedrukt als luciferase activiteit t.o.v. solvent controle in agonistische mode (a) of als luciferase activiteit t.o.v. solvent controle met E2 in antagonistische mode (b).....	53
Figuur 6.3: Voorbeeld van concentratierespons curve voor staal 19 (Aarschot; 2/1/2007) en overeenkomstige filterblanco in de MELN assay met meting van oestrogene activiteit uitgedrukt als luciferase activiteit t.o.v. solvent controle in agonistische mode (a) of als luciferase activiteit t.o.v. solvent controle met E2 in antagonistische mode (b).....	54
Figuur 6.4: gemiddelde en spreiding van metingen voor oestrogene activiteit met de MELN assay, uitgedrukt als relatieve inductie score, voor alle meetpunten en tijdstippen.	56
Figuur 6.5: Cytotoxiciteit (gemiddelde \pm 95% CL) van de partikelfase op de THP-1, A549 en Beas-2B cellijn.....	58
Figuur 7.1: Directe (A) en indirecte (B) mutageniciteit in functie van de blootstellingconcentratie voor de verschillende locaties (gemiddelde \pm 95%CL)....	66
Figuur 7.2: Variatie in functie van de tijd van de directe en indirecte mutageniciteit voor de verschillende locaties.	68
Figuur 7.3: Mutagene activiteit in functie van de seizoenen.	69
Figuur 7.4 :a) Box-Whisker plot gemiddelde fold inductie per locatie, b) Box-Whisker plot voor de verschillende locaties zonder het staal lente Zelzate (pool van 14-26/05/07 en 07/06/07).	70
Figuur 7.5: Score plot (condities) van PCA dataset hoogste fold inductie, Aar = Aarschot, Bor = Borgerhout, Zel = Zelzate en Blan = Blanco.....	71
Figuur7.6: Loading plot (genen) met verklarende factoren voor de spreiding van de verschillende locaties.....	71
Figuur 7.7: Box-Whisker plot seizoenverschillen, gemiddelde fold inductie, (gemiddelde \sum FI Cyp1A1 tot Grp78) per staal.....	72
Figuur 7.8: PCA score plot voor de verschillende seizoenen.....	73
Figuur 7.9: PCA loading plot met spreiding van de genen.....	73
Figuur 7.10: Individuele Spearman rank correlatie tussen windsnelheid (x-as) en Xre (y-as).	75
Figuur 7.11: Scatterplot FI gehele campagne in Zelzate.....	76
Figuur 7.12: Relatieve inductie score voor oestrogene activiteit als ratio staal/filterblanco (RIS) voor Zelzate, Aarschot en Borgerhout in functie van monstername datum met deelfiguren a,b,c voor verschillende testconcentraties van extracten.....	78
Figuur 7.13: Relatieve oestrogene inductie (RIS) voor de 3 locaties A (Aarschot), B (Borgerhout) en Z (Zelzate) bij de hoogste testconcentratie van de stalen 9.72 m ³ /ml.	78

Figuur 7.14: Spreiding van gemeten relatieve oestrogene inductie (RIS) bij 2 hoogste testconcentraties (a en b) i.f.v. tijdstip van bemonstering met indeling volgens seizoenen met sept.- nov.= 1; dec.- febr. = 2; ma – mei = 3 en juni - aug.= 4	79
Figuur 7.15: Relatie tussen relatieve oestrogene inductie bij 2 testconcentraties van extracten luchtfilters (a bij 4.86 m ³ /ml en b bij 9.72 m ³ /ml) i.f.v. de temperatuur in de omgevingslucht.	81
Figuur 7.16: Vergelijking van de cytotoxiciteit van de partikels in (A) THP-1 en in (B) Beas-2B cellen tussen de verschillende monsternameplaatsen (gemiddelde ± 95% CL).	82
Figuur 7.17: Variatie in de cytotoxiciteit (bij 200µgTSP/ml) voor de verschillende locaties in functie van de monstername dag.....	83
Figuur 7.18: Dosisrespons relatie van de cytokineproductie (A:TNF-α, B:il-8 in A549; C:il-6 in Beas-2B; D:il-8 in Beas-2B) na blootstelling aan partikels van verschillende locaties (punten zijn gemiddelde SI ± 95% CL van de verschillende monstername dagen).	87
Figuur 7.19: Variatie in de cytokine-inductie (SI) voor de verschillende locaties in functie van de monstername dag.	88
Figuur 7.20: Relatie tussen (A) directe en (B) indirecte mutageniciteit en concentratie PM10.....	93
Figuur 7.21: Mutagene activiteit per filter versus concentratie PM10 per filter (A:Aarschot, B:Bergerhout, C:Zelzate).....	95
Figuur 7.22: Individuele correlaties tussen OC (x-as linkse figuur), TC (x-as rechtse figuur) en Fos (y-as).....	99
Figuur 7.23: Individuele correlaties tussen OC (x-as linkse figuur), TC (x-as rechtse figuur) en Gadd 45 (y-as).	100
Figuur 7.24: Spearman rank correlatie tussen PM10 (x-as) en Cyp1A1 (y-as).....	100
Figuur 7.25: Relatie tussen relatieve inductie score voor oestrogene potentie (RIS) bij een testconcentratie van 9.72 m ³ /ml en pollutent metingen voor totaal organisch koolstof, die niet significant is (a) en totale PAKs, die significant is volgens Spearman rank testing (b).	103

VERKLARENDE WOORDENLIJST EN AFKORTINGEN

- 1 μg = 0.000001 g (microgram)
1 μm : 0.000001 m (micrometer)
1 mg = 0.001 g (milligram)
1 ng = 0.000000001 g (nanogram)
16HBE: bronchiale epitheel cellijn
2-AA: 2-amonoanthraceen
a.d.:aerodynamische diameter
AhR: Ah-receptor of Aryl hydrocarbon receptor
Al: aluminium
Ames: Salmonella typhimurium his- reverse mutatie test
ANOVA: analysis of variance
As: arseen
ASE: accelerated solvent extraction
ATCC: American Type Culture Collection
B(a)P: Benzo-a-pyreen
Ba: barium
Be: berillium
BEAS2B: humane bronchiale epitheel cellijn
BeP: benzo-e-pyreen
B-lymfocyten: B-cellen zijn witte bloedcellen die een belangrijke rol spelen in het humorale afweersysteem (productie van antistoffen)
Ca: calcium
Cat-tox: reporter test gebaseerd op 13 genetisch gemodificeerde humane HepG2 levercellijnen
CB: carbon black
Cd: cadmium
Cl: chloor
CL: confidentie limiet, betrouwbaarheidsinterval
correlatie: Een correlatiecoëfficiënt is een maat voor de correlatie tussen twee stochastische grootheden (of stochastische variabelen). Men spreekt van correlatie als er tussen de beide grootheden een zekere lineaire samenhang is, in die zin dat waarden van de beide grootheden dezelfde of een tegengestelde tendens vertonen. Zo is er sprake van correlatie tussen de grootheden lengte en gewicht bij (volwassen) mensen. Met toenemende lengte neemt gemiddeld gezien ook het gewicht toe. Correlatie kan, maar hoeft niet op een causaal verband te duiden.
correlatiecoëfficiënt: De correlatiecoëfficiënt is een getal dat de mate van correlatie tussen twee grootheden of variabelen aangeeft. Dit getal wordt aangeduid met de letter R/r en ligt tussen -1 en +1.
c-PAKs: carcinogene-aromatische koolwaterstoffen
Cr: chroom
Cu: koper
CytoTox-ONE: meetmethode voor cytotoxiciteit via fluorescentiemeting, volgens principe van lactate dehydrogenase lekkage (LDH leakage). Methode wordt toegepast in de MELN assay.

CV: variatiecoëfficiënt
d.w.z.: dit wil zeggen
Dagequivalent: hoeveelheid ingeademde lucht over 24 uur
DDT: dichloor-diphenyl-trichloorethaan, een organisch chemisch insecticide
DEP: diesel exhaust particles
DMSO: dimethylsulfoxide
DNA: Deoxyribonucleïnezuur, belangrijkste drager van erfelijke informatie
E2: 17 β -oestradiol
EC: effect concentratie
ELISA: enzyme linked immune sorbant assay
Endotoxine: lipopolysaccharide in de celwand van gramnegatieve bacteriën met immunomodulerende werking
Eq.: equivalent
ER: oestrogen receptor
EU: Europese Units
Fe: ijzer
FI: fold inductie
GC-MS: gaschromatografie-Massaspectrometrie
H₂O: water
HIS: histidine
i.f.v: in functie van
IARC: International Agency for research on Cancer
IgE: immunoglobuline E
Il-6: interleukine 6
Il-8: interleukine 8
individuele PAK's ten opzichte van benzo(a)pyreen. Aan benzo(a)pyreen wordt een TEF=1 toegekend
INSERM: Frans nationaal instituut voor gezondheid en medisch onderzoek
l/min: liter per minuut
La: Lanthaan
LAL: Limulus Amebocyte Lysate
LDH: Lactaat dehydrogenase
LNE: Departement Leefmilieu, Natuur en Energie van de Vlaamse Overheid
M&G: milieu en gezondheid
m.b.t.: met betrekking tot
m³/h: m³ per uur
MCF-7: humane borstkanker cellen
MELN: getransformeerde humane borstkankercellijn
Mn: mangaan
Mo: molybdeen
mutatie: veranderingen in het erfelijk materiaal (DNA of RNA) van een organisme
n.l.: namelijk
N: stikstof
N₂: stikstof
Na⁺: natrium ion
nc-PAK: niet-carcinogenen polyaromatische koolwaterstof

Nd: Neodymium
 NH₄⁺: ammoniak ion dat
 NHBE: primaire humane bronchiale epitheelcellen
 Ni: nikkel
 nitro-PAK's: Dit zijn genitreeerde varianten van de PAK's. Tot op heden de krachtigste kankerverwekkende stoffen in dierproeven. Ook deze zijn voornamelijk bijproducten van verbranding.
 NNW: noord-noord-west
 NO₃⁻: ion van stikstofdioxide of nitraat
 NQO: 4-nitroquinoline-N-oxide
 NR: neutraal rood
 NW: noord-west
 o.a: onderandere
 O₃: ozon
 OC: organische koolstof
 P: fosfor
 P₉₀: 90^{ste} percentiel, een getal zodanig dat 90% van de data kleiner is of eraan gelijk en 10% groter of eraan gelijk
 PAK's: Poly-aromatische koolwaterstoffen zijn organische stoffen die verschillende benzeenringen als basisstructuur hebben, Polycyclische aromatische koolwaterstoffen zijn een klasse van ongewenste bijproducten van voornamelijk verbranding en in grote hoeveelheden in ruwe petroleum. Vele leden van deze familie zijn krachtige kankerverwekkers. Zij zijn persistent en stapelen zich op in de voedselketen.
 Pb: lood
 PCA: principale component analyse
 PCBs: polychloorbiphenylen
 Pd: palladium
 PDMS: Polydimethylsiloxaan
 PM 0.1: ultrafijne deeltjes met een *a.d.* kleiner dan 0.1 µm
 PM 10: alle deeltjes met een *a.d.* kleiner dan 10 µm
 PM 10-2.5: grove deeltjes met een *a.d.* groter dan 2.5 µm en kleiner dan 10 µm
 PM 2.5: kleine en ultrakleine deeltjes met een *a.d.* kleiner dan 2.5 µm; (fijn stof)
 PM/ml: partikels per ml
 PM: particulier materiaal
 PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate
 Pt: platina
 PTFE: teflon
 PUF: polyurethaan foam
 p-waarden:
 R: correlatie
 RAIAP: Europees project : Respiratory Allergy and Inflammation Due to Ambient Particles, <http://www.raiap.org/>
 ReProTect: acronym van het EU 6 de kaderprogramma onderzoeksproject met de titel 'Development of new in vitro tests to replace animal experimentation in reproductive toxicology'.

Rev/m³: revertanten per m³ lucht
 Rh: rhodium
 RIS: relatieve inductie score in de MELN assay (betreft signaal na correctie voor filter blanco)
 RLU: relatieve light units (bij luminiscentie metingen in de MELN test).
 Rpm: rotaties per minuut
 R-waarden: correlatiecoëfficiënt is een maat voor de correlatie tussen twee stochastische grootheden
 S: zwavel
 S9: homogenaat van rattelever dat metaboliserende leverenzymen bevat
 Sb: Antimoon, ook antimonium of stibium
 Sc: scandium
 SC: solvent controle
 SD: Standaard afwijking
 Se: selenium
 SI: stimulatie index
 SIM-mode: detectie met selective ion monitoring
 Sm: Samarium
 SO₄⁻²: sulfaat anion
 Sr: strontium
 t.o.v: ten opzichte van
 TC: totale koolstof
 TEF: Toxic Equivalency Factor, Toxische EquivalentieFactor of de relatieve carcinogene potentie van de
 THP-1: humane monocyt cellijn
 Ti: titanium
 T-lymfocyten: T-cell zijn specifieke afweercellen en vormen een onderdeel van de specifieke cellulaire afweer. Ze zijn specifiek, want elke T-cel kan reageren op een specifiek vreemd oppervlak-herkennisplaatsen
 TNF- α : Tumor necrosis factor α
 TSP: total suspended matter or particles, is een mengsel van deeltjes van uiteenlopende samenstelling en afmeting in de lucht.
 U/ml: units (eenheden) per ml
 U: uranium
 UA: Universiteit Antwerpen
 v.b.: bijvoorbeeld
 V: vanadium
 VITO: Vlaamse Instelling voor technologisch Onderzoek
 VMM: Vlaamse Milieu Maatschappij
 VOS: Vluchtige Organische Stoffen
 W: westen
 Ws: windstil
 WNW: west noord west
 WZW: west zuid west
 YES: yeast estrogen screen
 Zn: zink

Zware metalen: hieronder worden vaak de volgende acht elementen verstaan die door de Derde Noordzeeconferentie als prioritair worden beschouwd: As, Cd , Cr , Cu , Hg , Pb, Ni en Zn. Als sporenelementen zijn veel van deze elementen noodzakelijk voor het ondersteunen van het biologische leven. Bij hogere niveaus worden ze daarentegen toxisch, kunnen ze accumuleren in biologische systemen en vertegenwoordigen ze een significant gezondheidsrisico.

WOORD VOORAF

Hoewel het vaststaat dat blootstelling aan luchtpollutie een risico kan inhouden voor de humane gezondheid, blijven onzekerheden en leemtes in kennis met betrekking tot de onderliggende mechanismen en specifieke effecten bestaan. Toxicologie draagt ertoe bij om deze biologische processen en de invloed van pollutanten op de humane gezondheid beter te begrijpen en in te schatten. Dergelijke informatie vormt bijgevolg een onontbeerlijke basis voor de predictie en preventie van milieu- en gezondheidsproblemen. De toxicologische benadering kan onderverdeeld worden in “*in-vivo*” en “*in-vitro*” experimenten. *In-vivo* experimenten bestuderen effecten in levende organismen (mens en andere organismen); *in-vitro* experimenten worden daarentegen uitgevoerd op organen, weefsel of cellen geïsoleerd uit levende organismen, gisten, pro- en eukaryotische cellijnen.

In opdracht van de toenmalige Cel Milieu & Gezondheid (huidige dienst Milieu & Gezondheid van het departement LNE), voerden Vito en Universiteit Gent recent een verkennend literatuuronderzoek uit voor de evaluatie van de luchtkwaliteit in Vlaanderen door effectgerichte metingen in de omgevingslucht. Een volgende logische stap hield het praktisch uitwerken en implementeren van een pilootproject voor effectgerichte metingen in Vlaanderen in.

Het voorliggend document werd uitgewerkt door Vito en Universiteit Antwerpen en beschrijft het verloop en de resultaten van dit pilootproject. Zij werden hierin begeleid door een zeer actieve stuurgroep, waarin verschillende betrokken overheden vertegenwoordigd waren. Tijdens verschillende stuurgroepvergaderingen kwam het tot een uitermate boeiende uitwisseling van kennis en inzichten.

Dit rapport moet beschouwd worden als een basisdocument dat uitnodigt tot verdere kritische evaluatie. De resultaten zullen nog verder worden verfijnd, besproken en geïnterpreteerd in de daartoe bevoegde organen.

ir. Maja Mampaey en dr. ir. Karen Van Campenhout,
Dienst Milieu & Gezondheid,
Departement Leefmilieu, Natuur en Energie
April 2008

Met dank aan de leden van de stuurgroep: J. Vercauteren (VMM), M. Desmedt (VMM), M. Rossier (VMM), E. Roekens (VMM), N. Claeys (VMM), L. Hoebeke (VMM), M. Bossuyt (VMM), H. Reynders (LNE), I. Overmeer (LNE), M. Van der Elst (LNE), D. Wildermeersch (Agentschap Zorg en Gezondheid)

1 Samenvatting

In opdracht van de dienst Milieu & Gezondheid van het departement LNE hebben Vito en UA een pilootproject voor effectgerichte metingen in omgevingslucht uitgevoerd. Het doel was de toepasbaarheid van effectgerichte metingen voor beoordeling van de luchtkwaliteit in Vlaanderen te evalueren. Een geïntegreerd biologisch meetnet zou de verspreiding en blootstelling aan schadelijke stoffen met risico's voor de volksgezondheid in kaart kunnen brengen. Gezondheidsklachten of ziektepatronen die in verband gebracht worden met luchtpollutie zijn ondermeer kanker, cardiovasculaire ziekten, astma en allergieën en fertiliteitsproblemen. Dit werd uitvoerig beschreven in de literatuurstudie die aan huidig project voorafging (Witters et al., 2005). Er werden daarom voor het pilootproject *in vitro* screening methoden geselecteerd met eindpunten als mutageniciteit, immunotoxiciteit, endocriene verstoring en cytotoxiciteit. Op basis van verkregen resultaten kan relevante informatie met betrekking tot het schadelijke karakter van omgevingslucht en potentiële gezondheidschade door luchtvervuiling ingewonnen worden.

In een eerste fase werd de logistieke organisatie van monsternamen afgestemd met het bestaande PAK-meetnet van de Vlaamse Milieumaatschappij. In een tweede fase werden methoden voor monsterbehandeling en toepassing van biologische testen op hetzij organische extracten, hetzij partikelfractie van luchtmonsters geoptimaliseerd. Een derde fase betrof de meetcampagne, gespreid over een gans jaar en over drie meetplaatsen in Vlaanderen met diverse aard van luchtvervuiling zijnde Zelzate, Borgerhout en Aarschot. In een laatste fase werden de verkregen resultaten geïnterpreteerd en geëvalueerd in functie van tijd, locatie en variaties van meteorologische omstandigheden enerzijds, en in relatie tot pollutiegegevens anderzijds.

Er werden in deze studie een industriële site (Zelzate), een stedelijke site (Borgerhout) en een landelijke site (Aarschot) bemonsterd. Tijdens de periode september 2006 tot september 2007 werden per locatie 32 luchtstalen (TSP= Total suspended matter) gecollecteerd op filters gebruikmakend van de hoog volume bemonsteringsstations van VMM (Digitel). Van een vierde deel van de filter werden de stofdeeltjes verzameld via wassen en het overige deel van de filter werd geëxtraheerd om specifiek de organische componenten te weerhouden. Afhankelijk van het testsysteem en het eindpunt, werden of de partikels of de organische extracten toegevoegd en de toxicologische responsen gemeten.

De cytotoxische (niet specifieke celschade) en immunotoxische (inflammatoire) effecten van de partikelfractie (TSP) van de bemonsterde filters werd gemeten in 3 representatieve humane cellijnen (de alveolaire A549 cellijn, de bronchiale Beas-2B epitheliale cellijn en de macrofagen THP-1 cellijn). Significante variaties in cytotoxiciteit tussen de dagen werden gemeten in de THP-1 en de Beas-2B cellijn. Voor deze laatste werden de hoogste signalen gemeten in stalen uit Zelzate. In parallel werd een inflammatoire respons in de cellijnen aangetoond via meting van cytokineproductie. Het inflammatoir potentieel van de partikels uit het stedelijk gebied Borgerhout bleek hoger dan deze van de partikels uit

de andere locaties. De immunologische responsen bleken eerder op te treden in stalen van het voorjaar, en konden niet volledig toegeschreven worden aan de aanwezigheid van endotoxines op de partikels. De hoeveelheid zwevend stof bleek verband te houden met de intensiteit van de cytotoxische en inflammatoire respons, terwijl ook de chemische samenstelling bijdraagt tot het gemeten toxisch effect van de TSP. Tot slot werd een positieve correlatie aangetoond tussen de omgevingstemperatuur en het cytotoxisch en inflammatoir potentieel.

Mutagene effecten werden waargenomen in de *Salmonella* mutageniciteit test (Ames) na blootstelling aan organische extracten. Significante variaties tussen de staalnamedagen werden gezien voor de drie locaties. Statistische evaluatie met een combinatie van de gegevens voor locatie en tijd toonde significant verhoogde mutagene activiteit in stalen van de industriële locatie Zelzate. Zowel de totale hoeveelheid zwevend stof, als de aard van de organische belading op de partikels bleken bepalend te zijn voor de intensiteit van de mutagene respons.

De significante inducties van verschillende merkers van de Cat-tox assay toonden een verhoogde stressrespons na blootstelling aan organische extracten van een dagequivalent lucht. Zowel de merkers voor DNA-schade als deze voor inductie van de receptor die stoffen met dioxine-achtige werking kan binden, bleken gecorreleerd met verschillende chemische parameters zoals totale hoeveelheid PAKs, organische koolstof en PM10 gemeten in de luchtstalen. Deze bevindingen duiden op potentieel verhoogde DNA-schade na blootstelling aan deze luchtstalen.

Met behulp van de MELN assay, een humane reporter cellijn die getransformeerd werd met de humane oestrogen receptor, werd de aanwezigheid van stoffen met oestrogene activiteit in organische extracten van luchtfilters aangetoond. Globaal werden er geen verschillen in activiteit gemeten tussen de locaties, terwijl voor alle locaties het winterseizoen de hoogste oestrogene activiteit opleverde. De gemeten oestrogene activiteit was positief gecorreleerd met de temperatuur, terwijl er een omgekeerde significante relatie met totale PAKs en carcinogene PAKs werd gevonden. Gezien het diverse spectrum aan hormoonversturende stoffen, welke a priori niet in het huidige meetnet lucht gemeten worden, kan de MELN biotest een toegevoegde waarde bieden om schadelijke extracten op te sporen.

De resultaten toonden aan dat de batterij van testen inderdaad vervuilde luchtstalen herkent. Het toxicologische profiel met diverse eindpunten gemeten voor elk van de stalen per locatie en per tijdstip werd in kaart gebracht. De herkomst van stalen, de periode van monsternamen en de meteorologische condities bleken de toxische respons van bemonsterde luchtstalen te beïnvloeden. Het bleek slechts in beperkte mate mogelijk om de waargenomen toxicologische effecten eenvoudig te verklaren door de aanwezigheid van de componenten die chemisch gemeten werden. Het is algemeen aanvaard dat de klassieke chemische analyses binnen het meetnet lucht de gekende luchtpolluenten op een gevoelige en accurate wijze detecteren. De beperking ligt echter in het aantal gemeten polluenten en het ontbreken van informatie over de gezamenlijke toxicologische activiteit (additief, synergistisch,...) van gekende en niet-geïdentificeerde

stoffen. Een effectgerichte meetstrategie, zoals beschreven in dit project, komt hieraan tegemoet door integratie van chemische analyse met *in vitro* toxiciteitstesten representatief voor specifieke werkingsmechanismen van stoffen.

De resultaten binnen dit pilootproject lieten toe aanbevelingen te formuleren voor een effectgericht meetnet in Vlaanderen. Dergelijk meetnet verdient afstemming met bestaande meetnetten lucht en geplande Vlaamse humane biomonitoringstudies.

2 Summary

This study was sponsored by the Environmental & Health division of the Environment, Nature and Energy Department of the Flemish Government. In this pilot study the use of bioassays or *in vitro* (toxicological) effect measurements on ambient air samples was explored by Vito and UA. The aim of the study was to evaluate the practical use of bioassays for the assessment of the air quality in Flanders. Using integrating biological systems as a monitoring system for air quality would enable to evaluate the spreading and exposure of the population to harmful or toxic components in the air and map the results to health problems or patterns of diseases that are related to air pollution. Diseases like some types of cancer, cardiovascular diseases, asthmatic diseases, allergy and fertility problems are known to be related to air pollution. An inventory and discussion on air pollution related diseases has been made in a literature study which preceded this project (Witters et al., 2005). Therefore in this pilot project *in vitro* screening methods were selected that are indicative for these disorders: mutagenicity, immunotoxicity, endocrine disruption and cytotoxicity. Based on the results of these bioassays, relevant information on the hazardous characteristics of the ambient air quality and the related potential health effects could be generate.

In the first phase of the project the sampling design was organized in coordination with the PAH monitoring network of the Flemish Environmental Agency (VMM). During the second phase the methods for sample treatment and biotests performance on either organic extract of the collected air particles and on the particulate fraction itself were optimized. In the third phase the environmental air sampling campaign was performed in which 3 locations were selected with different air quality parameters: Zelzate, Borgerhout en Aarschot. The air monitoring was spread over one year with regular sampling days. In the final phase the results were interpreted and evaluated as a function of time, location and variations in the meteorological conditions on the one hand, and variations in pollution patterns on the other hand.

Environmental air samples were taken at an industrial site (Zelzate), an urban site (Borgerhout) and a rural site (Aarschot) from September 2006 till September 2007. At each location 32 air samples (TSP = Total suspended matter) were collected on filters using the high volume samplers (Digitel) from VMM. The particulate matter from one fourth of the filter surface was collected and the remainder of the filter was extracted to collect specifically the organic components present on the particles. Depending upon the test system either the particles or the extracts were tested in the bioassay.

The particulate fractions TSP were tested in the cytotoxicity test (indicating non-specific toxicity) and the immunotoxicity test (inflammatory responses) using 3 representative human cell lines (alveolar epithelial A549 cell line, bronchial epithelial Beas-2B cell line and the macrophage THP-1 cell line). Significant variations in cytotoxicity were seen between the sampling days in the THP-1 and Beas-2B cell lines. In the latter the highest cytotoxic effects were seen in samples from Zelzate, while no location specific effects were seen in the THP-1 cells. In parallel inflammatory responses in the 3 cell lines could be demonstrated by cytokine induction. The inflammatory potential (inb THP-1 and

Beas-2B cells) of the particles collected at the urban site Borgerhout was higher compared to particles collected at the other sites. The immune responses were mainly seen in the spring samples, and could not (entirely) be explained by the presence of endotoxines on the particles. The intensity of both the cytotoxic and immunotoxic responses were related to TSP mass concentration (concentration - effect relationship), but also the chemical composition of the particulate matter contributes to the observed toxic responses. Finally, a positive correlation could be demonstrated between the ambient air temperature at time of collection and the cytotoxic and inflammatory potential.

Mutagenic effects in the *Salmonella* mutagenicity test (Ames) were demonstrated after exposure the organic extracts. Significant temporal variations between the samples were seen at all three locations. Statistical analysis of measurements through combination of effects for location and time, demonstrated an increased mutagenic potency seen at the industrial location of Zelzate. Both the amount of particulate matter and the type of organic pollution on the particles were responsible for the intensity of the mutagenic responses.

Significant inductions of different markers in the Cat-tox assay indicated an elevated stress response after exposure to organic extracts. Both markers for DNA damage and for the induction of the receptor with affinity for dioxin-like pollutants, were increased and correlated to different chemical parameters like total PAHs, organic carbon and PM10 in the samples. These findings suggest increased DNA damage after exposure to air samples.

The MELN assay, a human reporter cell line that has been transformed with the human estrogen receptor, was used to detect the presence of estrogen like compound in the organic extracts. In global no differences in activity were seen between the different locations, but there was a seasonal variation at all locations with the highest estrogenic activity measured during winter. The estrogenic activity was positively correlated with ambient air temperature, and significantly inverse related to total PAH and carcinogenic PAHs. As the spectrum of possible hormonal disturbing agents is very large and almost none of these agents are taken into account in the current monitoring networks of VMM, an integrating biosensor like the MELN biotest could have an additive value in evaluating air samples for their toxicological potential.

In general the results clearly demonstrate that the battery of biotests enables the recognition of polluted samples. Toxicological profiles were generated as a function of location and time. The toxicology profile was related to location, time of collection and meteorological conditions. The toxicological effects could only partly be explained by the chemical composition of the samples. It is generally accepted that the chemical measurements of known air pollutants within the air monitoring network are sensitive and accurate. Chemical analyses however are limited in the number of parameters that can be measured. Also there is a lack of information on the mutual toxicity of mixtures of compounds (addition, synergy..) that hamper the prediction of toxicity based on chemical composition. A network based on effect measurements, as described in this project,

provides a valuable instrument to overcome these shortcomings. Combining chemical analyses and *in vitro* tests could be of interest as the latter enables to measure the biological responses of each of the toxic compounds and their combinations..

The results of this pilot project allowed to make conclusions and recommendations for the design of a Flemish monitoring network based on bioassays. It is recommended to tune this network with the existing air monitoring networks and planned Flemish human biomonitoring studies.

3 Inleiding

Fijn stof is een verzamelnaam voor zeer kleine deeltjes die zich in de lucht bevinden. Uit diverse epidemiologische studies blijkt dat er een duidelijk verband bestaat tussen concentraties fijn stof in de lucht en gezondheidsklachten. Het gaat bijvoorbeeld om aandoeningen aan de luchtwegen, hart- en vaatziekten en vroegtijdige overlijdens en hospitalopnames ten gevolge van astma-aanvallen en cardio-vasculaire aandoeningen, de stijging van het aantal luchtweginfecties, verminderde longfunctie en levenskwaliteit (Brunekreef and Holgate, 2002). Het blijkt dat er geen concentratie is aan te geven waar beneden geen negatieve gezondheidseffecten optreden. Anders gezegd: voor fijn stof geldt geen drempelwaarde (Air Quality Guideline van de World Health Organisation (WHO)).

Hoewel het vaststaat dat blootstelling aan luchtpollutie een risico kan inhouden voor de humane gezondheid, blijven onzekerheden en leemtes in kennis met betrekking tot de onderliggende mechanismen en specifieke effecten bestaan. Verscheidene toxicologische hypothesen en mechanismen zijn waarschijnlijk. Men neemt aan dat de biologische effecten en gezondheidsschade veroorzaakt worden door verschillende chemische componenten of fysische eigenschappen van PM₁₀ en PM_{2.5}. De chemische samenstelling is vaak complex en zowel de massahoeveelheid als het aantal deeltjes via inademing opgenomen wordt zijn bepalend voor de toxiciteit.

Zwevend stof is een mengsel van deeltjes van uiteenlopende samenstelling en afmeting in de lucht. De deeltjes worden ingedeeld in fracties op basis van hun grootte. PM₁₀, PM_{2.5} en PM_{0.1} zijn de fracties van de deeltjes met een aerodynamische diameter kleiner dan respectievelijk 10, 2.5 en 0.1 μm . (1 μm = één duizendste van een mm). Inademing is de belangrijkste opnameroute voor zwevend stof. Enkel wanneer zware metalen (zoals lood) en zeer toxische organische stoffen aanwezig zijn, kan opname via het maag-darmkanaal ook belangrijk zijn (via inslikken van opgehoeste fluïmen).

De verdeling in de luchtwegen en de hoeveelheid van de stofdepositie hangt af van de grootte van de deeltjes (aërodynamische diameter) en van de manier van ademen. Alleen deeltjes kleiner dan 10 μm worden beneden het strottenhoofd afgezet. Het is deze fractie die dan ook bepalend zal zijn voor de respiratoire effecten. De grotere deeltjes worden voornamelijk afgezet in de trachea en bronchen, de kleinste (<2.5 μm) dringen door tot in de longblaasjes. Bij mondademhaling (zoals bij fysieke inspanning en conversatie) is er meer opname in diepere luchtwegen dan bij neusademhaling. De toxische bestanddelen van stof zoals metalen kunnen zich na afzetting in de longen nog verder in het (menselijk) lichaam verspreiden via de bloedbaan of het lymfestelsel. Ultrafijne deeltjes kunnen gedeeltelijk na inademing relatief snel doordringen in de bloedbaan.

Het is algemeen aanvaard dat de klassieke chemische analyses noodzakelijk zijn voor de opsporing van pollutanten. Deze chemische analysemethodes zijn zeer gevoelig en accuraat, maar zijn beperkt in het aantal stoffen dat geanalyseerd kan worden. Fysische en chemische metingen volstaan niet als basis voor de inschatting van gezondheidseffecten. De relatie tussen blootstelling en effecten van deze stoffen bij lage concentraties, zoals in de lucht gemeten kan worden, is immers niet of slecht

gekaracteriseerd. Bovendien is de grote meerderheid van gezondheidsschadende stoffen niet geïdentificeerd. Een bijkomend voordeel van het gebruik van biologische testsystemen is dat deze rekening houden met mengseltoxiciteit.

Toxicologie draagt ertoe bij om deze biologische processen en de invloed van pollutanten op de humane gezondheid beter te begrijpen en in te schatten. Toxicologische testen worden meer en meer gebruikt als aanvulling op de klassieke chemische analyse om de toxiciteit en het werkingsmechanisme van een stof of een mengsel van stoffen beter te begrijpen. De toxicologische benadering kan onderverdeeld worden in “*in vivo*” en “*in vitro*” experimenten. *In vivo* experimenten bestuderen effecten in levende organismen (mens en andere organismen). *In vitro* experimenten worden daarentegen uitgevoerd op organen, weefsel of cellen geïsoleerd uit levende organismen, of op gisten, pro- en eukaryotische cellijnen.

In vitro testsystemen werden oorspronkelijk ontwikkeld als snelle en vroege screening methodes in de toxicologie/farmacologie, waar zij respectievelijk gebruikt worden om de schadelijke eigenschappen en/of werkingsmechanismen van nieuwe stoffen te kunnen opsporen met het oog op het beperken of vervangen van proefdier testen.

De toepassing van *in vitro* testen in milieuonderzoek is relatief nieuw, en nog niet algemeen gangbaar (Bakand *et al.*, 2005). Toch tonen diverse internationale studies en publicaties de toepassingsmogelijkheden van *in vitro* testen voor de gevaarsidentificatie van omgevingslucht/ luchtdeeltjes aan (Osornio-Vargas *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2005a; Sandstrom *et al.*, 2005; De Vizcaya-Ruiz *et al.*, 2006; Steerenberg *et al.*, 2006a). Effectgerichte metingen laten, in vergelijking met de klassieke stofgerichte benadering, een meer geïntegreerde inschatting van de invloed van schadelijke milieufactoren toe. Additieve en synergistische effecten die kunnen optreden bij blootstelling aan complexe mengsels van agentia die in het leefmilieu voorkomen worden hierbij immers in rekening gebracht. Tevens wordt meer inzicht verworven in de mogelijk schadelijke effecten verbonden aan niet-geïdentificeerde of als niet-gevaarlijk erkende stoffen.

Door een luchtstaal te screenen met een batterij van biologische meetsystemen, die enerzijds de acute toxiciteit en anderzijds een aantal specifieke biologische effecten van het mengsel kunnen meten, kan men het eerste deel van de risico-evaluatie (gevaarsidentificatie) voor een aantal belangrijke toxische eindpunten invullen. Hierdoor wordt aangegeven welke gezondheidseffecten men kan verwachten bij inademing.

Effectgerichte metingen laten toe om de impact van deze stoffen op mens en milieu in een eerste fase in te schatten zonder dat ze exact te identificeren of te kwantificeren. De toepassing van effectgerichte testmethodes biedt tal van voordelen en mogelijkheden voor een geïntegreerde risico-evaluatie. De voordelen van effectgericht meten ten opzicht van de klassieke stofgerichte benadering zijn ondermeer de volgende:

- Klassieke analytische technieken sporen enkel bekende stoffen op, en schieten soms tekort qua detectiemogelijkheden en/of –limieten indien het complexe milieumatrix betreft;
- Concentraties van stoffen op zich geven geen informatie betreffende hun al dan niet schadelijke effecten voor mens en milieu;

- Het optreden van een schadelijk effect kan zelden beschreven worden als de som van de concentraties van voorkomende stoffen (synergistische, additieve,... effecten);
- Effectgerichte tests kunnen als screening gehanteerd worden om eventueel verdergaand onderzoek naar enerzijds gezondheidseffecten en anderzijds bronnen van vervuiling vooraf te gaan.

In opdracht van het departement LNE, Dienst Milieu & Gezondheid, voerden VITO (Milieutoxicologie) en Universiteit Gent in 2005 een verkennend onderzoek uit naar de evaluatie van de luchtkwaliteit in Vlaanderen door effectgerichte metingen in de omgevingslucht (OL200300060). Effecten van luchtpolluenten kunnen bestudeerd worden in bacteriën, gisten, diverse cellijnen of primaire cellen. Een volgende stap is een het praktisch uitwerken en implementeren van een pilootproject voor effectgerichte metingen in Vlaanderen.

De doelstelling van deze studie is het uitwerken en uitvoeren van een pilootproject voor effectgerichte metingen om de luchtkwaliteit in meerdere testgebieden in Vlaanderen te evalueren door gebruik te maken van relevante en bruikbare biologische methodes om extracten van atmosferische pollutie te meten op biologische activiteit zoals mutageniciteit, immunotoxiciteit, endocriene verstoring en systemische toxiciteit. Bijkomend zal de bruikbaarheid van dergelijke meetstrategie voor de gevaarsidentificatie van luchtmonsters geëvalueerd worden.

Bij de uitwerking van dit pilootproject werd rekening gehouden met de bevindingen in het eindrapport van de onderzoeksoopdracht "Evaluatie van de luchtkwaliteit in Vlaanderen door effectgerichte metingen in de omgevingslucht" (OL200300060). Voor het uitwerken en uitvoeren van dit pilootproject werden enkel *in vitro* testsystemen voor screeningsdoeleinden beschouwd.

Kort samengevat werden in de loop van deze studie volgende onderdelen afgewerkt:

Fase I was gericht op de uitwerking van de logistiek voor monsternamen. Dit diende georganiseerd te worden in samenspraak met de Vlaamse Milieumaatschappij, die over de nodige meetinfrastructuur en bemonsteringstoestellen beschikt.

Fase II vormde een voorstudie voor de optimalisatie van de methodes en de evaluatie mbt tot (1) monsternamen en staalbehandeling (artefacten bemonstering, bewaartijd stalen) en (2) toxiciteitstesten (bepaling concentratierange voor blootstellingsexperimenten, bepaling positieve en negatieve controles van referentiestoffen, reproduceerbaarheid,...),

Fase III betrof de meetcampagne, gespreid over een gans jaar en over drie meetplaatsen met diverse aard van luchtvervuiling. Deze uitgebreide fase omvatte de verschillende bemonsteringscampagnes en de uitvoering van de toxiciteitstesten.

Fase IV omvat een interpretatie van de resultaten. De verkregen resultaten werden enerzijds geëvalueerd in functie van tijd-, streek- en meteorologische variaties, en anderzijds in relatie tot pollutiegegevens. Tenslotte werd de bruikbaarheid van deze effect-gerichte meetstrategie besproken.

4 Fase I

In fase I werd in overleg met VMM, die over de nodige meetinfrastructuur en bemonsteringstoestellen beschikt, de logistiek (meetplaatsen en frequentie) voor monsternamen afgestemd.

Omdat er voor het uitvoeren van de verschillende *in vitro* testen veel materiaal nodig is, werd gekozen voor een dynamische hoog-volume bemonsteringsmethode met filtercollectie van het type Digitel. VMM maakt gebruik van deze toestellen in het PAK en nitro-PAK meetnetwerk. De verzameling van stalen werd ook afgestemd met lopende of geplande VMM-studies om een maximum aan beschikbare meetgegevens te verkrijgen in belang van een geïntegreerde blootstelling-effect evaluatie (chemisch, gezondheid, meteo). Er was enerzijds een studie rond chemische karakterisatie van fijn stof (contactpersoon: Jordy Vercauteren, VMM Antwerpen) en anderzijds is er het PAK's meetnet (contactpersoon: Eric Wauters, VMM Gent).

Om een diversiteit aan pollutie te verkrijgen werden monsternamenplaatsen met verschillende pollutiedruk geselecteerd. In functie van beschikbaarheid en vaste standplaatsen van high volume samplers bij VMM werden de volgende meetplaatsen weerhouden (Figuur 4.1):

- Zelzate, Burgemeester Chalmetlaan, Lambert coördinaten: X = 111860 Y = 209690 Hoogte = 6 m , PAK-meetpost van VMM (44R750). Het meetstation bevindt zich in een woonzone op het kruispunt van de Burgemeester Chalmetlaan en de Wachtebekerstraat. De industriezone langs het kanaal Gent-Terneuzen situeert zich hoofdzakelijk in het zuid-zuidwesten.
- Borgerhout, Plantijn en Moretuslei, Lambert coördinaten: X = 154420 Y = 211090 Hoogte = 5 m, PAK-meetpost van VMM (42R801). Het meetstation R801 is gelegen in een stedelijke omgeving met vooral een residentiële en commerciële functie. Op 30 m ten zuiden ervan ligt de Plantin en Moretuslei, één van de belangrijkste verkeersassen van Antwerpen. Op 750 m in oostelijke richting bevindt zich de ring rond Antwerpen.
- Aarschot, Tieltse baan, Lambert coördinaten: X = 182930 Y = 185400 , Hoogte = 55 m, PAK-meetpost van VMM (42N035), Het meetpunt in Aarschot is representatief voor een regionale landelijke achtergrondlocatie en wordt niet door de industrie en weinig (minder dan het station te Borgerhout) door het verkeer beïnvloed. Het station ligt ten noordoosten van de westelijke ring en ten zuidwesten van de oostelijke ring rond Aarschot. Deze meetplaats bevindt zich minstens 1,5 km ten N van de E314 en op minstens 15 km van de E40 Brussel-Luik. Bovendien wordt deze sampler mee ingesloten in het VMM-meetnetwerk, wat niet het geval zou zijn voor eventueel alternatieve landelijke meetpunten.

De meetplaatsen Zelzate en Borgerhout zijn punten die eveneens deel uitmaken van de humane biomonitoringstudie, uitgevoerd door het eerste generatie Steunpunt Milieu en Gezondheid (2002-2006).



Figuur 4.1: Geselecteerde meetstations in Vlaanderen

Omdat er voor het uitvoeren van de verschillende *in vitro* testen veel materiaal nodig is, werd het zwevend stof bemonsterd met de high volume sampler van het type Digitel (aanzuigdebiet 900 l/min = 54 m³/h) en dit in combinatie met een filter systeem. Deze opstelling is technisch gezien de eenvoudigste en dus ook de goedkoopste methode. Hierbij worden de partikel- en de semi-vluchtige fase bemonsterd. Om alleen de inadembare fractie van het zwevend stof te bepalen, werd een voorafscheider, namelijk een TSP-meetkop (TSP= Total Suspended Particles¹) op de high volume sampler gemonteerd, waarin de grotere deeltjes achterblijven. TSP wordt bemonsterd omdat voor het PAKs project van VMM een groot debiet (≥ 1200 m³ per filter) vereist is wat niet mogelijk is wanneer een PM10-kop (debiet 500l/min) wordt gebruikt.

¹ TSP is een mengsel van deeltjes van uiteenlopende samenstelling en afmeting in de lucht. De deeltjes worden ingedeeld in fracties op basis van hun grootte. PM10, PM2.5 en PM0.1 zijn de fracties van de deeltjes met een aerodynamische diameter kleiner dan respectievelijk 10, 2.5 en 0.1 μm . PM staat voor 'particulate matter'. De woon- en industriezones zijn samen met de belangrijkste verkeerswegen de belangrijkste bronnen van TSP. De grovere fractie (PM10) bestaat vooral uit mechanisch gevormde deeltjes die in de lucht worden gebracht door de wind of door antropogene activiteiten, zoals opwaaiend stof bij verkeer en bij opslag en overslag van bulkgoederen. De fijne fractie (PM2.5) bestaat vooral uit deeltjes ontstaan bij verbrandingsprocessen en secundaire reacties. PM2.5 is de som van de ultrafijne en de fijne deeltjes en bestaat vooral uit deeltjes ontstaan door condensatie van verbrandingsproducten of door reactie van gasvormige pollutanten tot secundair aerosol. Transport is de belangrijkste bron van PM2.5. Zwarte rook bestaat voornamelijk uit roet afkomstig van verbrandingsprocessen en vormt een specifieke fractie van PM10 en PM2.5.

De Digitel DHA-80 heeft een filterwisselaar met een voorraad aan filters voor 14 dagen. Dagelijks gebeurt er automatisch een filterwissel. Om de 14 dagen werden de beladen filters verzameld en vervangen door nieuwe filters. Deze toestellen hebben het nadeel dat de filters met de motor in een afgesloten kast zijn opgesteld, zodat de filtertemperatuur gedurende de bemonstering kan oplopen waardoor de kans op chemische reacties of verdamping van vluchtige componenten op de filter toeneemt. Ozon kan eveneens de chemische samenstelling van de stofdeeltjes beïnvloeden.

Er werden stalen verzameld gespreid over 12 maanden tussen september 2006 en september 2007. In totaal werd er op 32 dagen gelijktijdig bemonsterd op de drie locaties met een tijdsinterval van 12 dagen. Voor dezelfde dagen werden door VMM ook chemische meetgegevens verzameld na PM10 bemonstering. De resultaten hiervan werden ter beschikking gesteld voor de interpretatie van de data in deze studie. Het verwisselen en collecteren van de filters werd uitgevoerd door VMM. Filters werden nadien bewaard bij 4°C.

In de Tabel 4.1 wordt een overzicht van de beschikbare filters gegeven met specificaties van monsternamen, datum, monsternamen plaatsen en de bemonsteringstijd (minuten). De bemonsteringstijd per filter duurt 24 uur. Bij hoge concentraties van stofdeeltjes in de lucht wordt de beladingcapaciteit van de filter binnen de 24h bereikt. Als het drukverschil te klein wordt stopt de bemonstering. Voor een aantal data werd voor sommige locaties geen filter afgeleverd door VMM. De reden hiervoor zijn divers o.a. verkeerd type filter, technische fout van Digitel toestel.

Tabel 4.1: Overzicht van de bemonsteringscampagne.

	Bemonsteringstijd (minuten)		
	Bij debiet van 900 l/min		
Datum	Aarschot	Borgerhout	Zelzate
04/09/2006	1438,88	1439,63	1439,88
16/09/2006	944,68	838,2	1272,18
28/09/2006	1439,9	1114,61	1439,9
10/10/2006	1439,88	956,05	1337,16
22/10/2006	1439,88	1439,63	1439,88
03/11/2006	1439,88	932,38	1439,9
15/11/2006	1439,88	1439,65	1439,9
27/11/2006	1439,88	1439,65	1439,88
09/12/2006	1215,75	1063,21	1230,66
21/12/2006	425,45	549,85	731,51
02/01/2007	1439,88	1439,63	1439,88
14/01/2007	1439,88	1362,93	1439,88
26/01/2007	1117,85	770,91	1212,71
07/02/2007	1128,4	566,91	501,53
19/02/2007	602	623,58	1211,8
03/03/2007	1439,88	1413,33	1439,9
15/03/2007	728,13	442,58	488,46
27/03/2007	NB	NB	1208,95
08/04/2007	NB	NB	328,13
20/04/2007	1439,98	1439,73	1439,88
02/05/2007	1439,88	NB	1439,88
14/05/2007	1439,88	1439,63	1439,88
26/05/2007	1439,90	1439,71	1439,90
07/06/2007	1439,88	1439,48	1439,88
19/06/2007	1439,88	1439,65	1439,88
01/07/2007	1439,88	1439,88	1439,88
13/07/2007	1439,88	1439,88	1439,88
25/07/2007	1439,88	1439,88	1439,88
06/08/2007	1439,88	NB	1439,88
18/08/2007	NB	1439,88	1439,88
30/08/2007	NB	1439,88	1439,88
11/09/2007	1439,88	1439,88	1439,88

NB: niet beschikbaar

5 Fase II

Fase II omvatte een voorstudie voor optimalisatie van de methodes voor bemonstering, staalbehandeling en toxiciteitstesten.

5.1 Filterkeuze

Een eerste aspect in fase II was de keuze van de filtertypes. De keuze van de filters is belangrijk omdat sommige types filter toxiciteit veroorzaken in de *in vitro* testsystemen. In de literatuur werd nagaan welke de voor- en nadelen zijn van verschillende soorten filters (Tabel 5.1).

Tabel 5.1: Overzicht van verschillende filtertypes

Filter	Voordeel	Nadeel	Referentie
Quartz (QF20 Schleicher&Shuell)	Geschikt voor organische extractie	toxisch voor micronucleus test en Vitotox®	Du Four et al.,2004
Glasvezelfilter		Collectie van partikel fase - >effect op immunotox testen?	
Teflon gecoat glasvezelfilter (Emfab Pallflex Gelman)	Geschikt voor organische extractie en partikel fase Geschikt voor genotoxtesten (Vitotox®, Ames, micronucleus & komeetest) en immunotoxiciteitstesten	Niet geschikt voor gebruik in high-volume sampler (max Ø= 90 mm)	Schoeters et al.,2001 Brits et al.,2004
Teflon (Zefluor PTFE Gelman; Gelman TF1000)	Geschikt voor collectie van de partikelfase en voor immunotoxiciteitstesten	Minder geschikt voor organische extractie (temperatuur gevoelig)	Schoeters et al.,2001 Don Porto Carero, 2002 Dick et al., 2000
PUF (polyurethane foam)	Geschikt voor organische extractie	toxisch voor Vitotox	Du Four et al.,2005

Op basis van de literatuurgegevens is een teflon filter waarschijnlijk het meest geschikt voor toepassing in de verschillende biotesten. Voor deze studie werd gekozen voor teflon filters die bestand zijn tegen de hoge temperatuur in de ASE-extractie.

Er werden T38 filters (Schleicher & Schuell, Duitsland, ref nr 10411130) aangekocht die geschikt zijn voor gebruik in de Digital high-volume samplers van VMM.

Karakteristieken van de T38 membraan filters:

- PTFE met polyester support
- Ø = 150 mm
- poriegrootte: 0.2 µm-5.0 µm

De teflonfilters werden door VMM Gent (E. Wauters) onderworpen aan een aantal preliminaire testen. Zowel debiet als capaciteit werden getest. Het normale debiet dat gebruikt wordt in de high-volume samplers (900 l/min) kon worden behouden voor de T38 filters. De bemonsteringstijd is afhankelijk van de TSP hoeveelheid in de lucht. In de meeste gevallen benaderde deze de vooropgestelde 24 uur. Weersomstandigheden, locatie en seizoenverschillen spelen hierbij een rol.

5.2 Extractieprocedures

De staalvoorbereiding gebeurde in functie van het biologische testsysteem. Sommige testsystemen (*in vitro* testen voor respiratoire en immunotoxiciteit) worden blootgesteld aan de partikels zelf. Andere testsystemen (v.b. reporter assay) kunnen door de aard van de test enkel worden blootgesteld aan extracten van de partikels die de organische componenten bevatten. Afhankelijk van het testsysteem kan de ene fractie ten opzichte van de andere (extracten of partikels) een grotere respons veroorzaken. Zo induceren extracten bijvoorbeeld een grotere respons in genotoxiciteit testen dan partikels terwijl partikels een sterkere immuno-inflammatoire respons opwekken dan extracten (Schoeters *et al.*, 2001; Don Porto Carero, 2002). Om de organische fractie uit de milieumatrix af te scheiden, is organische solvent extractie de aangewezen methode.

5.2.1 Organische extractie: ASE

De ASE (accelerated solvent extraction) is een geautomatiseerd systeem voor de extractie van milieustalen zoals bodems en andere vaste matrix o.a. beladen filters (Brits *et al.*, 2004). Er wordt gebruik gemaakt van een 11 ml extractiecel die van onder naar boven wordt gevuld met een cellulose glasvezel filter, de te extraheren T38 filter (3/4 van de totale filter), natriumsulfaat en celite. Natriumsulfaat wordt gebruikt als droogmiddel en hierboven brengt men 2 gram zeezand en celite als vulling. De extractie gebeurt met hexaan/acetone (50/50 v/v) als extractiesolvent en er wordt geëxtraheerd bij een temperatuur van 100°C en een druk van 140 bar. Het verkregen extract wordt ingedampd onder N₂ bij 37°C en uiteindelijk gesubstitueerd in 1 ml 10% DMSO. Het extract wordt bewaard bij 4°C in de koelkast.

5.2.2 Verzamelen van partikels

Verschillende methodes werden uitgetest (gebaseerd op literatuurgegevens o.a. verschillende wasprocedures (sonicatie, schudden) met verschillende waterige oplosmiddelen) waaruit de methanolextractie werd weerhouden voor toepassing in Fase III (Steerenberg *et al.*, 2004; Steerenberg *et al.*, 2006b). Via deze methode worden de partikels (TSP) met hun chemische belading verzameld.

De filter (1/4 van de totale filter) wordt in een erlenmeyer van 50 ml gebracht samen met 20 ml methanol. Dit mengsel wordt 30 minuten gesoniceerd. De bovenstaande oplossing wordt gedecanteerd in een rondbodemp kolf van 250 ml. De voorgaande stappen worden nog 2x herhaald. De suspensie wordt ingedampd tot ongeveer 1 ml met de rotavapor bij 40°C, 337 mbar en 100 rpm. Deze suspensie wordt eventjes gesoniceerd zodat alle materiaal van de wand komt en overgebracht naar een vooraf gewogen 1.5 ml glazen

conische tube. Deze tube wordt ingedampt onder N₂ en de rondbodem kolf wordt nog 2x nagespoeld en gesoniceerd. Uiteindelijk plaatst men de tube in de speedvac gedurende 4 uren en nadien plaatst men deze in een oven op 30°C gedurende 24 uur. De conische tube met het partikel materiaal wordt terug gewogen zodat men het gewicht van de partikels kan bepalen. De partikels worden bewaard in de ijskast (+4°C). Bij de blootstellingsexperimenten wordt een stockoplossing van 200 mg/ml PBS aangemaakt welke wordt bewaard bij -20°C.

5.3 Testsystemen

5.3.1 Selectie van de biologische testen

In het eindrapport “Evaluatie van de luchtkwaliteit in Vlaanderen door effectgerichte metingen in de omgevingslucht” (Witters *et al.*, 2005) werd een overzicht van testen beschreven met betrekking tot systemische toxiciteit, genotoxiciteit, hematotoxiciteit, immuno-respiratoire toxiciteit, reproductietoxiciteit met inbegrip van endocriene toxiciteit. Daarnaast werd er een evaluatie gemaakt van de bruikbaarheid en relevantie van de beschreven toxicologische methodes in de Vlaamse context. Op basis van een aantal selectiecriteria (kosten en snelheid van uitvoering; responspectrum en gevoeligheid; standaardprocedure en ringstudies; beschikbaarheid; relevantie; toepassing voor lucht en internationale erkenning) werden onderstaande toxiciteitstesten weerhouden voor de uitwerking van dit pilootproject.

- Ames
- Micronucleus test
- Cat-tox
- Yes –assay/ MELN assay
- Cytotoxiciteit
- Immunotoxiciteit: cytokineproductie
- Endotoxinetest

De beladen filters in de campagne werden zowel gebruikt voor organische extractie (3/4 van de filter) als voor partikel (TSP) collectie (1/4 van de filter).

Tabel 5.2 geeft een overzicht van de *in vitro* testen die op het organische extract en/of met de partikel fase kunnen uitgevoerd worden.

De blootstelling van de *in vitro* systemen aan de partikels gebeurde aan de hand van een verdunningsreeks, waarbij de hoogste blootstellingconcentratie 200µg PM/ml medium bedroeg. De partikels werden getest voor cytotoxiciteit met THP-1, A549 en Beas-2B cellen en hun immunotoxiciteit (TNF-α productie in THP-1 cellen, il-8 productie in A549, il-8 en il-6 productie in Beas-2B cellen) werd geëvalueerd. De volgende concentratiereeks werd getest: 200; 100; 50; 25; 12,5 µg PM/ml. Verder werden de stalen met de hoogste PM concentratie (200µg/ml) ook getest voor de aanwezigheid van endotoxines.

Er werd overeengekomen om de blootstelling van de *in vitro* systemen aan de organische extracten uit te voeren bij concentraties die overeenkomen met dagequivalenten (hoeveelheid ingeademde lucht/24 uur). Een ventilatiesnelheid van 14 l/min (normale ademhaling) gedurende 24 uur geeft een equivalent 20 m³/dag. De hoogste blootstellingconcentratie komt overeen met een dagequivalent van 20 m³ lucht equivalent per ml (voor Cat-tox en MELN test) of per plaat (voor Ames test). Verder werden nog 2 verdunningen getest die overeenkomen met een dagequivalent van 10 m³ en 5 m³ lucht equivalent.

Het organische extract van één filter is niet altijd voldoende om alle testen uit te voeren met een hoogste concentratie van 20m³/ml. Dit probleem kan zich voordoen wanneer er veel partikel materiaal in de omgevingslucht voorkomt. Eens de beladingcapaciteit van de filter bereikt is, wordt het drukverschil te klein en stopt de collectie. Doordat de collectietijd minder is dan de vooropgestelde 24 uur, is het aantal gecollecteerde m³ lucht per filter lager. Voor de MELN test was de blootstellingconcentratie steeds lager (max. ~10 m³/dag) omdat de extracten die bereid werden in 10% DMSO minimaal 1/100 moesten verdund worden bij deze cellen om een effect van het solvent DMSO uit te sluiten.

Tabel 5.2: Overzicht van de toepassing van partikels en organisch extract in de bioassays

<i>In vitro</i> test	Organisch extract	Partikels
Cat-tox	x	
Ames	x	x
Micronucleus	x	x
Cytotoxiciteit (A549, THP-1, Beas-2B cellijn)	x	x
Immunotoxiciteit door cytokineproductie (TNF- α , il-6, il-8)	x	x
Yes-screen/MELN-prescreen	x	

De voor- en nadelen (relevantie, historische gegevens voor testen van luchtstalen, vereiste hoeveelheid testmateriaal) van de testen werden geëvalueerd en op basis daarvan werd een prioriteitenlijst voor de *in vitro* testen opgemaakt. Indien in de bemonsteringscampagne van Fase III de collectietijd ontoereikend was om alle testen uit te voeren, werd de voorgestelde volgorde gerespecteerd (Tabel 5.3). In praktijk kon alleen de top drie van testen (Ames test, Cat-tox test en MELN test) uitgevoerd worden met het organische filterextract.

Tabel 5.3: Prioriteitenlijst voor testen met organische extracten van beladen filters

1	Ames test
2	Cat-tox
3	MELN prescreen (cytotoxiciteit en agonist/antagonist activiteit)
4	Cytotoxiciteit met THP-1 cellen en immunotoxiciteit (TNF- α in THP-1 cellen) + endotoxinebepaling
5	Micronucleus test (op perifeer bloed)

De bruikbaarheid van de geselecteerde staalbehandelingsmethodes (collectie van partikels op teflon filters, bereiden van het organische extract), de potentiële achtergrondtoxiciteit van de filters in de bioassays en de reproduceerbaarheid van de bioassays werden getest. Hiertoe werden bemonsterde filters samen met blanco filters geëvalueerd in de verschillende biologische testen voor de respectievelijke eindpunten.

Belangrijkste resultaten van fase II:

1) Achtergrondtoxiciteit van de T38 filters en de extractieprocedures werd nagegaan in de verschillende *in vitro* testen.

- De extracten van procedure blanco (ASE extractie in afwezigheid van een filter) noch deze van de blanco filters gaven cytotoxiciteit in de verschillende cellijnen.
- De Ames test werd uitgevoerd met de bacteriestam TA98 in aan- en afwezigheid van de metaboliserende S9 fractie. Er kon geen toxiciteit (sterfte van de bacteriën) noch genotoxiciteit (volgens 2 criteria: geen verdubbeling t.o.v. het aantal spontane revertanten en geen significant verschil t.o.v. DMSO blanco (t-test, $p > 0.05$) aangetoond worden met de organische extracten van de blanco filters en de procedure blanco.
- Noch de blanco filterextracten noch de procedure blanco vertoonden cytotoxiciteit in de Cat-tox test maar zowel de procedure blanco als de blanco filters vertoonden significante inducties op niveau van genexpressie. Een groot deel van het signaal dat werd waargenomen op niveau van genexpressie bij zowel de procedure blanco als de blanco filters was te wijten aan het gebruikte zeezand. Voor de verdere interpretatie van de data werd een signaal significant beschouwd indien er twee opeenvolgende FIs (fold inducties) statistisch significant verschillend zijn van de controle. Op deze manier kan wel een duidelijk onderscheid gemaakt worden tussen beladen filters en blanco filters, dit zowel voor het aantal geïnduceerde genen als de mate van inductie.
- Cytotoxiciteit van het methanol extract werd uitgevoerd met de A549 cellijn en de THP-1 cellijn. De procedure blanco noch de blanco filters gaven cytotoxiciteit.
- Extracten van blanco filters geven ook een positief signaal in de MELN-test wat wijst op de aanwezigheid van contaminerende stoffen met oestrogene potentie op het filter materiaal of in de extractiecel, hetgeen voorheen bij de YES-test niet werd opgepikt. Voor elk van de te testen extracten van luchtfilters werd overeenkomstig een extract van een blanco luchtfilter mee ingezet in de MELN testen. Het gemeten achtergrondeffect van de blanco filter werd gebruikt voor correctie van het gemeten oestrogene signaal van de stalen in datzelfde experiment door een ratio te berekenen of een relatieve inductiescore (RIS) voor oestrogene activiteit.

2) De beladen filters uit de testcampagne werden getest in de verschillende *in vitro* testsystemen. Effecten van de organische extracten of van het particulier materiaal konden gedetecteerd worden in de verschillende bioassays.

5.3.2 Beschrijving van de biologische testen

5.3.2.1 *Salmonella mutageniciteit test*

De Ames test (*Salmonella typhimurium* his⁻ reverse mutatie test) is wereldwijd de meest gebruikte en gevalideerde genotoxiciteitstest. De test detecteert terugmutaties in het histidine-operon (His⁻ → His⁺). Normale *Salmonella typhimurium* bacteriën zijn in staat om histidine zelf aan te maken, maar de genetisch gemodificeerde stammen die in de Ames test gebruikt worden, kunnen dat niet. Zij zullen dus in een histidine-arm voedingsmedium niet overleven. Wanneer ze blootgesteld worden aan mutagenen zullen sommige bacteriën een terugmutatie ondergaan in het histidine-operon zodat zij wél weer op een histidine-arme voedingsbodem kunnen groeien. Het volstaat dus het aantal zichtbare kolonies te tellen en te vergelijken met de frequentie van spontane terugmutaties. De klassieke testopzet bestaat erin dat het staal/toxicant (in oplossing) in vaste agar wordt uitgeplaat. Na incubatie bij 37° C gedurende 48u worden het aantal kolonies uitgeteld op de plaat gescoord. Resultaten worden uitgedrukt in een aantal revertanten/plaat of revertanten/hoeveelheid toxicant (of staal) toegevoegd. Een staal/toxicant wordt als positief beoordeeld als er een logische dosis-respons curve is en het aantal mutanten minimaal tweemaal het achtergrond aantal is (spontane mutanten). Sommige stoffen krijgen pas mutagene eigenschappen na metabolisatie in de lever van organismen. Om deze metabolisatiestap na te bootsen in de Amestest wordt “S9” toegevoegd, een homogenaat van rattelever dat metaboliserende leverenzymen bevat. Om de test echt efficiënt te maken, bevatten Ames test bacteriën nog andere bijzondere kenmerken die door mutatie werden verworven. Zo zal de celwand meer permeabel zijn dan normaal (waardoor grote moleculen in de bacterie kunnen dringen en daar het DNA kunnen bereiken) en is het DNA-herstel deficiënt. Aangebrachte DNA-schade zal zich dan ook veel gemakkelijker in mutaties en zichtbare kolonies van terugmutanten vertalen. Sommige Ames teststammen zijn bovendien resistent t.o.v. bepaalde groepen van stoffen zodat een eventueel genotoxisch effect detecteerbaar wordt. Zonder deze resistentie zouden de bacteriën sterven en kan men geen uitsluitsel geven over het mutagene karakter van die teststof.

5.3.2.2 *Cat-tox*

De Cat-tox assay bestaat uit 13 genetisch gemodificeerde humane HepG2-levercellijnen met elk een stressgevoelige promotor gebonden zijn aan het *cat* gen dat codeert voor chloramphenicol acetyl transferase (Tabel 5.4) (Todd *et al.*, 1995; Vincent *et al.*, 1997). Het enzyme katalyseert de (di-)acetylatie van chloramphenicol, waardoor het antibioticum geïnactiveerd wordt. De niet-gemodificeerde HepG2-cel lijn wordt steeds samen met de 13 andere cellijnen uitgeplaat zodat simultaan een viabiliteitsassay kan worden uitgevoerd. De 13 verschillende promotors zijn gevoelig voor een hele waaier van eindpunten zoals DNA- en proteïneschade, oxidatieve stress, blootstelling aan zware metalen en inductie van biotransformatie-enzymen. Het feit dat in één assay simultaan 13 verschillende eindpunten kunnen gemeten worden die behoren tot verschillende toxicologische eindpunten maakt dat er een unieke “fingerprint” wordt gegenereerd voor elke chemische stof die wordt getest. Er bestaat een databank met tientallen genexpressieprofielen van zowel zuivere stoffen als mengsels en

dit voor een brede waaier van stoffen zoals pesticiden, metalen, mycotoxinen, polyaromatische koolwaterstoffen (PAKs), polychloorbifenylen (PCB's), perfluorverbindingen,

De resultaten van de 13 verschillende cellijnen worden relatief ten opzichte van een controlestaal (of blanco) weergegeven. Op deze manier wordt er voor elke stam een dosisrespons profiel gegenereerd. De Cat-tox assay wordt steeds uitgevoerd volgens eenzelfde protocol met drie herhalingen voor elke blootstelling en 4 blootstellingconcentraties + 1 blanco (de respectievelijke cellijn blootgesteld aan het gebruikte solvent). De duur van blootstellen bedraagt 48 uur waarna de cellen worden gelyseerd en de hoeveelheid Cat enzyme wordt gekwantificeerd. De resultaten worden uitgedrukt ten opzichte van de blanco. Voor elke cellijn beschikken we over een gekende positieve controle die voor kwaliteitscontroles steeds wordt meegenomen.

Tabel 5.4: Overzicht Cat-tox promotors (HepG2, promotor:cat)

Afkorting	Type fusie construct	Beschrijving	Functie	Gevoeligheid
CYP1A1	Promotor	Cytochroom p450 IAI	Fase I biotransformatie enzym	PAKs, dioxinen
GSTY _a	Promotor	Glutathione S transferase	Fase II biotransformatie enzym	PAKs, fenolische antioxidantia
XRE	Respons element	Xenobiotisch respons element	Bindingssite voor Ah-receptor	PAKs
HMTIIA	Promotor	Metallothioneine IIA	Binden van zware metalen	Zware metalen, glucocorticoïden
FOS	Promotor	c-fos proto-oncogen		Verhoogd c-AMP niveau
NFκBRE	Respons element	Nucleair factor κ binding site	Bindingssite voor NFκBRE transcriptiefactor	Oxidatieve stress, inflammatie
HSP70	Promotor	Heat shock protein		Proteïneverstoring, temperatuur
CRE	Respons element	cAMP respons element	Bindingssite voor CREB proteïne	Tumor inductie, oxidatieve stress, DNA schade
P53RE	Respons element	p53 tumor suppressor bindingssite	Bindingssite voor p53 transcriptiefactor	DNA schade
RARE	Respons element	Retinoïnezuur responsief element		Retinoïden
GADD153	Promotor	153-kDa groeistop en DNA schade proteïne	Celcyclus regulatie	DNA schade, genotoxische agentia
GADD45	Promotor	45-kDa groeistop en DNA schade proteïne	Celcyclus regulatie	DNA schade en groei stop
GRP78	Promotor	78-kDa Glucose regulated protein	ER proteïne chaperone	Proteïnmisvouwing, DNA schade

Bij de interpretatie van genexpressie analyse is het belangrijk om te weten of de geteste concentraties cytotoxisch zijn voor de HepG2 cellijnen. Als standaard assay om cytotoxiciteit na te gaan wordt in het laboratorium van de Universiteit Antwerpen de resazurin assay gebruikt (O'Brien *et al.*, 2000; Hamid *et al.*, 2004). Deze snelle en betrouwbare methode is gebaseerd op de mitochondriale omzetting van resazurin tot resorufin, dat fluorescent kan worden gemeten. In de weergave van de resultaten worden de data van de cytotoxiciteitanalyse steeds simultaan behandeld met de genexpressie analyse.

5.3.2.3 MELN test

Deze test met humane getransformeerde cellen laat toe om stoffen te detecteren die interfereren met de receptor gemedieerde normale functies van het natuurlijke vrouwelijke hormoon, 17 β-oestradiol (E2). Op die manier kan dergelijke test een aanwijzing geven voor potentiële schade en reproductiegerelateerde gezondheidseffecten.

Deze MELN-test die momenteel gevalideerd wordt voor zuivere stoffen (EU 6th FP project, ReProTect) is minder robuust² dan de YES screen die oorspronkelijk was geselecteerd, maar scoort beter op vlak van gevoeligheid (50x lagere detectielimiet) en is meer humaan relevant. Immers indien een aantal extracten in de YES-screen negatief zouden geven (zie resultaten fase II), dan biedt de MELN-test het voordeel om vals negatieve resultaten zoveel mogelijk uit te sluiten.

De extracten werden getest in de MELN-prescreen. Deze prescreen laat toe verschillende werkingsmechanismen ter hoogte van de oestrogeenreceptor te karakteriseren, nl. via een agonistische (oestrogene) of antagonistische (anti-oestrogene) interactie, en dit in combinatie met testen van cytotoxiciteit.

Principe van de MELN-prescreen: deze test maakt gebruik van de MELN-cel lijn, dit zijn MCF-7 cellen (humane borstkanker cellen) die stabiel getransfecteerd werden met het ERE- β Glob-Luc-SVNeo gen. Deze lijn werd ontwikkeld door Dr Balaguer, INSERM (Montpellier, Frankrijk). De getransfecteerde cellen bevatten een Estrogen-Responsive-Element gekoppeld aan een luciferase reportergen.

- 1) **Testen van oestrogene activiteit.** Een verdunningsreeks van de extracten werd getest in medium met solvent (DMSO). Wanneer er een dosisafhankelijke stijging van het luminescent signaal is t.o.v. de solvent controle zitten er componenten met een oestrogene potentie in het extract. Immers, binding van agonisten aan de oestrogeen receptor leidt tot gentranscriptie o.a. van het luciferase reportergen, waardoor het luciferase enzym geproduceerd wordt. Wanneer er Luciferase Assay Reagens toegevoegd wordt zal het geproduceerde enzym dit omzetten waardoor er licht vrij komt. Dit licht kan gemeten worden m.b.v. een luminometer en is een maat voor de hoeveelheid stoffen met een oestrogene potentie die aanwezig zijn in het geteste milieumonster. De positieve controle hierbij is dan 17 β -oestradiol. Het signaal welk gemeten wordt, nl. relatieve light units (RLU) wordt omgerekend ten opzichte van het signaal bij de solventcontrole dat arbitrair en voor elk experiment gelijk gesteld wordt aan 100% (DMSO). Dit laatste laat relatieve vergelijking van de resultaten toe.
- 2) **Testen van anti-oestrogene activiteit.** Een zelfde verdunningsreeks van de extracten werd ook getest in medium waaraan oestradiol (E2) werd toegevoegd (concentratie = EC50 van E2). Wanneer het luminescent signaal stijgt of gelijk blijft, zitten er stoffen met een oestrogene potentie in het extract (zie ook 1). Wanneer het luminescent signaal echter daalt, dan zitten er componenten met een anti-oestrogene potentie in het extract. Er treedt immers competitie op voor binding aan de oestrogeenreceptor tussen de antagonisten en E2. Binding van E2 leidt tot gentranscriptie, maar binding van antagonisten leidt tot blokkering van de oestrogeen receptor waardoor het resultaat een daling is in functie van stijgende hoeveelheid antagonist die mogelijk aanwezig is in het extract. De positieve controle in de test voor antagonisme is 4OH-tamoxifen, die de gemeten inductie van E2 bij de EC50 concentratie zal onderdrukken. Het signaal, nl. relatieve light units (RLU)

² Onder robuustheid van een methode wordt de ongevoeligheid van het analyseresultaat verstaan voor kleine variaties in uitvoering, omstandigheden en hoedanigheid van materialen, zoals deze in de praktijk kunnen voorkomen.

wordt omgerekend ten opzichte van de solventcontrole, die in dit geval DMSO met de EC50 concentratie van E2 is, en die arbitrair aan 50% wordt gelijk gesteld.

Bovendien werden de extracten ook steeds getest voor **algemene cytotoxiciteit** met behulp van een LDH (lactaat dehydrogenase) lekkagetest. Hiervoor werd er gebruik gemaakt van de CytoTox-ONE™ kit. Deze kit meet met een enzymatische reactie hoeveel LDH er uit de cellen gelekt is. Deze hoeveelheid verhoogt immers wanneer de celmembranen beschadigd zijn en is dus een maat voor leefbaarheid van de cellen.

5.3.2.4 Cytotoxiciteit

Cellen worden gekweekt in de aanwezigheid van de teststof. De cytotoxiciteit van de teststof, de potentie om cellen te doden, wordt bepaald m.b.v. de neutraal rood test. Aan de basis van deze cytotoxiciteitstest ligt het feit dat een chemische stof interfereert met de celdgroei op een dosisafhankelijke manier. Neutraal rood (NR) wordt gebruikt om het aantal levende cellen te bepalen. NR is een zwak kationische kleurstof, die in de cel diffundeert en in intacte lysosomen bindt aan negatief geladen bindingsplaatsen. Beschadiging van de lysosomen door de teststof resulteert in een verminderde NR-opname en -binding.

5.3.2.5 Immunotoxiciteit

IL-6 en IL-8 zijn pro-inflammatoire cytokines die vrijgesteld kunnen worden door respiratoire cellen (o.a. Beas-2B) na blootstelling aan partikels. IL-6 speelt een rol bij de allergische respons omdat het T-lymfocyten activeert en B-lymfocyten stimuleert tot productie van IgE. IL-8 is een typisch inflammatoir chemokine dat neutrofielen, eosinofielen en basofielen aantrekt naar de plaats van inflammatie. Beide mediators worden geproduceerd in het celkweekmedium door de Beas-2B cellen. A549 cellen produceren il-8. De cytokines kunnen gemeten worden in het supernatans via Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Tumor necrosis factor-alfa (TNF- α) is een pro-inflammatoir cytokine dat luchtwegeepitheelcellen aanzet tot de productie van cytokines en dat de expressie van adhesiemoleculen verhoogt. TNF- α productie kan na blootstelling aan particulier materiaal/organisch extract gemeten worden in het supernatans via Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

5.3.2.6 Endotoxinetest

Er werd reeds eerder aangetoond dat endotoxines (o.a. bacteriële infectieuze agentia) kunnen voorkomen in stofdeeltjes in de lucht en op die manier eveneens een respons kunnen geven in toxiciteitstesten, hetgeen met name belangrijk is bij interpreteren van cytokine-signalen voor immunotoxiciteit. Stalen die positief scoren in de testen voor immunotoxiciteit, zullen worden geëvalueerd voor aanwezigheid van endotoxines. We zullen hiervoor gebruik maken van een kwantitatieve testkit of LAL³-assay (QCL-1000 kit). Deze is gebaseerd op het lysis van amoebocyten van de degenkrab (LAL). Endotoxines zorgen voor de omzetting van een pro-enzyme in het LAL (Limulus

³ LAL= limulus amoebocyte lysis

Amoebocyte Lysate) reagens, waarbij het gevormde enzyme de katalyse van het toegevoegde substraat in gang zet, met aanmaak van een eindproduct p-nitro-aniline (pNA), welk fotometrisch gemeten kan worden. De activiteit wordt bepaald door vergelijking met een endotoxine standaard (*E. coli* endotoxine).

Principe

1. Proenzyme (LAL) _____ endotoxine \longrightarrow Enzyme
2. Substraat + H₂O _____ enzyme \rightarrow peptide + pNA

6 Fase III

De beladen filters in de campagne werden zowel gebruikt voor organische extractie (3/4 van de filter) als voor partikel (TSP) collectie (1/4 van de filter). Hierna zullen per test de belangrijkste bevindingen worden besproken.

6.1 Testen op het organische extract

6.1.1 *Salmonella* mutageniciteitstest (Ames)

De Ames test werd uitgevoerd met de stam TA98 in aan- en afwezigheid van de metaboliserende fractie S9. Elk ASE extract werd getest in 3 concentraties (20, 10, 5 m³ lucht equivalent/plaat) met 3 replica platen per concentratie. DMSO (dimethyl sulphoxide) werd als solvent controle gebruikt. Als positieve controle werd enerzijds 4-nitro-quinoline-N-oxide (NQO, 0.2µg/plaat) gebruikt in de afwezigheid van metabole activiteit (-S9) en anderzijds 2-aminoanthraceen (2-AA, 1µg/plaat) en benzo(a)pyrene (B(a)P, 5µg/plaat) in de aanwezigheid van de metaboliserende fractie S9. Bij elk experiment werd ook het extract van een blanco filter en een procedureblanco (extractie in afwezigheid van een filter) getest.

Bij het testen van zuivere chemische stoffen wordt een teststof beschouwd als positief (mutageen) als het aantal kolonies bij de hoogst geteste concentratie verdubbeld is t.o.v. wat spontaan wordt aangetroffen (Stimulatie Index of SI > 2), en wanneer de concentratierespons relatie positief is (Mortelmans and Zeiger, 2000). Bij het testen van luchtstalen op mutagene activiteit worden er verschillende criteria gebruikt. Een aantal publicaties (Zhao and Li, 2002; Zhao *et al.*, 2002; Ducatti and Vargas, 2003; Du Four *et al.*, 2004) definiëren een positief staal als er minstens een verdubbeling is van het aantal revertanten bij de hoogst geteste concentratie t.o.v. het aantal spontane revertanten en als er een concentratiegerelateerde respons is. De aanwezigheid van een significante dosisrespons effect als voorwaarde voor mutagene activiteit wordt ook door andere onderzoekers gerapporteerd ((Buschini *et al.*, 2001) (De Martinis *et al.*, 1999; Claxton *et al.*, 2001) (Cerna *et al.*, 1999; Cerna *et al.*, 2000) (Schoeters *et al.*, 2001); (Brits *et al.*, 2004) bepalen een significant mutageen effect via verwerking van de resultaten met one-way ANOVA gecombineerd met de Tukey post hoc test (significantieniveau p<0.05).

In deze studie werd een extract als positief (mutageen) aanzien als aan het volgende criterium voldaan werd: het aantal revertanten/m³ lucht equivalent moet dosisafhankelijk zijn. Dit werd bepaald via een regressie analyse (p<0.05) waarbij de concentratie van 0m³ lucht equivalent gelijk is aan de DMSO blanco.

De ruwe resultaten van de tellingen (aantal revertanten per 5, 10, 20m³ lucht equivalent) met aanduiding van de positieve filterextracten zijn terug te vinden in Annex I.

De positieve controles NQO, 2-AA en B(a)P induceerden een gemiddelde respons (\pm 95%CL) van respectievelijk 205 ± 16 , 1444 ± 135 en 250 ± 18 revertanten/plaat en een gemiddelde SI (t.o.v. solvent blanco) van respectievelijk 9.7 ± 2.5 , 47.2 ± 10.6 en 8.6 ± 2.2 . De ruwe resultaten zijn terug te vinden in Annex I.

Noch de extracten van de blanco filters ($SI(-S9)=1.17 \pm 0.2$ en $SI(+S9)=0.99 \pm 0.1$), noch de procedure blanco stalen ($SI(-S9)=0.98 \pm 0.1$ en $SI(+S9)=1.03 \pm 0.1$) vertoonden achtergrondtoxiciteit (geen mutagene activiteit). In totaal werden 7 blanco filters en 7 procedure blanco stalen getest. Er was geen significant verschil in aantal revertanten tussen de blanco filters en DMSO controle (t-test, $p>0.05$) met één uitzondering. Bij deze blanco filter was het aantal kolonies significant verhoogd t.o.v. de spontane revertanten in de afwezigheid van een metabole fractie maar niet verdubbeld ($SI = 1.59$).

Zonder metabole activiteit (-S9) varieerde de directe mutageniciteit ($n= 82$) tussen 19 en 166 rev/20m³ lucht eq. met een gemiddelde (\pm 95% CL) van 56.4 ± 6.98 rev/20m³. De indirecte mutageniciteit (+S9) gemeten na metabole activatie ($n= 87$) was significant verhoogd t.o.v. de directe en varieerde tussen 24 en 302 rev/20m³ lucht eq. met een gemiddelde van 63.5 ± 9.76 rev/20m³ (gepaarde t-test, $p=0.03$). Een gelijkaardig verschil tussen directe en indirecte mutageniciteit werd ook gezien tussen de solvent blancostalen. Dit verschil in aantal revertanten/plaat voor blanco's van directe en indirecte mutageniteit verklaart waarschijnlijk dat de gemiddelde verhoging van het aantal kolonies t.o.v de DMSO blanco (dus de SI) zonder en met toevoeging van de metaboliserende fractie significant verschillend zijn waarbij $SI(-S9)=(2.48 \pm 0.3)$ groter is dan $SI(+S9)=(2.05 \pm 0.3)$ (gepaarde t-test, $p=0.03$).

Rekening houdend met de vooropgestelde criteria, tonen de resultaten aan dat 77 van de 88 geteste filters (voor de drie locaties samen) schadelijke stoffen bevatten met een mutagene werking.

De resultaten van de Ames test kunnen worden uitgedrukt als:

1.- het aantal revertanten/20m³ lucht equivalent bij de hoogst geteste concentratie (20 m³)
2.- het aantal revertanten/m³ bemonsterde lucht, berekend uit de dosisrespons curven na regressie analyse (Statistica) (Du Four *et al.*, 2004)) of via regressie analyse over het lineair deel van de dosis-respons curve volgens het Bernstein model (Binkova *et al.*, 2003); (Cerna *et al.*, 1999; Cerna *et al.*, 2000); (Ducatti and Vargas, 2003); (Claxton *et al.*, 2001). Door de beperkte hoeveelheid van het extract werden slechts drie concentraties getest. Hierdoor is de dosisrespons curve minder betrouwbaar alsook het berekende aantal revertanten/m³.

3.- het aantal revertanten/ μ g TSP (berekend op basis van de massa's TSP na methanolextractie van $\frac{1}{4}$ van de filter).

4.- stimulatie index (SI) welke de verhoging geeft van het aantal kolonies t.o.v de spontane revertanten in de solvent controle.

Bij de verdere analyses (Fase IV) wordt de voorkeur gegeven aan werkwijze 1.

6.1.2 Cat-tox

De **cat-tox assay** bestaat uit 13 genetisch gemodificeerde humane HepG2 levercellijnen met elk een stress gevoelige promotor. De 13 verschillende promotors zijn gevoelig voor een hele waaier van eindpunten zoals DNA- en proteïneschade, oxidatieve stress, blootstelling aan zware metalen en inductie van biotransformatie-enzymen.

Het feit dat in één assay simultaan 13 verschillende eindpunten kunnen gemeten worden die behoren tot verschillende toxicologische eindpunten maakt dat er een unieke “fingerprint” wordt gegenereerd voor elk staal dat wordt getest.

Zoals reeds vermeld in Fase I en II wordt er voorafgaand aan de Cat-tox assay steeds een cytotoxiciteitsassay uitgevoerd. Geen enkel van de geanalyseerde stalen tijdens de meetcampagne vertoont acute cytotoxiciteit. Hierdoor kon elk staal getest worden met als hoogste concentratie 20 m³ luchtequivalent/ml, wat overeenstemt met een humaan dagequivalent. Voor elke staal werden verschillende concentraties getest (20, 10, 5, en 2.5 m³ luchtequivalent/ml) zodat er dosis-respons curves konden worden opgesteld. Een studie uitgevoerd voor gelijkaardige locaties in Vlaanderen door Brits et al. (2004) onderzocht de genotoxiciteit van PM10 en extracten hiervan met verschillende *in vitro* testen waarbij tegelijkertijd ook de cytotoxiciteit werd geëvalueerd. Zij vonden gelijklopende resultaten: de PM10 extracten vertoonden geen cytotoxiciteit zowel voor de micronucleus test, de *Salmonella* mutageniciteitstest (Ames) als de komeetttest. De cytotoxiciteit die werd vastgesteld na blootstelling aan de extracten in de Vitotox test was te wijten aan restanten van extractie solventen (Brits et al., 2004).

Op vraag van de dienst Milieu & Gezondheid van het departement LNE werden experimenten uitgevoerd om de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van de *in vitro* testen aan te tonen voor het testen van filterextracten. Dit impliceerde een groot aantal bijkomende experimenten (gedetailleerde info kan worden teruggevonden in het reeds opgeleverde rapport van fase I en fase II). Gezien het beschikbare budget werd getracht de overige stalen op de meest optimale manier te testen. Hierbij werden stalen over bepaalde tijdstippen samengevoegd onder de volgende voorwaarden:

- Cytotoxiciteit wordt voor elk staal individueel getest.
- Indien een staal cytotoxisch is, zal dit telkens individueel getest worden
- Indien niet cytotoxisch, worden stalen uit dezelfde monsterperiode (d.w.z. per maand en nooit meer dan 3 stalen) samengevoegd.

Vermits geen enkel van de stalen die werden getest cytotoxisch was, werd er overgegaan tot het samenvoegen van stalen zoals hierboven beschreven. Deze samengevoegde stalen werden vervolgens getest in de Cat-tox assay. De resultaten van de humane genprofielingsassay toonden aan dat er unieke genexpressieprofielen werden gevonden per extract. In Tabel 6.1 worden de significant ($FI > 1$) en niet significant ($FI = 1$) geïnduceerde genen weergegeven.

Het effect van de luchtstalen op de Cat-tox data wordt significant beschouwd bij volgende criteria:

- visuele dosis-respons
- twee opeenvolgende fold inducties zijn statistisch significant verschillend van de controle (ANOVA, Dunett's test)

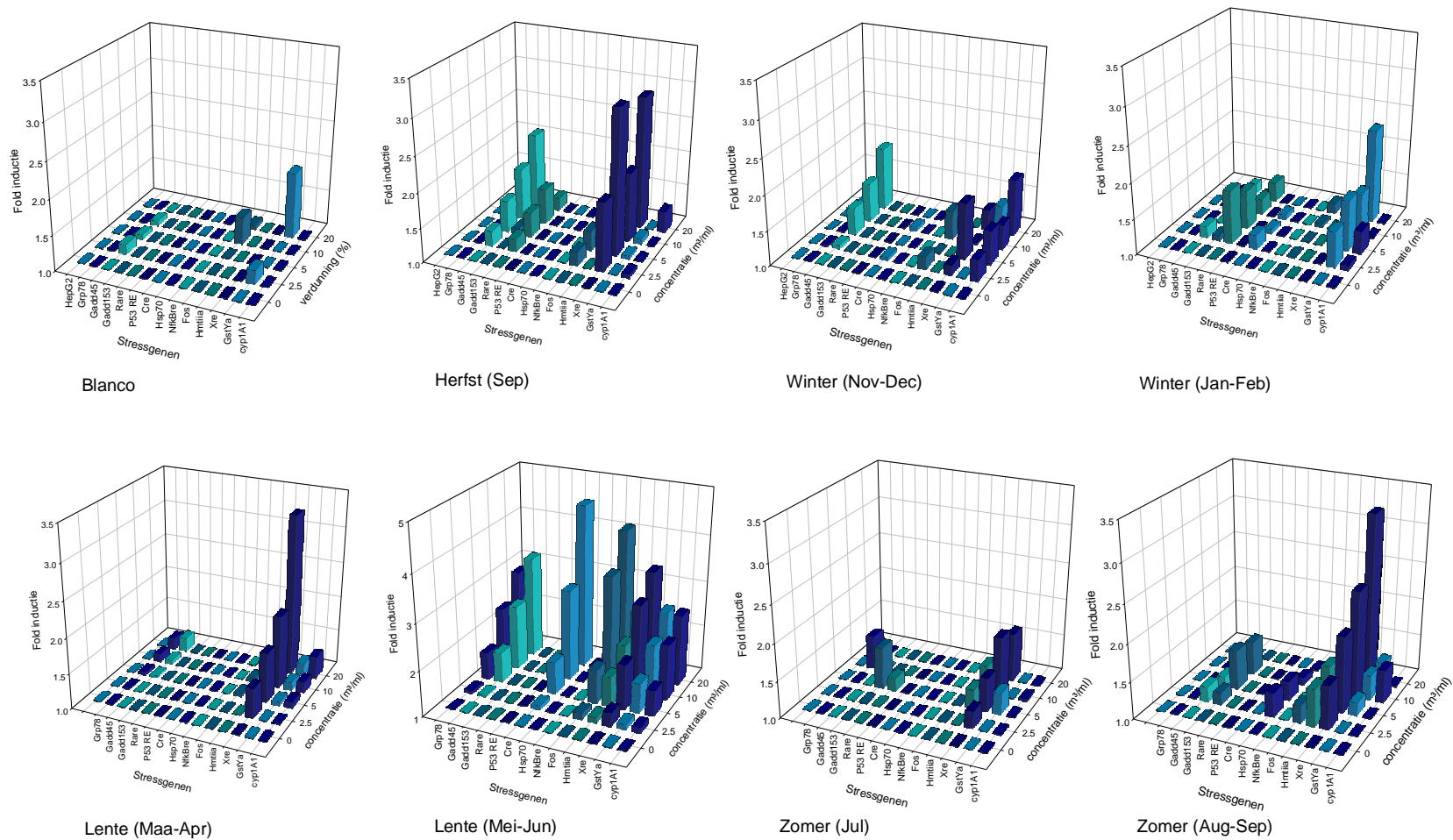
Xre (xenobiotic response element), de bindingssite voor het Ah-receptorsubstraat complex en dus een specifieke merker voor de aanwezigheid van PAKs is over de hele campagnelijn het gen dat zowel een hoge frequentie als een hoge mate van inductie vertoont.

Één van de gepoolde stalen van Zelzate (14-26/05/07 07/06/07) uit de lentecampagne vertoonde een zeer hoge frequentie en mate van inductie. Als voorbeeld worden in Figuur 6.1 de Cat-tox genexpressieprofielen getoond van Zelzate en een blanco filter. In totaal zijn er 7 profielen voor deze locatie opgesteld. De individuele Cat-tox genexpressie profielen van de gehele campagne zijn in Annex II terug te vinden. De genexpressieprofielen tonen duidelijk aan dat er een aantal opmerkelijke verschillen zijn tussen de blanco filter en de stalen van Zelzate. Er zijn geen duidelijke dosis responsen waar te nemen in het blanco staal, terwijl dit wel het geval is voor de stalen van Zelzate. Zowel de mate van inductie als het aantal geïnduceerde genen is sterk verschillend. Om dit beter te visualiseren werd de schaal van de fold inducties op 3.5 gezet, enkel voor één staal van de lentecampagne werd de schaal op 5 gezet.

Dit staal van de lente campagne vertoont hoge inducties met een heel duidelijke dosis respons relatie. De genen Cyp1A1, GstYa, Xre, Hmt2a, Fos, Cre, Gadd153, Gadd45 en Grp78 zijn significant geïnduceerd vanaf een concentratie op de cellen van 5 m³/ml of lager. Dit impliceert dat er reeds bij ¼ van de aangenomen dagelijkse hoeveelheid ingeademde lucht significante effecten kunnen gemeten worden die een vroegtijdige indicatie zijn voor DNA-schade, oxidatieve stress en inductie van detoxificatieprocessen. Verder in dit rapport zal er nog een aantal keer verwezen worden naar dit staal.

Tabel 6.1: Significante (FI > 1) en niet significante (FI = 1) fold inducties per staal en per gen. De resultaten zijn het gemiddelde van drie experimenten Hoogste (oranje) en tweede hoogste (geel) inductie per gen over de hele meetcampagne worden weergegeven in kleur.

Datum monstername	Locatie	Seizoen	Cyp1A1 FI	GstYa FI	Xre FI	Hmt2a FI	Fos FI	Nfkbre FI	Hsp70 FI	Cre FI	P53 FI	Rare FI	Gadd153 FI	Gadd45 FI	Grp78 FI
26JM068	Blanco filter	herfst	1	1	1	1	1.44	1	1	1	1	1	1.44	1.74	1
27JM005	Blanco filter	winter	1	1	1	1	1.37	1	1	1	1	1	1	1.13	1
27JM019	Blanco filter	lente	1.08	1	1	1	1.24	1	1	1	1	1	1	1	1
27JM031	Blanco filter	zomer	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
04-28/09/06	Aarschot	herfst	1.29	1.62	2.9	1	1.45	1	1	1	1	1.45	1	1.53	1
27/11/06 09/12/06	Aarschot	winter	1	1	1.8	1	2.05	1	1	1	1	1	1	1.28	1
02-14/01/07	Aarschot	winter	1.24	1.21		1.68	1	1	1	1.4	1	1.57	1	1	1.21
20/04/07 02-14/05/07	Aarschot	lente	1	1.2	2.9	1.19	1.27	1	1	1	1		1	1.19	1.23
26/05/07 07-19/06/07	Aarschot	lente	1.13	1	2	1	1	1	1	1	1		1	1	1
1-13-25/07/07	Aarschot	zomer	1	1	2.3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.25
6/08/07 11/09/07	Aarschot	zomer	1	1.29	3.5	1	1	1	1	1	1	1.22	1	1	1
4/9/06	Borgerhout	herfst	1.66	1	2.3	1	1	1	1	1	1	1.71	1	1.96	1.16
15-27/11/06	Borgerhout	winter	1.24	1	1.8	1	1.52	1	1	1	1	1	1	1.32	1
02-14/01/07	Borgerhout	winter	1.2	1		1	1.22	1	1	1	1	1.8	1	1.47	1
20/04/07	Borgerhout	lente	1.54	1	2.8	1.27	1	1	1	1	1		1	1	1
14-26/05/07 07-19/06/07	Borgerhout	lente	1.24	1.12	1.8	1.05	1.06	1	1	1	1		1	1.08	1.1
1-13-25/07/07	Borgerhout	zomer	1	1	2.2	1	1	1	1	1	1	1	2.43	1	1
18-30/08/07 - 11/09/07	Borgerhout	zomer	1	1	2.6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
04-16-28/09/06	Zelzate	herfst	1.3	1	2.9	1	1.77	1	1	1	1	1.17	1	2.08	1
27/11/06 09/12/06	Zelzate	winter	1.81	1	1	1	1.4	1	1	1	1	1	1	1.9	1
02-14/01/07	Zelzate	winter	1.3	2.29		1	1	1	1	1	1	1.74	1	1	1
27/03/07 08-20/04/07	Zelzate	lente	1.31	1.17	3.3	1	1.12	1	1	1	1		1	1.19	1.15
14-26/05/07 07/06/07	Zelzate	lente	2.54	2.56	3.4	2.46	4.16	1	1	4.6	1		1	3.21	2.85
1-13-25/07/07	Zelzate	zomer	1	1	1.8	1.37	1	1	1	1	1	1	1	1	1
06-18-30/08/07 - 11/09/07	Zelzate	zomer	1	1.32	3.2	1.58	1.22	1	1	1	1	1	1.52	1	1



Figuur 6.1: Cat-tox genexpressie profielen voor de verschillende seizoenen voor de locatie Zelzate (n = 3).Looptijd campagne september 2006-september 2007.

6.1.3 MELN test

Deze *in vitro* test, gebaseerd op hEr-getransformeerde humane borstkankercellen (gastheercellijn MCF-7), werd toegepast voor de opsporing van oestrogene en anti-oestrogene stoffen. Een breed panel van chemische stoffen is gekend voor zijn potentiële interactie met de endogene receptor voor het vrouwelijke hormoon 17β -oestradiol. Het betreft chemicaliën met een heel diverse chemische structuur uit de groep van pesticiden (o,p, DDT, lindaan, endosulfan,...), weekmakers voor kunststoffen (ftalaten, bisphenol A,...), surfactanten (alkylphenolen en ethoxylaten,...). Screening met diverse cellulaire testen bevestigen de oestrogeenversturende werking van dergelijke stoffen en geven informatie over hun relatieve potentie ten opzichte van de positieve controle 17β -oestradiol (Berckmans *et al.*, 2007) voor MELN; (Sonneveld *et al.*, 2005) voor Er-Calux,...). Met uitzondering van depositie gegevens voor organische pollutanten als PAKs, PCBs en dioxines, zijn er nauwelijks meetgegevens beschikbaar over het voorkomen van andere potentieel hormoonversturende stoffen in het compartiment 'lucht'. Anderzijds zijn er enkele studies ter beschikking waarbij hormoonversturende activiteit gemeten werd in extracten van luchtstalen, die een mengsel zijn van diverse pollutanten waar de samenstelling niet van gegeven werd (Wang *et al.*, 2004); (Taneda, *et al.*, 2002; Taneda *et al.*, 2004).

Bepaling van hormoonversturende activiteit is in het kader van gevaarsidentificatie een belangrijk eindpunt. Het is echter eerder bruikbaar als screening dan wel voor risico-evaluatie. Dit alles vanwege het tot hiertoe ontbreken van oorzakelijke verbanden voor blootstelling van de mens aan stoffen met hormoonversturende eigenschappen en gezondheidsrisico's, zoals reproductiestoornissen (fertiliteitsvermindering, vertraagde ontwikkeling,...) of optreden van kankers van de geslachtsorganen. Onze resultaten worden dus verder besproken en gebruikt in het perspectief van identificatie van potentieel gevaar bij blootstelling.

Enkel ASE-extracten van de luchtfilters van 3 locaties werden gemeten in de MELN-assay, waarbij indien voldoende extract beschikbaar er steeds een verdunningsreeks werd opgezet met 3 concentraties van het ruwe extract. Dit extract met 972 m^3/ml in 10% DMSO werd verder verdund in celcultuur medium. Immers DMSO kan toxisch zijn voor de cellen en bovendien een lage oestrogene activiteit geven bij bepaalde concentraties ($> 1\%$). Het geconcentreerde DMSO extract werd daarom 1/100 verdund in het medium zodat de hoogste blootstellingconcentratie voor de MELN cellen 9.72 m^3/ml bedroeg of $\sim 10 m^3$ dagequivalent. Vanuit deze hoogste concentratie werd 2 maal doorverdund in een $\frac{1}{2}$ verdunning hetgeen nog testconcentraties van 4.86 en 2.43 m^3/ml opleverde. De maximale DMSO concentratie die gebruikt werd is 0.2% als solvent. Deze testcondities werden steeds in de prescreen opstelling gebruikt voor zowel agonistische als antagonistische activiteit, met in parallel meting van de cytotoxiciteit.

Enkele voorbeelden van agonistische activiteit (binding op de hormoonreceptor, met een verhoging van luciferase activiteit t.o.v. de solventcontrole) en antagonistische activiteit (onderdrukking van binding op de hormoonreceptor, met een vermindering van luciferase activiteit t.o.v. de solventcontrole die E2 bevat) worden in respectievelijk deel a en b van Figuur 6.2 en Figuur 6.3 gegeven. Het blijkt uit het 2^{de} gedeelte b van beide figuren waar de antagonistische activiteit gemeten wordt, dat deze niet aanwezig is. Immers bij de positieve controle 4OH-Tamoxifen ziet men duidelijk i.f.v. stijgende concentratie van deze stof dat het signaal t.o.v. het SC

(0.2%DMSO+EC50 E2) verminderd wordt (figuur niet gegeven), terwijl voor beide stalen 79 en 19 de activiteit gelijk of zelfs hoger is aan de SC die op 50% gesteld werd. Het signaal hoger dan 50% wijst op de sterke oestrogene activiteit van het staal (zie 1^{ste} gedeelte a van beide figuren), welk cumuleert bij de reeds aanwezige inductie als gevolg van de EC50 van E2.

In de antagonistische assay werden in geen enkele van de stalen beduidende effecten boven de achtergrond (solvent controle) gemeten. Dit eindpunt wordt verder in deze studie niet behandeld.

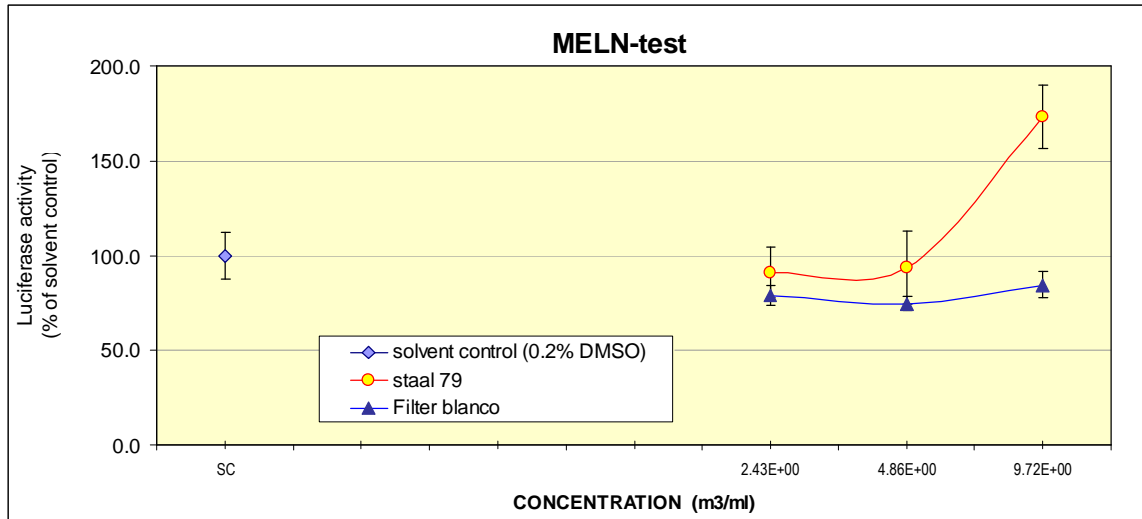
Voor metingen van de agonistische activiteit per staal werd de inductie t.o.v. de solventcontrole (SC) bepaald. Voor de meerderheid van de stalen werd een concentratierespons signaal gemeten, en was er een significante verhoging t.o.v. de solventcontrole. Dit wordt bij de ruwe data in annex III aangeduid, alsook de testcondities waarbij er toxiciteit voor de cellen gemeten werd (meestal enkel bij de hoogste concentratie).

De achtergrondwaarde gemeten voor filterblancos wordt ook gegeven in deze tabellen, waarbij het filterextract bij de hoogste concentratie (mits verdunning van 10% DMSO extract tot 1/100 in de well) als 100% wordt uitgedrukt. Deze hoogste concentratie komt overeen met de hoeveelheid filtermateriaal die toegepast wordt bij de stalen van luchtfilters (nl. 972 m³/ml of na verdunning in de well 9.72 m³/ml).

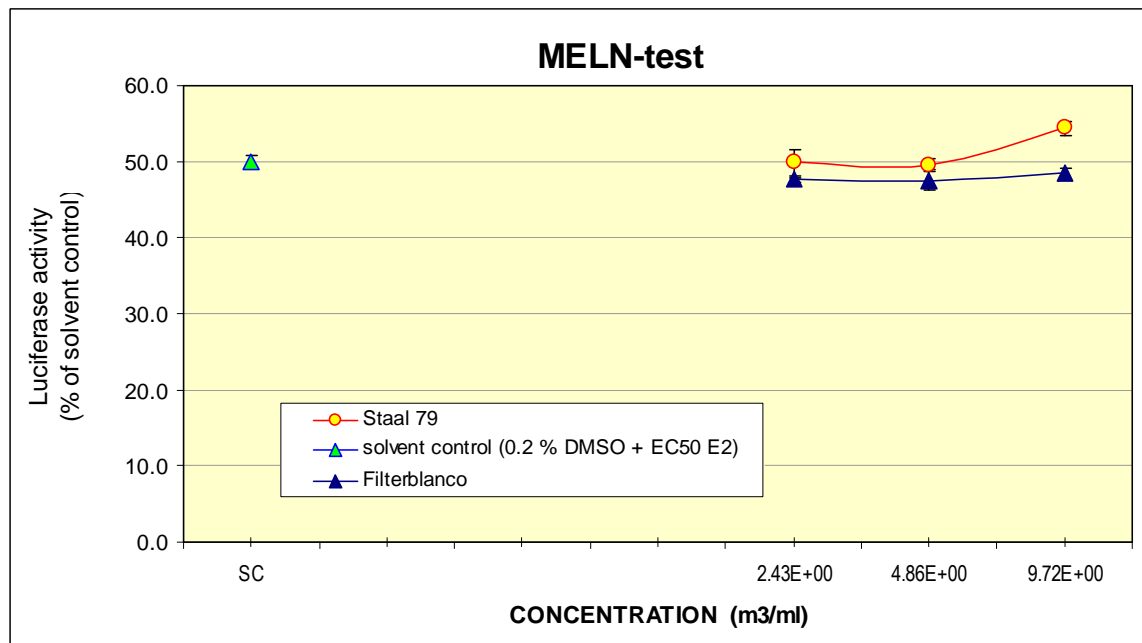
Hoogste inductiewaarden voor de stalen van luchtfilters werden gemeten in Zelzate met tot 658% t.o.v. SC, in Aarschot tot 623% t.o.v. SC en in Borgerhout tot 530% t.o.v. SC. Voor Zelzate werd er bij 7 stalen op totaal 32 toxiciteit gemeten, terwijl er zowel voor Borgerhout als voor Aarschot 5 stalen op een totaal van 27 per locatie met cytotoxiciteit gevonden werden. Globale evaluatie van de gegevens toont dat het voorkomen van toxiciteit niet noodzakelijk samen gaat met de hoogst gemeten signalen voor oestrogene activiteit (zie tabellen in annex III).

Behalve de respons van elk van de stalen wordt in voorgaande figuren (en in tabellen in annex IV) ook het signaal voor de overeenkomstige filterblanco van de extractiereeks gegeven. In tegenstelling tot de YES-screen blijkt de MELN, die tot 50x gevoeliger is (Van den Belt *et al.*, 2004), een achtergrondeffect te detecteren voor oestrogene activiteit. Verder bleek dat het signaal voor filterblanco (met inbegrip van systeemblanco) tussen testen en verschillende extracties in functie van de tijd kon verschillen. We vonden waarden voor filterblanco in de range van lager dan SC tot maximum 344 % t.o.v. SC reikte. Dit achtergrondeffect is niet nieuw en werd op VITO eerder vastgesteld bij keuze van materialen voor staalbehandeling, zowel zuiverheid van solventen als kwaliteit van filters en extractiemiddelen (kolommen, disks). Het zijn vooral bepaalde filtermaterialen die bij hun productie of nabehandeling in contact komen met niet-geïdentificeerde kunststofmaterialen (bijv weekmakers, fenolachtige verbindingen,...) die potentieel hormoonverstoring zijn. In de mate van het mogelijke worden dergelijke materialen uitgesloten bij het uitvoeren van testen, maar vermits initiële testen met de minder gevoelige gisttest of YES werden uitgevoerd, werd een achtergrondeffect in fase II niet gedetecteerd en werden op dat moment deze filters aanvaard voor bemonstering. Pas in fase III wanneer er geopteerd werd om met de MELN assay te werken, en reeds de opzet van bemonstering was vastgelegd, kwam dit achtergrondsignaal door keuze van filtermateriaal aan het licht.

a)

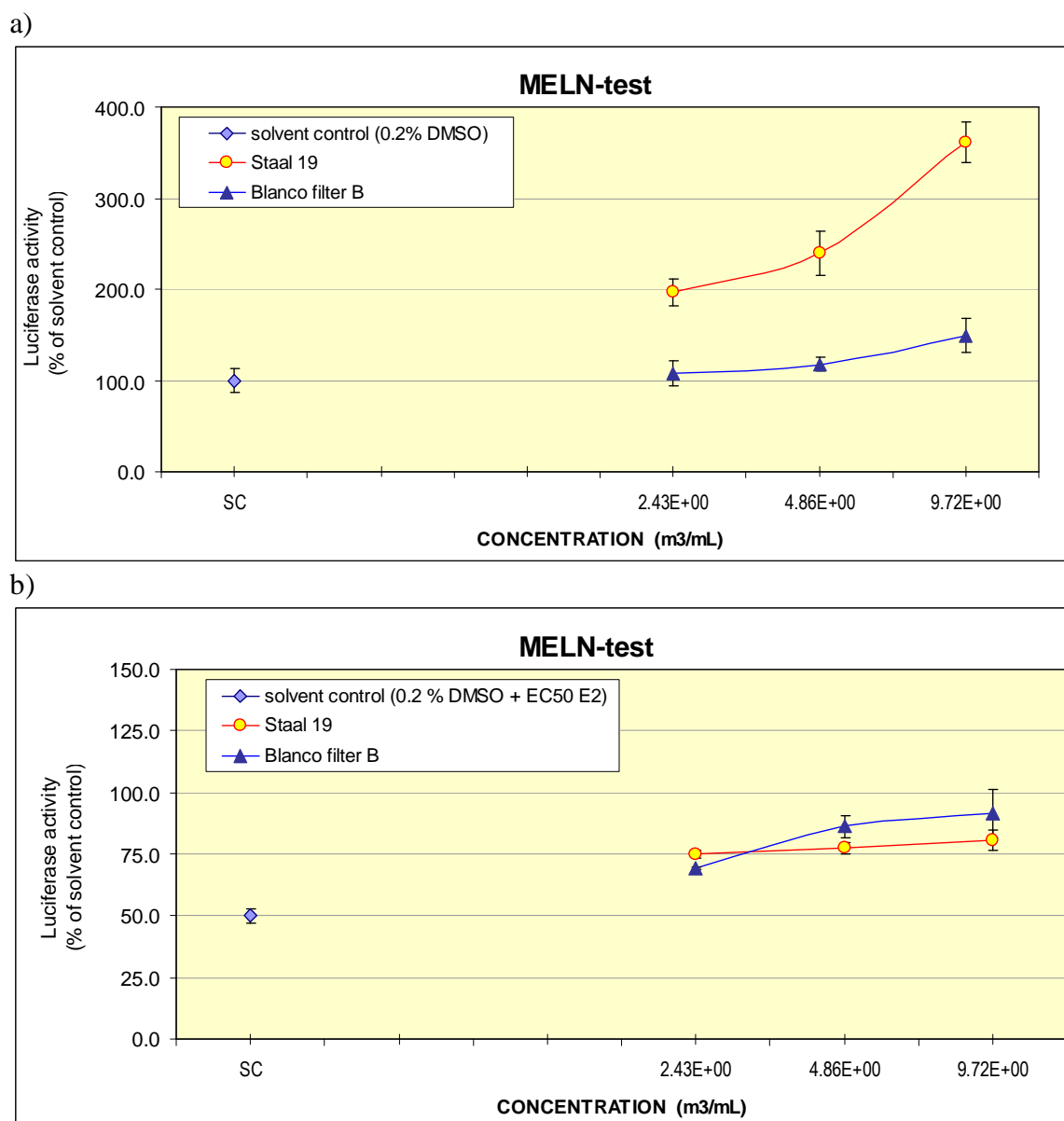


b)



Figuur 6.2: Voorbeeld van concentratierespons curve voor staal 79 (Zelzate, 13/7/2007) en overeenkomstige filterblanco in de MELN assay met meting van oestrogene activiteit⁴ uitgedrukt als luciferase activiteit t.o.v. solvent controle in agonistische mode (a) of als luciferase activiteit t.o.v. solvent controle met E2 in antagonistische mode (b).

⁴ meer toelichting bij principe van de test, zie 5.3.2.3.



Figuur 6.3: Voorbeeld van concentratierespons curve voor staal 19 (Aarschot; 2/1/2007) en overeenkomstige filterblanco in de MELN assay met meting van oestrogene activiteit⁵ uitgedrukt als luciferase activiteit t.o.v. solvent controle in agonistische mode (a) of als luciferase activiteit t.o.v. solvent controle met E2 in antagonistische mode (b).

Behalve de respons van elk van de stalen wordt in voorgaande figuren (en in tabellen in annex IV) ook het signaal voor de overeenkomstige filterblanco van de extractiereeks gegeven. In tegenstelling tot de YES screen blijkt de MELN, die tot 50x gevoeliger is (Van den Belt *et al.*, 2004), een achtergrondeffect te detecteren voor oestrogene activiteit. Verder bleek dat het signaal voor filterblanco (met inbegrip van systeemblanco) tussen testen en verschillende extracties in functie van de tijd kon verschillen. We vonden waarden voor filterblanco in de range van lager dan SC tot maximum 344 % t.o.v. SC reikte. Dit achtergrondeffect is niet nieuw en werd op VITO eerder vastgesteld bij keuze van materialen voor staalbehandeling, zowel zuiverheid van solventen als kwaliteit van filters en extractiemiddelen (kolommen, disks). Het zijn vooral bepaalde filtermaterialen die bij hun productie of

⁵ meer toelichting bij principe van de test, zie 5.3.2.3.

nabehandeling in contact komen met niet-geïdentificeerde kunststofmaterialen (bijv weekmakers, fenolachtige verbindingen,...) die potentieel hormoonverstoring zijn. In de mate van het mogelijke worden dergelijke materialen uitgesloten bij het uitvoeren van testen, maar vermits initiële testen met de minder gevoelige gisttest of YES werden uitgevoerd, werd een achtergrondeffect in fase II niet gedetecteerd en werden op dat moment deze filters aanvaard voor bemonstering. Pas in fase III wanneer er geopteerd werd om met de MELN-assay te werken, en reeds de opzet van bemonstering was vastgelegd, kwam dit achtergrondsignaal door keuze van filtermateriaal aan het licht.

Dit maakte dat we niet met ruwe data van inductie voor oestrogene activiteit per staal konden verder werken en dat een vorm van normalisatie van data vereist was. Dus voor onderlinge vergelijking van stalen per locatie, of per seizoen werden de ruwe data uitgedrukt als relatieve inductie voor oestrogene activiteit, hetgeen de ratio was van inductie staal t.o.v. de filter. Dit wordt verder ook uitgedrukt als RIS of relatieve inductie score. Dus voor overeenkomstige verdunningen werd de ratio berekend van % inductie t.o.v. SC voor het staal tegenover % inductie t.o.v. SC voor de filterblanco van dezelfde reeks extracten⁶. Deze benadering is geënt op de hier beschikbare dataset, en kan niet vergeleken worden met literatuurgegevens vermits noch de MELN-test, noch een achtergrondeffect door keuze van filters voor zover ons bekend niet beschreven werd.

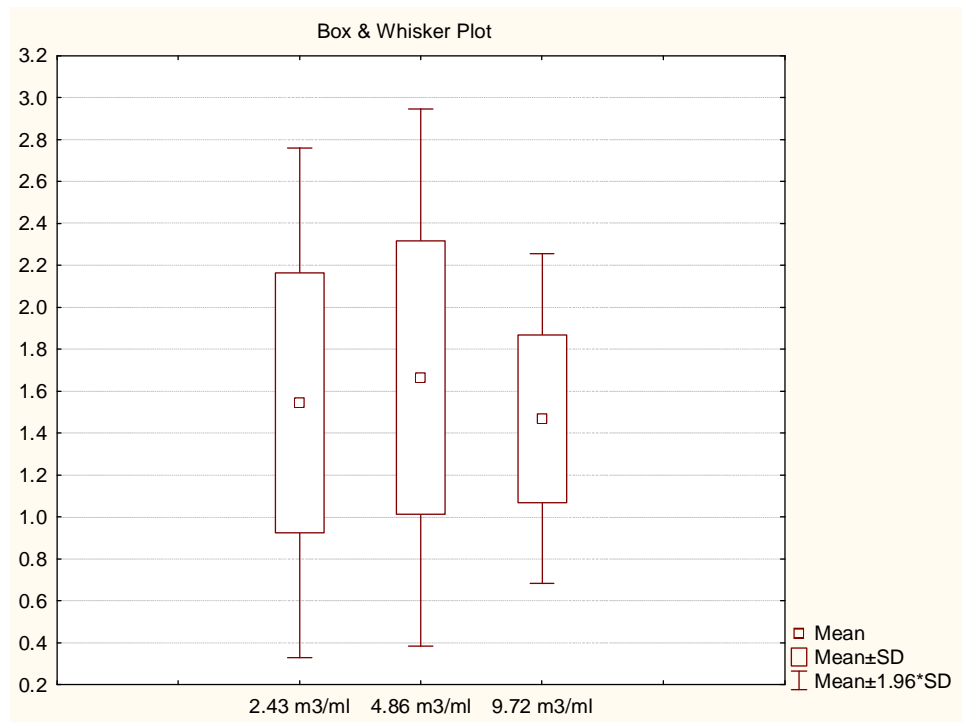
Deze normalisatie van de stalen zal een betere onderlinge vergelijking van de stalen toelaten. Echter bij vergelijking van de concentratiereeks per staal blijkt ook dat het concentratierespons effect verloren gaat na bepaling van de ratio. Dit wordt ondermeer geïllustreerd in Tabel 6.2 en Figuur 6.4 die al de resultaten van locaties en tijdstippen bundelen. De lagere spreiding van metingen bij de hoogste testconcentratie 9.72 m³/ml heeft eerder te maken met het ontbreken van metingen in een reeks van monsternames (10/10/2006-15/11/2006) waarvoor er geen materiaal ter beschikking was.

Details van alle meetresultaten als relatieve inductie worden ook opgelijst in annex III

Tabel 6.2: Gemiddelde meetwaarden en ranges voor relatieve inductie oestrogene activiteit voor alle stalen, per test concentratie

	n	gemiddelde	minimum	maximum	standaarddeviatie
2.43 m ³ /ml	81	1.55	0.85	3.31	0.62
4.68 m ³ /ml	80	1.66	0.85	3.76	0.65
9,72 m ³ /ml	63	1.47	0.90	2.68	0.40

⁶ In sommige gevallen werden filterblanco enkel in de hoogste concentratie getest, en werd de bijdrage bij lagere testconcentraties bepaald op basis van extrapolatie uit het gemiddelde van al de geteste filterblanco stalen in een volledige verdunningsreeks.



Figuur 6.4: gemiddelde en spreiding van metingen voor oestrogene activiteit met de MELN assay, uitgedrukt als relatieve inductie score, voor alle meetpunten en tijdstippen.

6.2 Testen op de gecollecteerde partikels

6.2.1 Cytotoxiciteit

De eerste verdediging van de luchtwegen tegen o.a. partikels is de mucus slijmlaag en de werking van cilia in de bovenste luchtwegen die er voor zorgen dat de deeltjes worden verwijderd. Partikels die niet worden verwijderd komen in contact met de celpopulaties die de luchtwegen aflijnen: epitheelcellen en het immunologische netwerk van antigen presenterende dendritische cellen en macrofagen. De epitheelcellen zijn, naast de macrofagen, de eerste targetcellen voor partikelinteractie en depositie, en zijn daarom de cellen die getroffen worden door de toxische effecten van de partikels (Salvi *et al.*, 1999). De cellulaire effecten van partikels worden onderzocht op geïsoleerde celpopulaties die *in vitro* worden blootgesteld. Effecten op longepitheel cellen worden bestudeerd op cellijnen met karakteristieken van bronchiale epitheelcellen (humane Beas-2B cellijn) of met karakteristieken van alveolaire type II epitheelcellen (humane A549 cellijn). Als model voor de studies op macrofagen wordt veelal gebruik gemaakt van de humane THP-1 monocyt cellijn die *in vitro* kan differentiëren tot macrofagen na stimulatie met PMA (phorbol myristate acetate).

De effecten van het particulier materiaal kunnen te wijten zijn aan specifieke werkingsmechanismen van aanwezige chemische stoffen op de partikels of van de partikels zelf ter hoogte van het doelwitorgaan of ze kunnen te wijten zijn aan algemene cytotoxiciteit. Hierbij bedoelen we dat stoffen interfereren met basale celprocessen zoals beschadiging van het celmembraan, inhibitie van eiwitsynthese, celdeling, werking van celorganellen etc.... Dit laatste wordt geëvalueerd via cytotoxiciteitstesten.

De cytotoxiciteit van het partikel extract van elke filter (verkregen via wassing met methanol) werd bepaald gebruikmakend van drie verschillende humane cellijnen. Drie cellijnen (monocyttaire cellijn THP-1, de long epitheelcellijn A549 en bronchiale epitheel cellijn Beas-2B) werden gedurende 24 uur blootgesteld aan een concentratiereeks van partikels: 200, 100, 50, 25 en 12.5 µg partikels/ml celcultuur medium. Na blootstelling werd m.b.v. de Neutraal Rood Uptake test de leefbaarheid van de cellen bepaald. De resultaten zijn terug te vinden in Annex IV.

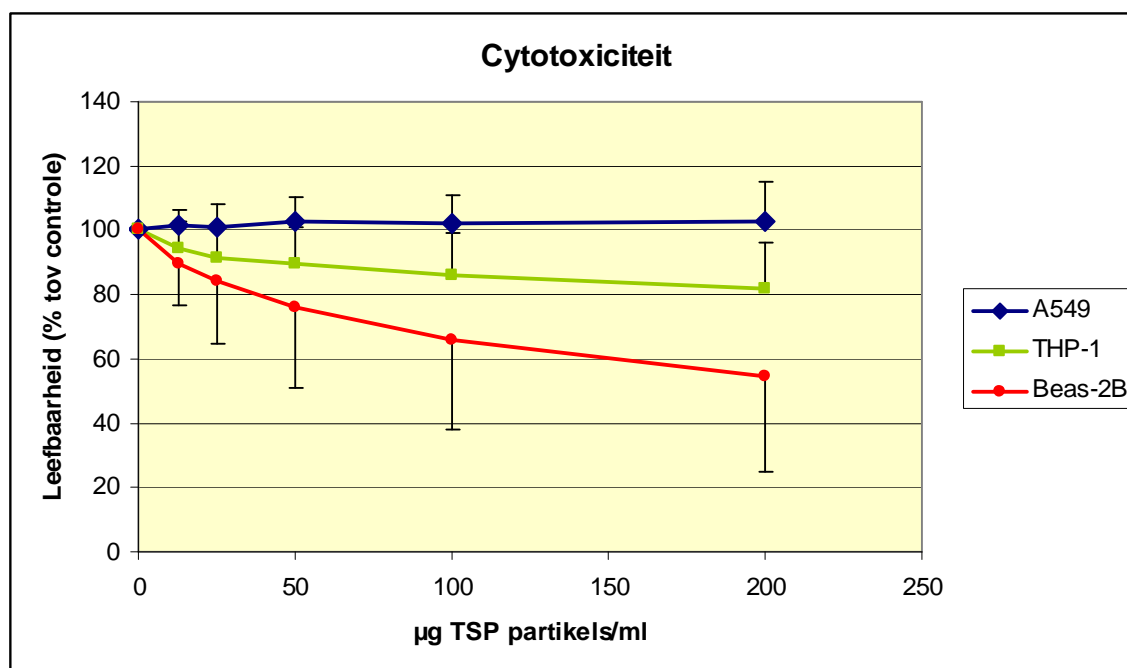
Na blootstelling van THP-1 cellen vertoonden 48 van de 86 stalen een significante dosisrespons (ANOVA, $p < 0.05$). De leefbaarheid van de cellen nam af met stijgende concentratie partikels. Bij de hoogste blootstellingconcentratie (200µg/ml) was de leefbaarheid van de cellen gedaald met 18%.

De alveolaire longepitheel cellijn A549 bleek minder gevoelig te zijn. Slechts 2 van de 87 geteste stalen gaven een cytotoxisch effect. Bij 12 stalen werd er echter een significante stijging van de leefbaarheid van de cellen genoteerd na blootstelling aan de partikels.

De cytotoxische effecten van de partikels waren het meest uitgesproken in de bronchiale Beas-2B cellijn. Van de 87 geteste partikelstalen gaver er 68 een significante dosisafhankelijke respons in deze cellijn. Bij een blootstelling van 200µg/ml bedroeg de leefbaarheid van de cellen (t.o.v. de controle) 54%.

De dosisrespons curven voor de verschillende cellijnen worden weergegeven in Figuur 6.5.

De extracten van de blanco filters gaven geen cytotoxiciteit in geen van de drie cellijnen. Bij een klein aantal extracten werd eerder een stimulatie van de celgroei gezien, vooral in de A549 cellijn.



Figuur 6.5: Cytotoxiciteit (gemiddelde \pm 95% CL) van de partikelfase op de THP-1, A549 en Beas-2B cellijn.

De nagenoeg afwezigheid van cytotoxiciteit en de stimulatie van de celgroei na blootstelling van A549 cellen aan particulier materiaal uit de omgevingslucht na bemonstering op filters werd ook gevonden door andere onderzoekers (Dick *et al.*, 2000); (Schoeters *et al.*, 2001; Don Porto Carero, 2002); (Stone *et al.*, 1998) (Alfaro-Moreno *et al.*, 2002). Hetland *et al.* (2004), daarentegen kon wel cytotoxiciteit aantonen in A549 vanaf een concentratie van 600 $\mu\text{g PM/ml}$. Bij concentraties van 200 en 400 $\mu\text{g PM/ml}$ werd geen cytotoxiciteit waargenomen.

Het cytotoxische effect van particulier materiaal werd reeds eerder aangetoond na blootstelling van Beas-2B cellen (Veranth *et al.*, 2006). De resultaten van dit pilootproject bevestigen de grotere gevoeligheid van Beas-B cellen voor het cytotoxische effect van PM in vergelijking met THP-1 cellen. Er werden tegenstrijdige gegevens gevonden i.v.m. de cytotoxische effecten in THP-1 na blootstelling aan CB, DEP en UPM gevonden (Don Porto Carero *et al.*, 2001) (Li *et al.*, 2002)

6.2.2 Immunotoxiciteit

Zowel macrofagen als alveolaire en bronchiale epitheelcellen worden *in vitro* door partikels gestimuleerd tot de productie van pro-inflammatoire cytokines die de mogelijke aanzet vormen tot ontstekingsreacties in de luchtwegen (zie bijlage 2.2 in (Witters *et al.*, 2005). In THP-1 werd verhoogde productie van TNF- α , il-6 en il-1 β aangetoond (Imrich *et al.*, 2007), in alveolaire epitheelcellen (A549 cellen) vooral il-8 (Pozzi *et al.*, 2003); (Seagrave and Nikula, 2000), (Nam *et al.*, 2004); (Hetland *et al.*, 2004) (Steerenberg *et al.*, 2006a) (Don Porto Carero, 2002); (Mazzarella *et al.*, 2007) (Takizawa, 2004) (Huang *et al.*, 2003) (Watterson *et al.*, 2007)

TNF- α is een pro-inflammatoir cytokine en speelt een belangrijke rol bij inflammatoire processen. TNF α stimuleert de ontstekingsreactie in het lichaam. TNF- α zet luchtweg epitheelcellen aan tot de productie van cytokines. IL-8 is een chemokine met een chemotactische werking dat immuun cellen (o.a. neutrofielen, eosinofielen en basofielen) aantrekt naar de plaats van inflammatie. IL-6 activeert T-lymfocyten en stimuleert B-lymfocyten tot productie van IgE.

Na 24 uur blootstelling aan de partikels werd het medium van de culturen van de cytotoxiciteit experimenten (zie 6.4) verzameld en bewaard bij -80°C tot verdere analyse. In het medium werden cytokines gemeten. Volgende cytokines werden bepaald via Elisa (Invitrogen Biosource CytoSetsTM for human il-6, hu il-8 and hu TNF):

- TNF- α productie door THP-1 cellen
- il-8 productie door A549 cellen
- il-8 en il-6 productie door Beas-2B cellen

TNF- α productie door THP-1 cellen varieerde tussen 250-38000 pg/ml. Il-8 productie door A549 cellen varieerde tussen 50-293 pg/ml. De productie van il-8 en il-6 door Beas-2B cellen was lager en varieerde respectievelijk tussen 2.6-24.7 pg/ml en 0-16 pg/ml.

Voor de verdere analyse werden de meetwaarden voor elke blootstellingconcentratie uitgedrukt relatief t.o.v. de negatieve controle (SI= stimulatie index). Deze werkwijze is terug te vinden in de literatuur (Huang *et al.*, 2003); (Hetland *et al.*, 2004; Veranth *et al.*, 2006). Er bestaat een significante correlatie tussen de cytokineproductie uitgedrukt als pg/ml en SI (regressie analyse, $p < 0.01$). De uitschieters (of outliers) werden niet opgenomen in de verdere analyses. Dit doet zich voor als de absolute cytokineproductie (ng/ml) laag is maar de SI zeer hoog doordat de cytokineproductie bij de negatieve controle zeer laag is. De resultaten zijn terug te vinden in Annex V.

Methanolextracten van blanco filters gaven een gemiddelde stimulatie van 1.5 voor TNF- α , een SI=0.8 voor il-8 productie in A549 en een SI=1.2 voor zowel il-8 en il-6 productie in Beas-2B.

Met behulp van een ANOVA test werd voor elk filterextract nagegaan bij welke blootstellingconcentratie de cytokineproductie significant verhoogd was t.o.v. de negatieve controle.

Voor de volledige campagne was TNF- α voor 84/85 filters significant verhoogd terwijl il-8 productie door A549 cellen in 75/87 stalen significant was toegenomen. Significante toenames voor il-6 en il-8 in Beas-2B cellen werden gezien voor respectievelijk 48/82 en 68/88 monsternames.

De gemiddelde SI waarden voor de verschillende concentraties aan partikels worden weergegeven in Tabel 6.3 voor de verschillende cytokines. Een significante dosisafhankelijke stijging van de SI in functie van de partikelconcentratie werd waargenomen voor TNF- α en il-8 (A549) (Factorial ANOVA, $p < 0.01$).

Tabel 6.3: Gemiddelde SI per partikel concentratie waarden voor de verschillende cytokines.

	$\mu\text{g/ml}$					
	0	12,5	25	50	100	200
TNF-α productie door THP-1 cellen						
gemiddelde	1	8,0	15,0	25,3	38,2	47,0
SD		13,4	25,6	37,4	52,1	58,2
min		0,1	0,3	2,0	2,5	3,8
max		83,6	149,3	231,9	307,8	341,2
mediaan		3,7	7,9	13,6	21,4	23,4
Il-8 productie door A549 cellen						
gemiddelde	1	0,96	1,16	1,10	1,20	1,50
SD		0,42	0,74	0,46	0,44	0,72
min		0,10	0,00	0,08	0,10	0,11
max		3,76	4,15	3,91	2,90	5,43
mediaan		0,96	1,00	1,05	1,18	1,46
Il-8 productie door Beas-2B cellen						
gemiddelde	1	1,96	2,59	2,91	3,43	3,11
SD		5,23	7,40	7,81	9,10	8,13
min		0,64	0,63	0,19	0,50	0,27
max		48,75	66,39	64,71	64,70	57,15
mediaan		1,04	1,17	1,27	1,37	1,18
Il-6 productie door Beas-2B cellen						
gemiddelde	1	3,47	4,59	4,92	5,95	6,05
SD		12,26	17,02	16,26	19,49	16,40
min		0,59	0,49	0,66	0,52	0,52
max		107,79	149,62	140,27	165,16	107,03
mediaan		1,22	1,38	1,61	1,67	1,71

Er werden significant positieve correlaties gevonden tussen de productie van TNF- α , il-6 en il-8 (Beas-2B):

TNF- α en il-6	$r = 0.609$	$p < 0.001$
TNF- α en il-8 (Beas-2B)	$r = 0.449$	$p = 0.003$
Il-6 en il-8 (Beas-2B)	$r = 0.534$	$p < 0.001$
TNF- α en il-8 (A549)	$r = 0.0003$	$p = 0.871$
Il-6 en il-8 (A549)	$r = 0.334$	$p = 0.915$
Il-8 (A549) en il-8 (Beas-2B)	$r = -0.123$	$p = 0.979$

De afwezigheid van correlaties met il-8 in A549 cellen is waarschijnlijk te wijten aan de lage inductie van il-8 door A549 cellen na blootstelling aan de partikels.

De productie van TNF- α was het meest uitgesproken. De inducties (SI) varieerden tussen 3.8 en 341.

De inductie (SI) van il-8 door A549 was laag en varieerde tussen 0.1 en 5.4. De gemiddelde inductie komt echter overeen met literatuur gegevens. (Hetland *et al.*, 2004) vermeld een verhoging met ongeveer een factor 2 na blootstelling aan een concentratie van 200 $\mu\text{gPM/ml}$. Een vergelijkbare inductie (< 1.5) werd gezien in een VMM- meetcampagne (Schoeters *et al.*, 2001).

De cytokineproductie in de Beas-2B cellen is ook laag (SI voor il-6 varieert tussen 0.5 en 10; SI voor il-8 varieert tussen 0.3 en 57.15) i.v.m. TNF- α opregulatie maar hoger

dan il-8 stimulatie in A549. Opmerkelijk bij deze cytokines is dat er enkele extreme waarden werden gevonden op 2/05/07 (Zelzate), 18/08/07 (Borgerhout) en 11/09/07 (Borgerhout). Onderzoek heeft aangetoond dat de il-8 productie door Beas-2B afhankelijk is van de PM fractie (Huang *et al.*, 2003). Bij een concentratie van 100µg PM1.0 werd een 2 tot 3-voud inductie waargenomen. PM2.5 stimuleerde de il-8 productie niet terwijl na blootstelling aan PM10 de inductie kleiner was dan 2.

6.2.3 Endotoxinetest

Er werd reeds eerder aangetoond dat endotoxines (celwandbestanddelen afkomstig van gramnegatieve bacteriën) kunnen voorkomen in stofdeeltjes in de lucht en op die manier eveneens een respons kunnen geven in immuun gerelateerde testen, hetgeen met name belangrijk is bij het interpreteren van cytokinesignalen.

Per filter werd de hoogste concentratie van het partikelextract waaraan de cellen werden blootgesteld (200 µg/ml) getest voor de aanwezigheid van endotoxine (Cambrex, QCL-1000 Chromogenic LAL Test Kit). Per filter werden twee replica metingen uitgevoerd. De meetresultaten (gemiddelde van de 2 metingen) worden weergegeven in Tabel 6.4.

Om het effect van endotoxine op de cytokineproductie na te gaan, werden THP-1 en A549 cellen blootgesteld aan een concentratiereeks (0, 0.1; 0.2; 0.4; 0.8; 1.6; 6.4; 12.7 EU/ml) van endotoxine. Vanaf een concentratie van 1.6 U/ml endotoxine werd een significante toename van de hoeveelheid TNF- α waargenomen (t-test, $p < 0.05$). Bij de hoogste concentratie endotoxine (12.7 U/ml) werd een SI=1.6 genoteerd. In de filterextracten werd een endotoxineconcentratie van ≥ 1.6 U/ml slechts 5x gemeten. De hoogst gemeten endotoxineconcentratie in de partikels bedroeg 2.23 U/ml. De endotoxineconcentraties die gemeten werden in de stalen blijken niet potent genoeg te zijn om de gemeten cytokinerespons te induceren.

In de A549 cellijn kon geen dosiseffect van endotoxine op de il-8-productie worden genoteerd. Zelfs bij de hoogst geteste concentratie van endotoxine (12.7 U/ml) was er geen significante verhoging in il-8-productie t.o.v. de negatieve controle (afwezigheid van endotoxine).

Tabel 6.4: Meetwaarde voor endotoxine in de verschillende filterextracten

datum	Aarschot	Borgerhout	Zelzate
	U/ml	U/ml	U/ml
4/09/2006	0,223	0,199	0,070
16/09/2006	0,366	0,357	1,133
28/09/2006	0,047	0,057	0,202
10/10/2006	0,044	0,016	0,014
22/10/2006	0,029	0,054	0,315
3/11/2006	0,242	0,019	0,128
15/11/2006	0,000	0,024	0,028
27/11/2006	0,000	0,042	0,006
9/12/2006	0,005	0,009	0,000
21/12/2006	0,000	0,019	0,009
2/01/2007	0,028	0,076	0,151
14/01/2007	0,027	0,073	0,019
26/01/2007	0,017	0,040	0,175
7/02/2007	0,176	0,000	0,155
19/02/2007	0,193	0,038	0,092
3/03/2007	0,015	0,171	0,014
15/03/2007	0,240	0,141	0,335
27/03/2007			0,383
8/04/2007			0,006
20/04/2007	1,176	2,230	1,288
2/05/2007	1,764		2,133
14/05/2007	0,273	0,262	0,390
26/05/2007	0,004	0,150	0,019
7/06/2007	0,688	2,028	0,747
19/06/2007	0,629	0,629	0,213
1/07/2007	0,929	0,891	0,054
13/07/2007	0,222	0,569	1,388
25/07/2007	0,533	0,820	0,604
6/08/2007	0,416		1,566
18/08/2007		0,118	0,509
30/08/2007		0,148	1,161
11/09/2007	0,426	0,100	0,244

7 Fase IV

7.1 Evaluatie van de relatie van de gemeten eindpunten tot tijd, plaats en klimatologisch parameters

Zwevend stof is een complex geheel, met verschillende afmetingen en samengesteld uit verschillende chemische componenten. Bovendien varieert de samenstelling van plaats tot plaats (andere typen bodemstof, zeezout,...), in de tijd, en is ze afhankelijk van de meteorologische omstandigheden.

Uit een vergelijking van stofconcentraties met meteorologische informatie kan men opmaken dat neerslag en windsnelheid een belangrijke invloed hebben op de dagelijkse variatie in PM_{2.5}- en PM₁₀-stofconcentraties.

Perioden met hoge PM₁₀-concentraties gaan gepaard met overwegend droog weer. Ze worden verder meestal gekenmerkt door lucht afkomstig van boven land en lagere windsnelheden. Veelal worden tijdens deze pollutie-episoden temperatuursinversies genoteerd. Perioden met lage PM₁₀-concentraties vallen vrijwel steeds samen met maritieme lucht. Deze luchtstromingen gaan veelal gepaard met neerslag en met daggemiddelde windsnelheden > 3 m/s. Temperatuursinversies doen zich dan vrijwel niet voor. Gemiddeld gezien is de verhouding PM_{2.5}/PM₁₀ op dagen met verhoogde PM₁₀-concentraties hoger dan op andere dagen. Dit wordt op alle stations vastgesteld, en zowel in 2005 als 2006. Op dagen met verhoogde concentraties bestaat dus een groter aandeel van het PM₁₀-stof uit PM_{2.5}.

De concentraties PM₁₀ en PM_{2.5} dalen met toenemende windsnelheid op de meeste stations. De concentratie grof stof varieert veel minder in functie van de windsnelheid en blijft min of meer constant. Het aandeel grof stof in de PM₁₀-concentratie neemt dus toe met toenemende windsnelheid. Blijkbaar speelt voor grover stof bij toenemende windsnelheid niet enkel het verdunningseffect. Het grover stof zal bij toenemende windsnelheid terug opwaaien. De zwarte rookconcentraties nemen gemiddeld gezien eveneens af met een stijging van de windsnelheid (Van Grieken *et al.*, 2003); (VMM, 2007).

Tabel 7.1 geeft een overzicht van de meteorologische gegevens (windrichting en -sterkte, temperatuur en neerslag) voor de verschillende bemonsteringsdagen en locaties. De gegevens zijn afkomstig van de VMM meteo-stations te Antwerpen Luchtbal (42M802) en te Gent (44M701). De neerslag gegevens die voor de locatie Aarschot werden gebruikt zijn afkomstig van de VMM Hydronet databank (http://www.hydronet.be/DATA_Vlaanderen.htm), meetpunt Pk228 te Holsbeek/St-Pieters-Rode. De data zijn de gemiddelde meetwaarde over 24 uur. Bij de verdere analyses werden voor de ontbrekende windrichtingen van Borgerhout deze van Zelzate genomen.

Tabel 7.1: Overzicht van de meteorologische gegevens.

	Borgerhout				Zelzate				Aarschot
	Wind richting*	neerslag	temp	Windsterkte	Wind richting	neerslag	temp	Windsterkte	neerslag
	°	mm	°C	m/s	°	mm	°C	m/s	mm
16/09/2006	5,5	-	21,8	1,49	334,3	0,0	21,4	1,60	0
28/09/2006	197,9	0,0	18,1	3,17	193,9	0,0	18,1	3,20	0
10/10/2006	104,6	1,4	16,5	1,97	118,1	2,0	17,0	2,14	10,9
22/10/2006	186,9	9,0	15,8	5,21	186,3	3,6	15,6	5,29	6,9
3/11/2006	276,9	2,4	8,0	1,69	266,6	0,4	8,3	1,93	0,4
15/11/2006	185,1	0,2	13,3	4,14	187,5	0,2	13,8	4,85	0,3
27/11/2006	174,5	0,0	12,2	3,93	176,3	0,0	12,6	4,27	0
9/12/2006	247,4	-	6,9	3,35	248,2	0,0	6,3	3,23	0,3
21/12/2006	33,0	-	6,9	1,56	37,4	0,0	6,9	1,59	0,1
2/01/2007	277,5	6,6	7,0	5,79	273,8	2,6	6,9	5,24	5,2
14/01/2007	251,9	1,4	8,5	5,03	246,5	0,0	8,2	4,43	0,4
26/01/2007	242,2	1,2	2,1	4,31	243,0	0,0	2,0	4,08	1,7
7/02/2007	208,1	0,0	0,3	1,45	-	0,0	-0,3	0,97	3
19/02/2007	150,0	0,0	6,9	2,37	160,4	0,0	6,8	2,63	0
3/03/2007	258,4	4,8	8,0	6,77	252,9	1,2	8,3	6,65	10,8
15/03/2007	-	0,0	9,1	-	254,7	0,0	9,2	1,61	0
27/03/2007	-	0,0	12,7	-	87,2	0,0	12,3	3,47	0
8/04/2007	-	0,0	10,5	-	269,7	0,0	10,7	1,76	0
20/04/2007	-	0,0	10,5	-	48,1	0,0	11,7	3,34	0
2/05/2007	-	0,0	15,6	-	60,4	0,0	16,8	5,21	0
14/05/2007	-	5,8	14,6	-	218,4	11,0	13,9	5,55	8,5
26/05/2007	-	23,0	16,6	-	32,2	7,4	16,5	2,48	0,5
7/06/2007	-	0,2	22,2	-	5,6	0,4	19,8	4,26	0
19/06/2007	-	0,8	21,9	-	92,4	9,2	22,1	3,05	0,3
1/07/2007	-	3,8	21,1	-	221,8	0,8	20,0	3,84	2,7
13/07/2007	-	0,0	21,9	-	200,8	0,8	21,6	3,58	
25/07/2007	-	0,0	18,9	-	238,1	0,2	18,7	4,02	0
6/08/2007	-	1,6	21,2	-	224,7	5,4	20,1	2,90	2,3
18/08/2007	-	0,0	17,9	-	181,2	0,0	17,4	3,63	
30/08/2007	-	0,0	15,8	-	263,5	0,0	15,7	2,57	0
11/09/2007	-	0,0	15,6	-	328,4	0,8	14,5	3,04	0,5

-: geen waarneming door technische problemen

*: de windrichting wordt uitgedrukt in graden v.b.90° betekent oostenwind, 180° betekent wind uit het zuiden

7.1.1 Salmonella mutageniciteit test (Ames)

7.1.1.1 Trends in plaats en tijd

Verwacht wordt dat de extracten van filters bemonsterd in industriële en stedelijke gebieden (respectievelijk Zelzate en Borgerhout) meer mutagene componenten bevatten dan deze van het landelijke gebied (Aarschot) en daardoor ook meer mutagene activiteit vertonen in de *Salmonella* mutageniciteit test.

Het genotoxisch (mutageen) potentieel van de extracten van de verschillende locaties werd op verschillende manieren vergeleken.

In eerste instantie werden de criteria (zie 6.1.1.) voor mutageniciteit van de filterextracten vergeleken voor de verschillende locaties (Tabel 7.2):

- dosisafhankelijk respons van het aantal revertanten/plaat
- significante verhoging van het aantal revertanten/plaat t.o.v. het extract van de blanco filter bij minstens één dosis

De mutagene evaluatie van de omgevingslucht in Vlaanderen toonde aan dat er significante activiteit aanwezig is op de verschillende bemonsterde plaatsen. Het aantal filters met mutagene activiteit was het laagst voor de regio Aarschot (78%), bedroeg 89% voor de locatie Borgerhout en was het hoogst in Zelzate (94%) (Tabel 7.2). Dit betekent ook dat Zelzate het meeste aantal dagen per jaar telt waarbij in de omgevingslucht stoffen met een mutagene potentie aanwezig zijn.

Tabel 7.2 :Overzicht van de positieve filterextracten: aantal positieve extracten t.o.v. het aantal geteste filters.

	Positieve filter*
Aarschot	22/28 (78%)
Borgerhout	25/28 (89%)
Zelzate	30/32 (94%)

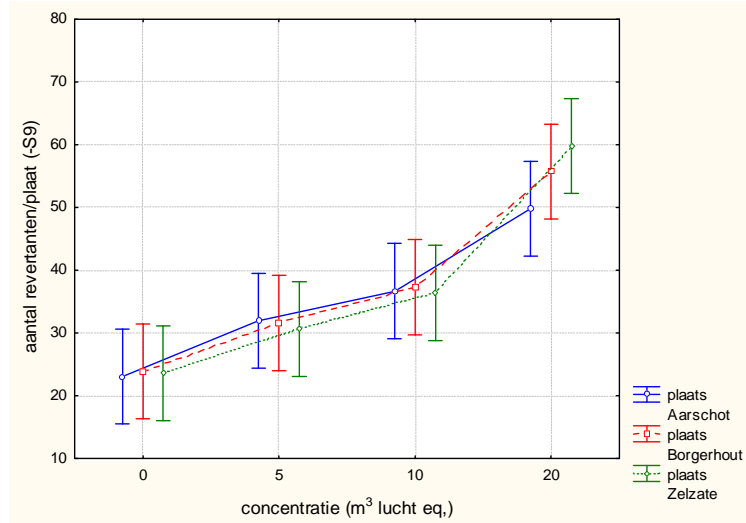
*: filterextract bevat mutagene activiteit als er een significante dosisafhankelijke respons kan aangetoond worden.

Er konden geen statistisch significante verschillen worden aangetoond tussen de drie locaties (Factorial ANOVA, $p > 0.05$) in Figuur 7.1.

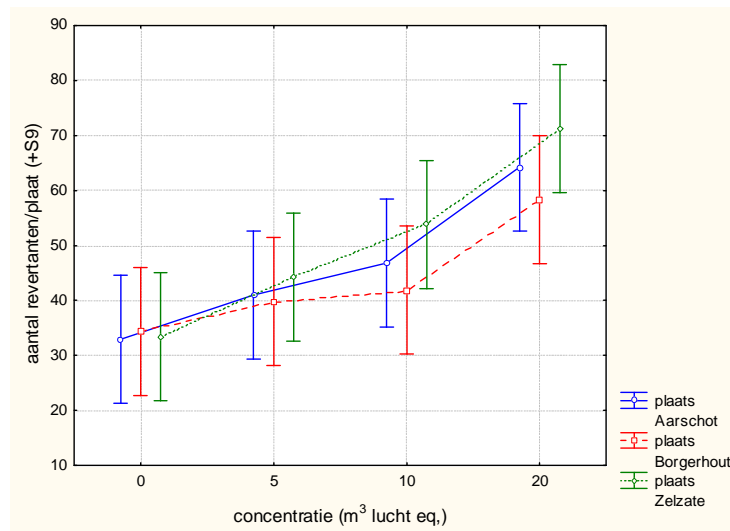
Wanneer de mutagene activiteit (revertanten/20m³ lucht eq.) bekeken wordt in functie van de tijd, waren er significante verschillen tussen de monsternamen dagen (ANOVA, $p < 0.01$) zowel voor de directe (-S9) als de indirecte (+S9) mutageniciteit. Deze verschillen werden gezien in de drie locaties (Figuur 7.2:).

Het globale beeld van de metingen toonde geen duidelijk verschil tussen de locaties. Maar met behulp van een two-way anova kon er, als gevolg van sterke verschillen in mutageen effect (direct en indirect) voor bepaalde dagen, toch een significant verschil aangetoond worden tussen de locaties (Factorial ANOVA voor plaats en tijd, $p < 0.001$). Een significante interactie tussen plaats en tijd werd vastgesteld ($p < 0.001$). De directe mutageniciteit was significant verschillend tussen de drie locaties waarbij de hoogste mutageniciteit werd gezien in de stalen van Zelzate, gevolgd door Borgerhout en Aarschot dat de laagste mutagene activiteit vertoonde. De indirecte mutageniciteit was significant verhoogd voor de stalen uit de regio Zelzate in vergelijking met deze van Borgerhout en Aarschot.

A.



B.



Figuur 7.1: Directe (A) en indirecte (B) mutageniciteit in functie van de blootstellingconcentratie voor de verschillende locaties (gemiddelde ± 95%CL).

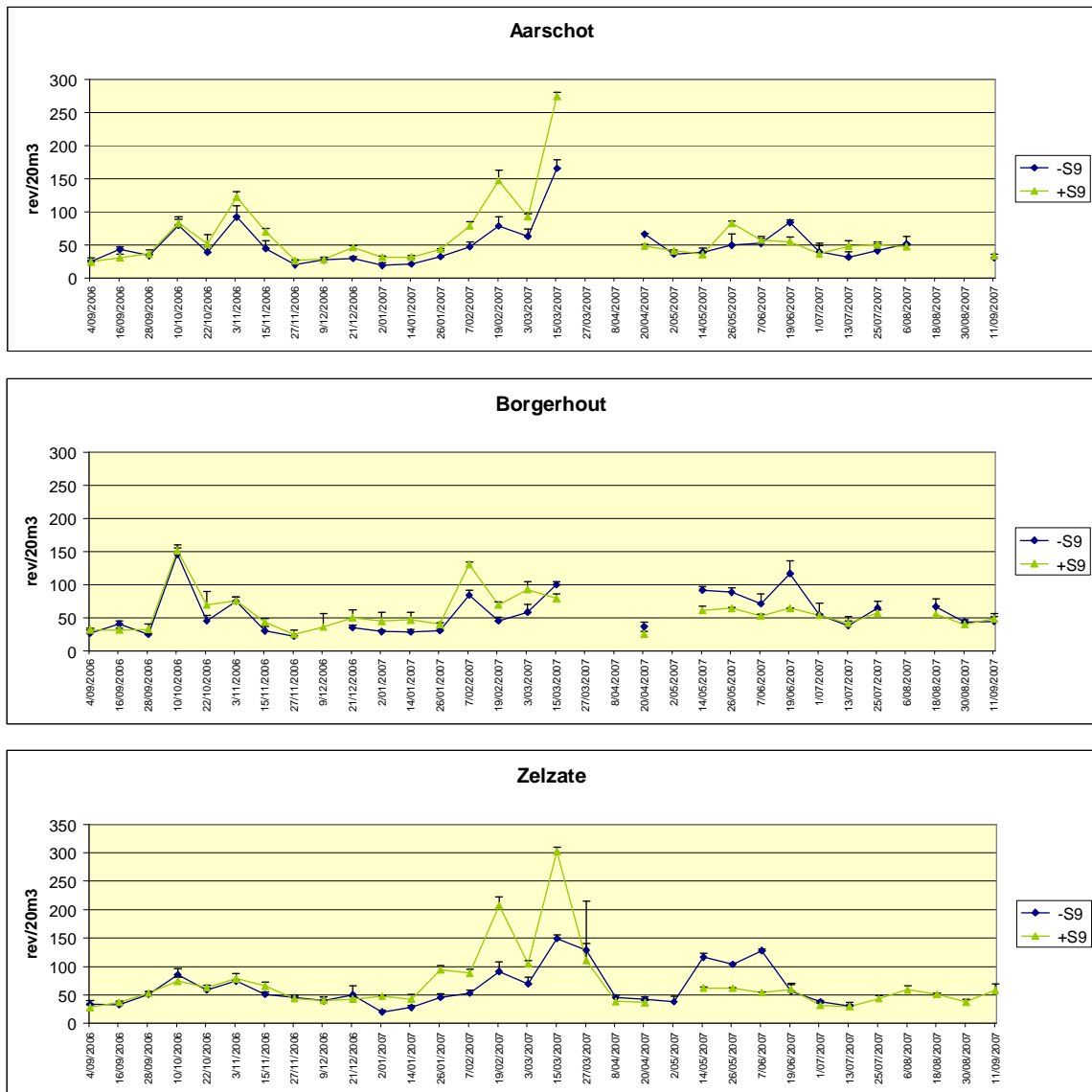
De dagen met de hoogste totale mutageniciteit in de filterextracten worden weergegeven in Tabel 7.3 voor de drie locaties.

Tabel 7.3: Top 10 van de dagen met de hoogste mutagene activiteit in de filterextracten.

Aarschot	Borgerhout	Zelzate
15/03/2007*	10/10/2006*	15/03/2007*
19/02/2007*	7/02/2007*	19/02/2007*
3/11/2006	19/06/2007	27/03/2007*
10/10/2006	15/03/2007*	7/06/2007
3/03/2007	26/05/2007	14/05/2007
19/06/2007	14/05/2007	3/03/2007
26/05/2007	3/03/2007	26/05/2007
7/02/2007*	3/11/2006*	10/10/2006*
15/11/2006	7/06/2007	3/11/2006
20/04/2007	18/08/2007	7/02/2007*

*: dagen waarop de bemonsteringstijd < 24 uur wegens doorslag van de filters (zie Tabel 4.1 voor de bemonsteringstijd)

In Vlaanderen werden reeds eerder effectgerichte metingen uitgevoerd op luchtstalen afkomstig van verschillende locaties. Deze studies waren echter veel beperkter in de tijd (minder staalname dagen en samenvoegen van materiaal per locatie en per seizoen). Een studie (2000-2001) rapporteerde dat er geen verschillen gevonden werden in gemiddelde mutagene activiteit (revertanten/m³) tussen de locaties Borgerhout, Hoboken en Peer (Du Four *et al.*, 2004). In een andere studie daarentegen (2000) werd een hogere mutageen effect gevonden in PM10 afkomstig van het stedelijk gebied Borgerhout in vergelijking met Berendrecht en Peer (Brits *et al.*, 2004). Dezelfde bevinding werd waargenomen in een campagne uitgevoerd in 2000 waar bemonsterd werd in de 2 industriële sites (Berendrecht en Zwijndrecht), twee landelijke sites (Peer en Essen) en twee stedelijke sites (Borgerhout en Antwerpen) (Schoeters *et al.*, 2001). De mutagene effecten waren het meest uitgesproken voor de stalen afkomstig van Borgerhout. In een andere Vlaamse studie uitgevoerd in 2002 werden PM10-stalen verzameld in 15 verschillende gemeenten met verschillende pollutiedruk (industriële, stedelijk en landelijk) (Du Four *et al.*, 2005). Deze studie was echter te klein om trends tussen de locaties te zien.



Figuur 7.2: Variatie in functie van de tijd van de directe en indirecte mutageniciteit voor de verschillende locaties.

7.1.1.2 Invloed van klimatologische omstandigheden

Er werd nagegaan of er een relatie kon aangetoond worden tussen de directe en indirecte mutageniciteit van de filterextracten en meteogegevens (neerslag, temperatuur, windrichting). Meteorologische condities kunnen de samenstelling van pollutanten beïnvloeden. Resultaten van vroegere studies geven aanwijzingen dat de weersomstandigheden een belangrijke rol spelen bij de inductie van genotoxische effecten (Schoeters *et al.*, 2001); (Ducatti and Vargas, 2003); (Zhao *et al.*, 2002); (Binkova *et al.*, 2003); (Cerna *et al.*, 1999). Seizoensvariaties werden meermaals aangetoond.

In deze studie kon er geen significante correlatie aangetoond worden tussen de meteorologische parameters en de mutagene activiteit van de extracten (Spearman rank correlaties, $p < 0.05$).

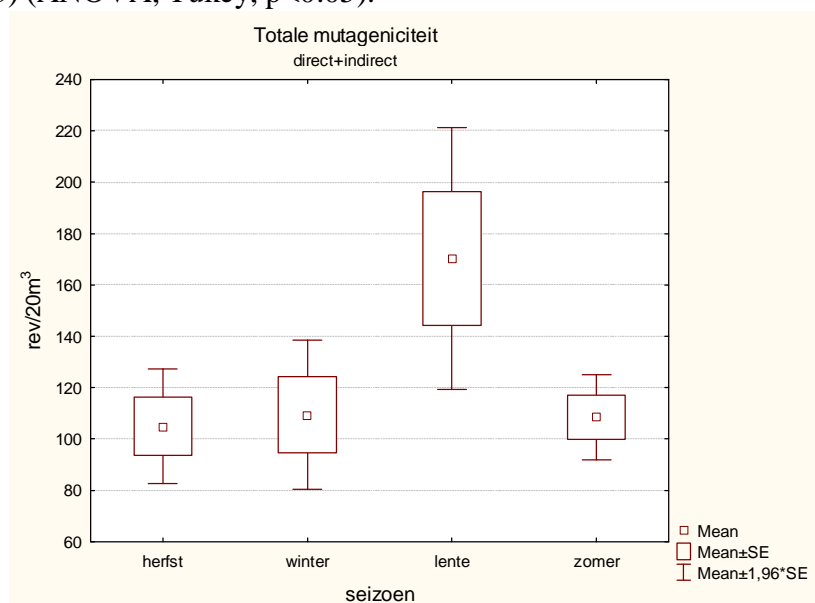
Via backward trajectories kan het traject worden bepaald dat de luchtmassa's hebben gevolgd gedurende 48 u vooraleer ze ons bereiken. Voor de verschillende

bemonsteringsdagen werden de backward trajectories bekeken en werd een windrichting aan de herkomst van de luchtlaag gegeven (90°= oosten, 180°=zuiden, 270°=westen, 360°=noorden). De interpretatie van de herkomst van de lucht kan sterk verschillen van de windrichting die door de meteo-diensten wordt gegeven. Als de mutagene activiteit (directe, indirecte en totale) vergeleken werd met de herkomst van de luchtmassa's, kon er wel een significante correlatie aangetoond worden met de windrichting (Spearman rank correlatie, $p < 0.05$).

Rev/20 m ³	r
-S9	0.304
+S9	0.296
totaal	0.354

Dit betekent dat de luchtmassa's afkomstig uit het N, NW en W, stofdeeltjes met de grootste mutagene potentie met zich meebrengen. Luchtmassa's uit N en NNW komen over de Noordzee maar passeren eerst nog de industriegebieden rond Amsterdam en Rotterdam. Luchtmassa's uit W, WNW en WZW zorgen voor aanvoer van vervuilde lucht vanuit Engeland (Londen of Midden-Engeland) of Noord-Frankrijk.

De totale, directe en indirecte mutageniciteit van de filterextracten werd vergeleken tussen de 4 seizoenen. In de lente was de mutagene activiteit van de extracten (directe, indirecte en totaal) hoger dan in de andere seizoenen. Significante verschillen werden aangetoond voor de directe mutageniciteit (lente significant verhoogd t.o.v. de herfst en winter) en de totale mutageniciteit (lente significant verhoogd t.o.v. de herfst) (Figuur 7.3) (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$).



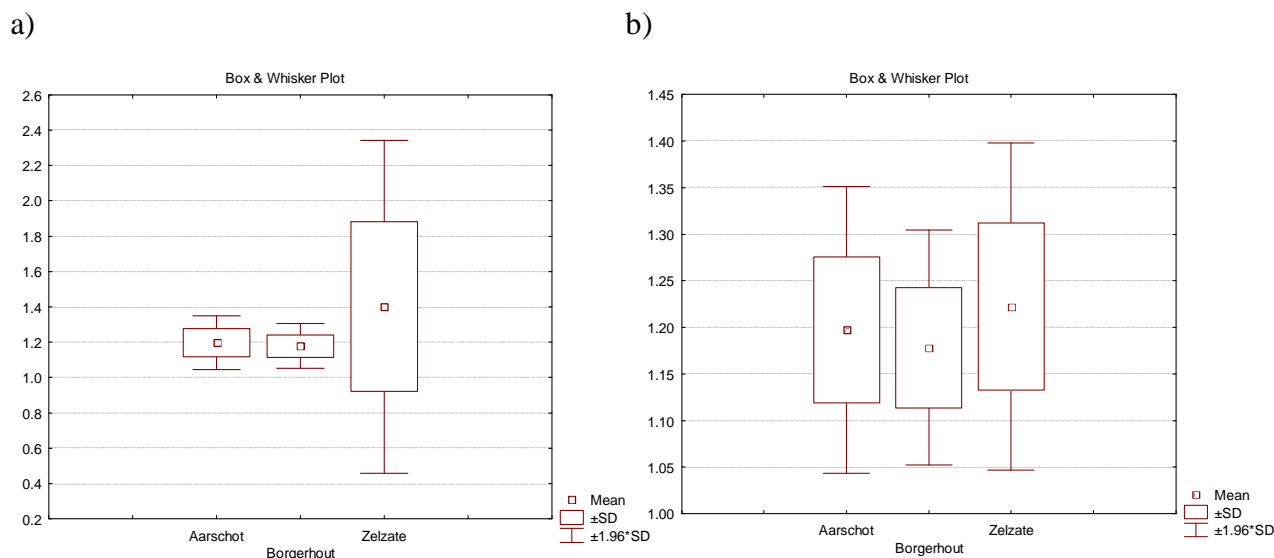
Figuur 7.3: Mutagene activiteit in functie van de seizoenen.

7.1.2 Cat-tox

7.1.2.1 Trends in plaats en tijd

In eerste instantie werd er nagegaan of er een algemeen verschil detecteerbaar is tussen de verschillende gebieden. Dit werd geëvalueerd door de gemiddelde fold inducties per staal te analyseren en via statistische analyse (one way ANOVA) na te

gaan of er per locatie significante verschillen optreden. Er bleken geen statistisch significante verschillen te worden waargenomen.

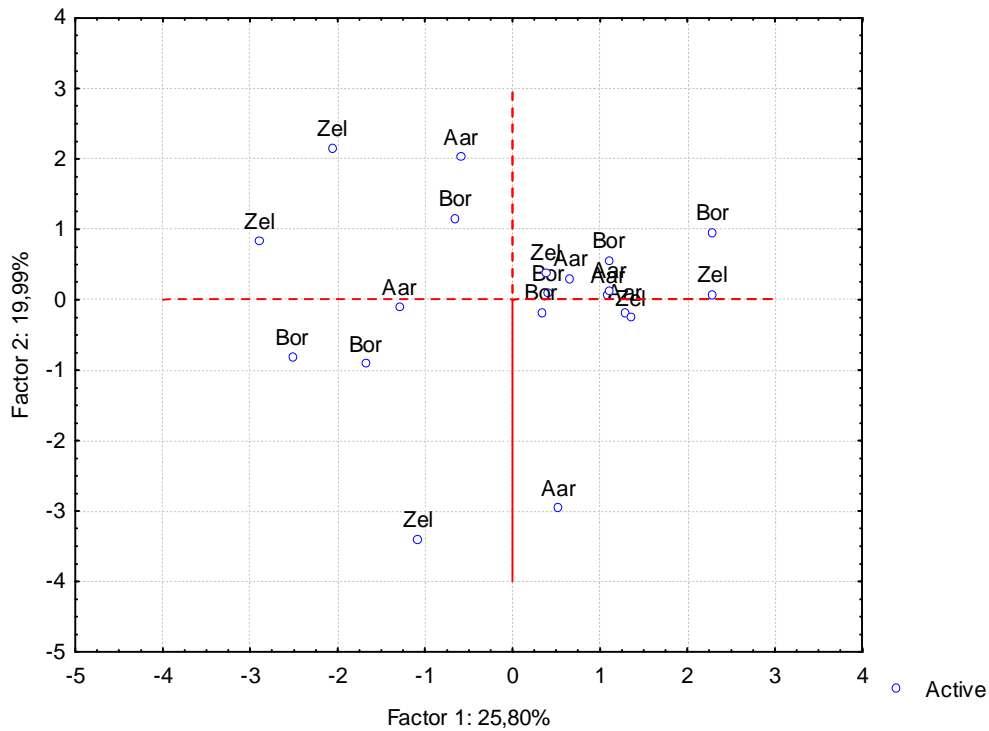


Figuur 7.4 :a) Box-Whisker plot plot gemiddelde fold inductie per locatie, b) Box-Whisker plot voor de verschillende locaties zonder het staal lente Zelzate (pool van 14-26/05/07 en 07/06/07).

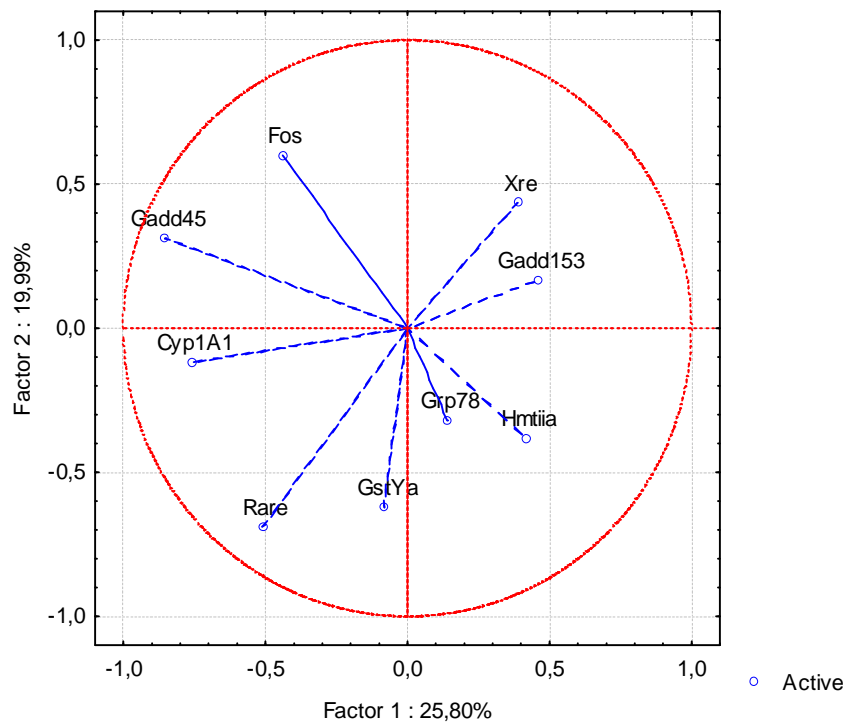
De box en whisker plots in Figuur 7.4a tonen duidelijk aan dat de extracten van Zelzate de grootste variatie vertonen. Zoals reeds eerder vermeld was er een extract van de lentecampagne in Zelzate dat uitzonderlijk hoge inducties gaf. Dit verklaart een groot deel van de variatie die we hier zien. Wanneer we dit staal verwijderen uit de dataset zien we dit duidelijk in Figuur 7.4b. De verdere analyses en bespreking van de resultaten zullen gebeuren zonder dit uitzonderlijke staal van Zelzate om te vermijden dat in verder analyses de gevonden relaties te fel bepaald worden door dit punt.

De bovenstaande voorstelling van de resultaten met statistische evaluatie laat ons enkel toe om op een algemene manier verschillen te evalueren tussen de drie locaties. Vermits één van de belangrijke troeven van de Cat-tox assay de verschillende eindpunten zijn, is het belangrijk om de samenhang tussen deze genen te kennen. Via multivariate statistiek is het mogelijk om het grote aantal variabelen (genen) te reduceren tot een aantal nieuwe onderling ongecorreleerde variabelen. Een belangrijke en veelgebruikte techniek is principale component analyse waarbij de nieuwe variabelen worden weergegeven onder de vorm van factoren (principale componenten). De visuele voorstelling van de data maakt het mogelijk om verbanden tussen de verschillende stalen vast te stellen.

De principale component analyse met de dataset uit Tabel 6.1 toont geen duidelijke scheiding tussen de verschillende locaties (Figuur 7.4). De belangrijkste genen die zorgen voor de spreiding in de dataset zijn Gadd45 en Cyp1A1 en de tweede factor wordt gedomineerd door GstYa, Fos en Rare (Figuur 7.5).



Figuur 7.5: Score plot (condities) van PCA dataset hoogste fold inductie, Aar = Aarschot, Bor = Borgerhout, Zel = Zelzate en Blan = Blanco.



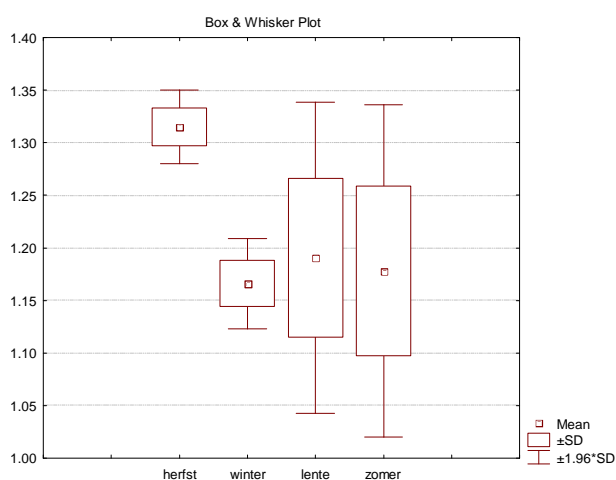
Figuur 7.6: Loading plot (genen) met verklarende factoren voor de spreiding van de verschillende locaties.

Intuïtief zou men verwachten dat er lagere inducties optreden in het landelijke referentiepunt Aarschot. Bovenstaande figuren tonen aan dat dit voor deze campagne niet het geval is en dat er ook geen duidelijk onderscheid te maken is tussen de verschillende staalnameplaatsen. Voorgaande studies in Vlaanderen toonden ook reeds een meer homogene verspreiding van genotoxische en mutagene effecten in

Vlaanderen (Du Four *et al.*, 2004); (Brits *et al.*, 2004; Du Four *et al.*, 2005). Een belangrijke verklaring voor dit fenomeen is dat door de kleine oppervlakte met een hoge bevolkingsgraad en belangrijke grote industriegebieden er geen echt referentiegebied meer te vinden is.

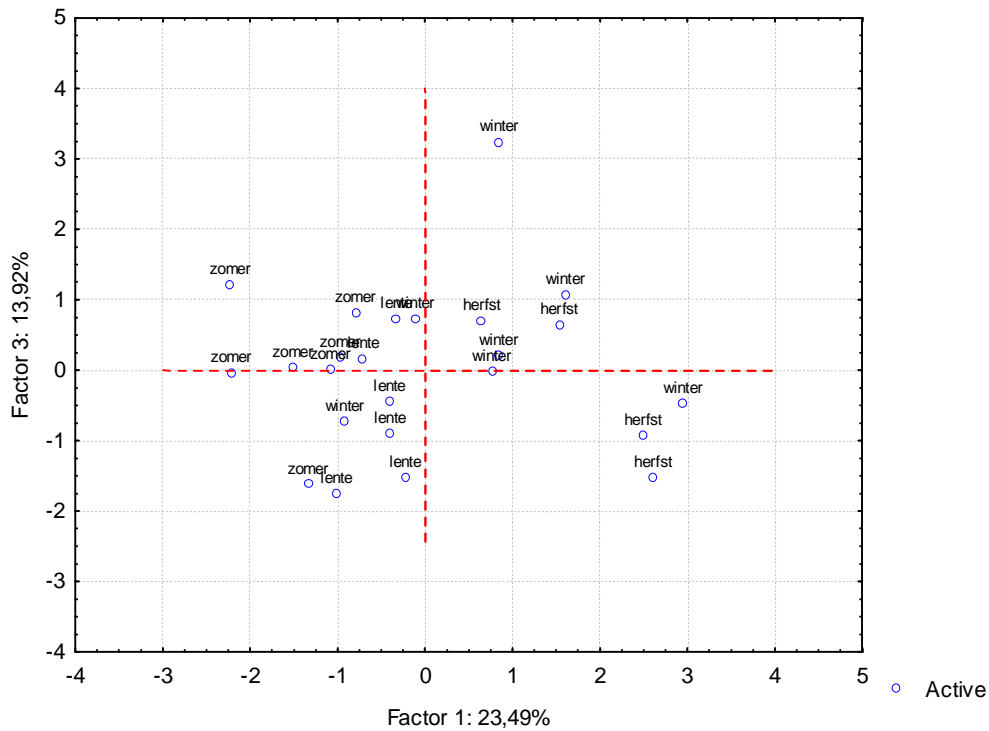
7.1.2.2 Verschillen tussen de seizoenen

Een tweede belangrijke parameter die voor de gehele dataset wordt geëvalueerd, is de verschillen in genexpressie tussen de stalen gecollecteerd tijdens de verschillende seizoenen (zie Tabel 6.1). Onderstaande boxplot (Figuur 7.7) toont de gemiddelde fold inductie per seizoen. Hierop is te zien dat de gemiddelde inducties in de herfst hoger liggen dan in de andere seizoenen. Dit is vooral te wijten aan een hoger aantal genen die significant geïnduceerd zijn tijdens de herfst en niet zo zeer aan hogere inducties. Het is algemeen bekend dat in de herfst en winter de graad van luchtpollutie stijgt als gevolg van een hoger energieverbruik (vooral verwarming). Opmerkelijk is ook dat er een grotere spreiding is van de data in de lente en de zomer, dit impliceert dat er mogelijk meer uitzonderlijke metingen optreden in deze perioden.

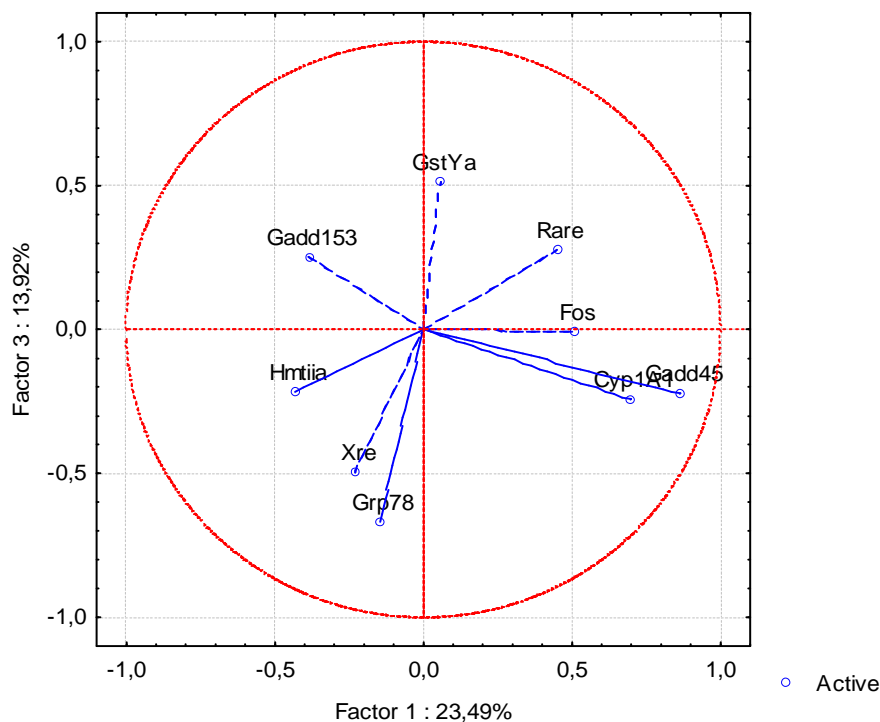


Figuur 7.7: Box-Whisker plot seizoenverschillen, gemiddelde fold inductie, (gemiddelde \sum FI Cyp1A1 tot Grp78) per staal.

De evaluatie van de dataset via principale component analyse toont aan dat we een onderscheid kunnen maken tussen stalen van de herfst/winter en stalen van de lente/zomer (Figuur 7.8). De genen die belangrijk zijn voor deze spreiding zijn vooral diegene die de eerste factor bepalen Cyp1A1, Gadd45, Fos en Rare (Figuur 7.9).



Figuur 7.8: PCA score plot voor de verschillende seizoenen.



Figuur 7.9: PCA loading plot met spreiding van de genen.

Onderzoek naar de seizoensverschillen vergt intensieve campagneperiodes waardoor het aantal reeds gepubliceerde studies eerder beperkt is. Het is enkel mogelijk om te vergelijken met studiegebieden die eveneens in het gematigd zeeklimaat liggen, deze data zijn echter in de literatuur niet beschikbaar. Andere studies die op Vlaams grondgebied zijn gebeurd waren niet specifiek ontworpen om seizoensgerelateerde effecten op te sporen. Hierdoor werden de verschillende locaties in verschillende seizoenen bemonsterd (Du Four *et al.*, 2004; Brits *et al.*, 2004; Du Four *et al.*, 2005).

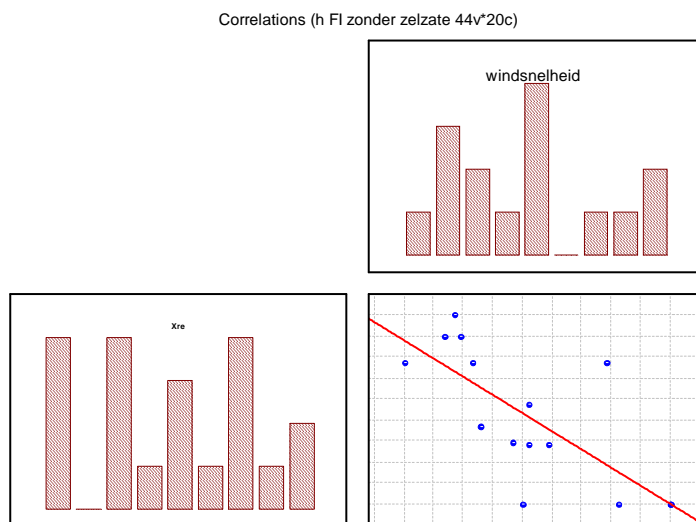
7.1.2.3 Invloed van klimatologische omstandigheden

Zoals bekend is er een invloed van de weersomstandigheden op de hoeveelheden pollutanten in de lucht. Hierbij denken we aan de maatregelen van de overheid wanneer de drempelwaarden voor fijn stof worden overschreden, vaak door te weinig beweging in de onderste luchtlagen. Via correlaties tussen de individuele genen en de individuele klimatologische gegevens trachten we na te gaan of er een verband is tussen deze variabelen. Als verwerping van de nulhypothese wordt er niet per se van uitgegaan dat er een lineaire relatie is tussen de te testen parameters (Pearson's correlation), maar gebruiken we de Spearman's rank correlatie die er vanuit gaat dat er een monotone relatie is tussen beide parameters. Dus een toename in X is altijd verbonden met een toename in Y, of een toename in X is altijd verbonden met een afname in Y. Dit kan een lineair verband zijn maar bijvoorbeeld ook een kwadratisch verband. Spearman's rank correlatie analyses worden weergegeven in Tabel 7.4.

Tabel 7.4: Spearman's rank correlatie analyses van genen met klimatologische parameters. De individuele r-waarden worden gegeven, de vetgedrukte zijn significant ($p < 0.05$).

	Neerslag	Temperatuur	Windsnelheid
Cyp1A1	-0.388	-0.441	-0.090
GstYa	0.342	-0.228	-0.040
Xre	0.043	0.053	-0.695
Hmtiia	0.419	-0.057	0.280
Fos	-0.271	-0.172	-0.239
Cre	0.265	-0.323	0.403
Rare	0.426	-0.488	0.360
Gadd153	0.186	0.326	-0.248
Gadd45	-0.301	-0.189	-0.174
Grp78	0.421	0.003	0.253

Er is een significante negatieve correlatie ($r = -0.695$) tussen de Xre respons en de windsnelheid (Figuur 7.10). Dit impliceert dat wanneer er weinig wind is, meer inductie van Xre optreedt. Het type polluenten dat persistenter aanwezig is in deze omstandigheden en zo een invloed heeft op de inductie van de faseII biotransformatie enzymes kan uit deze studie echter niet afgeleid worden.



Figuur 7.10: Individuele Spearman rank correlatie tussen windsnelheid (x-as) en Xre (y-as). Histogrammen met de fold inductie categoriën op de x-as en de frequentie in de y-as.

Oorsprong van de luchtmassa bepalen (Backward trajectories)

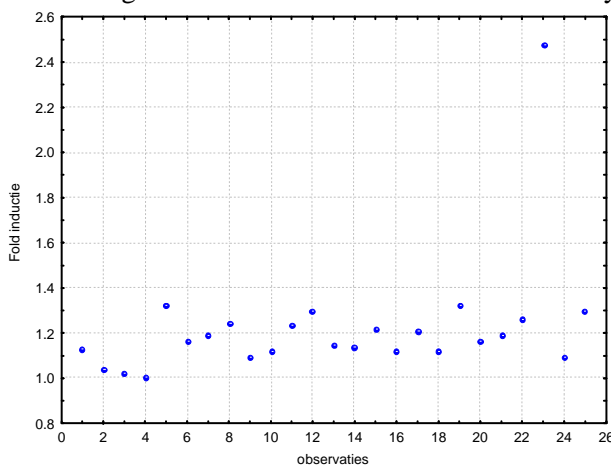
Backward trajectories geven een visuele indicatie van de verplaatsing van luchtlagen gedurende 48u, terugrekenend van een vaste locatie (Louie *et al.*, 2005). Op deze manier leveren windpatronen een belangrijke toegevoegde waarde aan het inschatten van herkomst van gemeten stofdeposities. In onderstaande tabel werden de backward trajectories van de verschillende stalen ingedeeld volgens windrichting en werden de verschillende stalen per locatie gerangschikt volgens oplopende fold inductie (FI). Voor Aarschot en Borgerhout vinden we geen duidelijke waarneembare trends d.w.z. er is geen enkel verband tussen windrichting en stijging in FI. Enkel voor Zelzate lijkt een stijgende activiteit geassocieerd te zijn met noordelijke herkomst (vanuit Nederland), terwijl lagere activiteit overwegend werd gemeten bij zuidelijke en westelijke luchtverplaatsingen (over zee en vanuit Frankrijk). De bevindingen zijn weliswaar enkel gebaseerd op visuele inspectie. Door het berekenen van gemiddelde FI per gepoold staal wordt één waarde verkregen waardoor een algemene respons kan vergeleken worden met de backtrack trajectories.

Tabel 7.5: Interpretatie van de backward trajectories. Ws: windstil, zee: luchtstromen van over zee

Locatie	Data	Seizoen	Gemiddelde FI	Backtrack	
26/05/07	07-19/06/07	Aarschot	lente	1.10	N-N-Z
1-13-25/07/07		Aarschot	zomer	1.12	Z-Z-W(ws)
27/11/06	09/12/06	Aarschot	winter	1.17	Z-W
02-14/01/07		Aarschot	winter	1.19	W-W
6/08/07	11/09/07	Aarschot	zomer	1.23	Z-NW (zee)
20/04/07	02-14/05/07	Aarschot	lente	1.25	N-O-Z
04-28/09/06		Aarschot	herfst	1.33	/
18-30/08/07	11/09/07	Borgerhout	zomer	1.12	Z(ws)-Z(ws)-N-NW(zee)
14-26/05/07	07-19/06/07	Borgerhout	lente	1.12	Z-N-N-Z
02-14/01/07		Borgerhout	winter	1.14	W-W
15-27/11/06		Borgerhout	winter	1.14	Z-Z
1-13-25/07/07		Borgerhout	zomer	1.20	Z-Z-W(ws)
20/04/07		Borgerhout	lente	1.22	N
04/09/06		Borgerhout	herfst	1.29	/
1-13-25/07/07		Zelzate	zomer	1.09	Z-Z-W(ws)
27/11/06	09/12/06	Zelzate	winter	1.16	Z-W
02-14/01/07		Zelzate	winter	1.19	W-W
27/03/07	08-20/04/07	Zelzate	lente	1.27	O-N-N
06-18-30/08/07	11/09/07	Zelzate	zomer	1.30	Z(ws)-Z(ws)-N-NW (zee)
04-16-28/09/06		Zelzate	herfst	1.32	/
14-26/05/07	07/06/07	Zelzate	lente	2.48	Z-N-N

7.1.2.4 Uitzonderlijke situatie

Zoals reeds besproken in Fase III, vertoont één gepoold staal van de lente-campagne in Zelzate hogere en meer inducties dan de andere stalen die werden getest. De scatterplot van de fold inducties over de gehele campagne toont duidelijk dat staalnummer 23 een piekwaarde is (Figuur 7.11). Deze data illustreren dat zelfs in een pool van drie stalen uitzonderlijke situaties kunnen gedetecteerd worden met de Cat-tox assay.



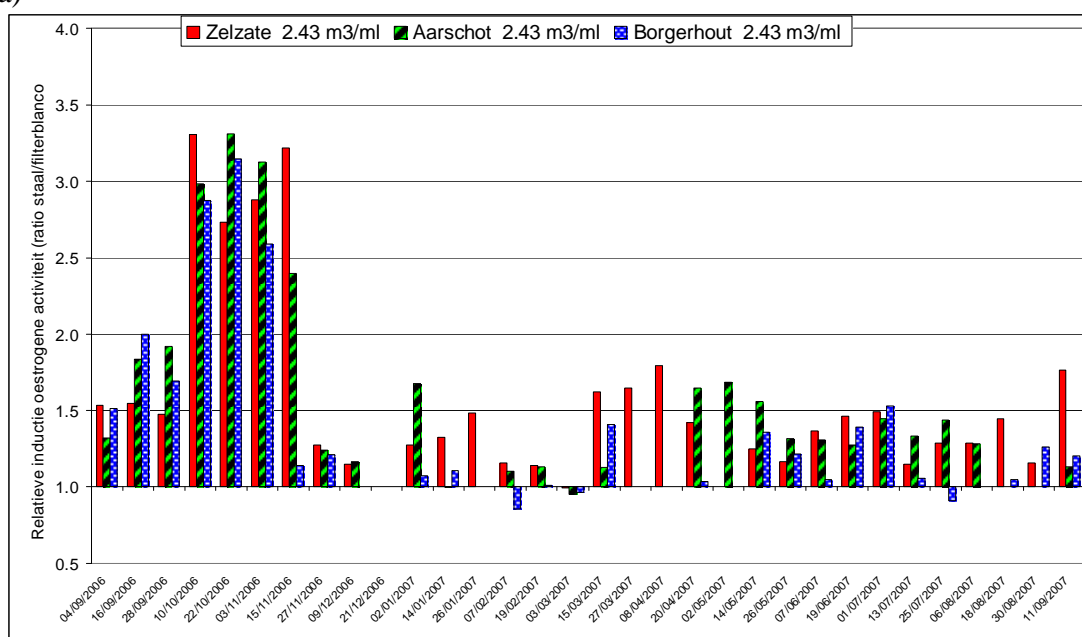
Figuur 7.11: Scatterplot FI gehele campagne in Zelzate

7.1.3 MELN

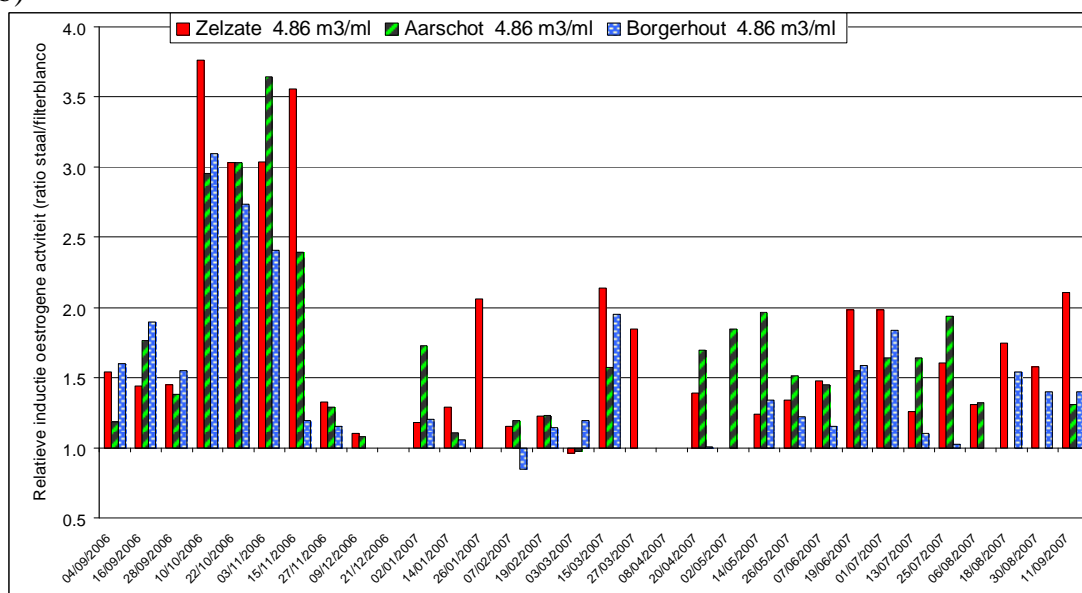
7.1.3.1 Trends in plaats en tijd

Al de resultaten worden per tijdstip van monstername voor de 3 locaties naast elkaar voorgesteld. Een eerste visuele inspectie van Figuur 7.12 toont geen uitgesproken tendensen voor plaats noch voor tijdstip. Wat meest opvalt is de relatieve hoge signalen (RIS>2) bij de 3 locaties voor de monstername in de periode 10/10/2006-15/11/2006 ten opzichte van de andere punten in de tijd. Dit is enkel zichtbaar bij de grafieken a en b, voor respectievelijk 2.43 m³/ml en 4.86 m³/ml vermits voor de hoogste concentratie 9.72 m³/ml er geen testen werden uitgevoerd door tekort aan materiaal (overlading van de filters en afspringen van sampler). Globaal toont de Figuur 7.12 dat signalen bij 4.86 en 2.43 m³/ml dus beter vergelijkbaar zijn dan bij 9.72 m³/ml, hetgeen dus eerder een technische oorzaak heeft.

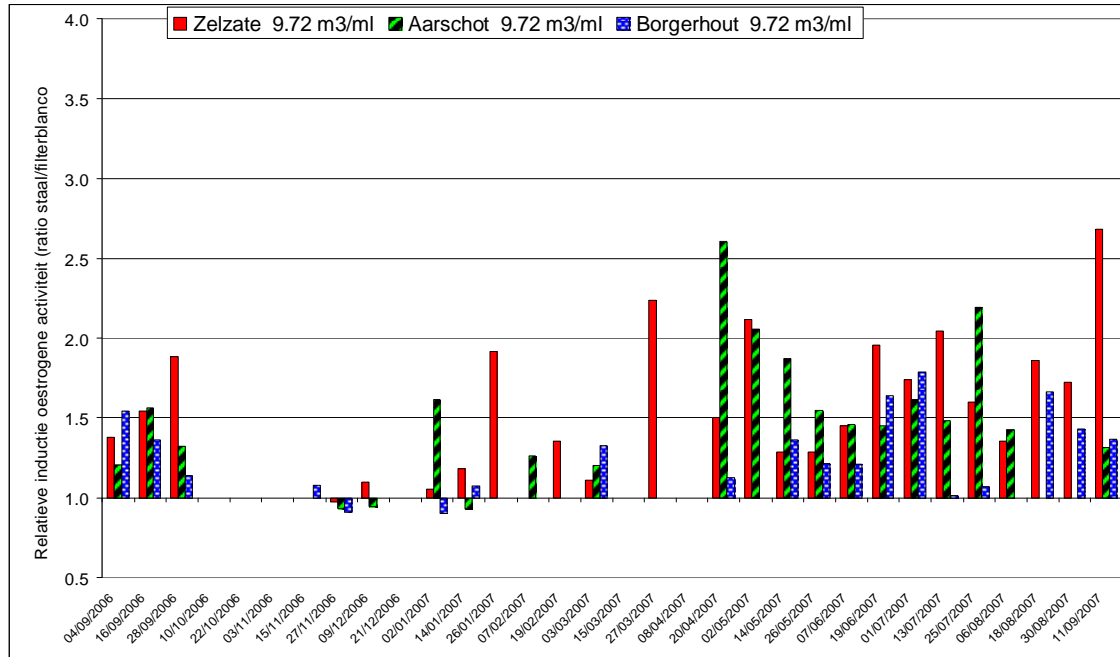
a)



b)

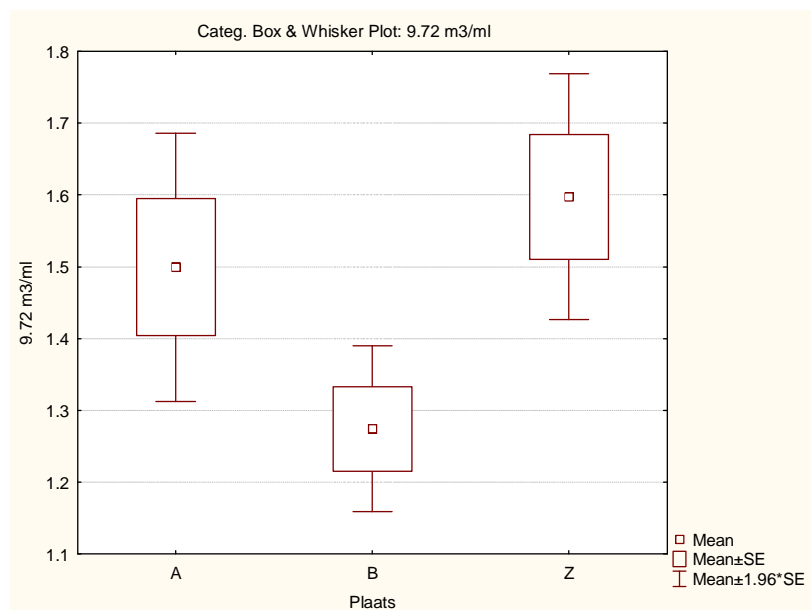


c)



Figuur 7.12: Relatieve inductie score voor oestrogene activiteit als ratio staal/filterblanco (RIS) voor Zelzate, Aarschot en Borgerhout in functie van monstername datum met deelfiguren a,b,c voor verschillende testconcentraties van extracten.

Bij een globale analyse van stalen gegroepeerd per locatie toont ANOVA analyse dat er tussen de 3 plaatsen geen statistisch verschil is, behalve voor de concentratiegroep 9.72 m³/ml met $p = 0.027$ (ANOVA, Tuckey HSD unequal N). Dit beeld wordt samengevat in Figuur 7.13 waar duidelijk blijkt dat oestrogene potentie in stalen voor Borgerhout gemiddeld lager scoort.



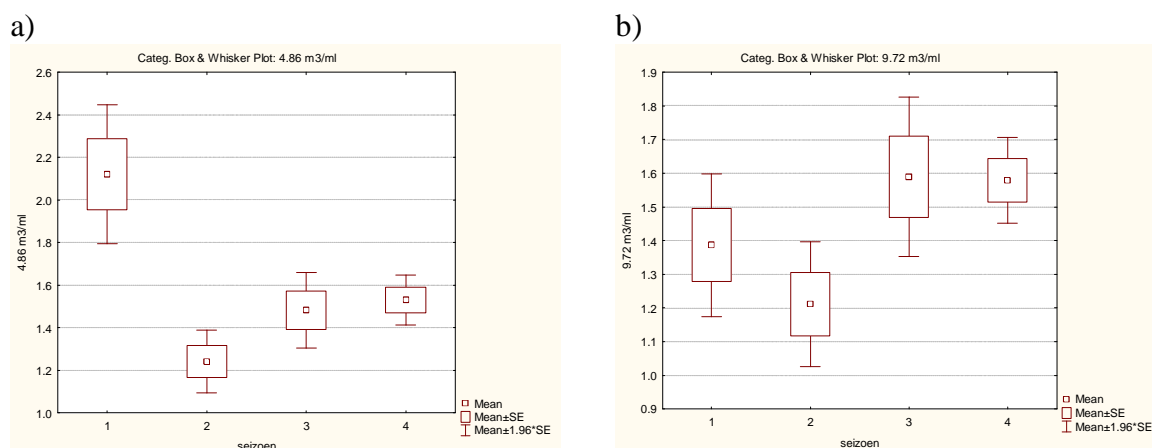
Figuur 7.13: Relatieve oestrogene inductie (RIS) voor de 3 locaties A (Aarschot), B (Borgerhout) en Z (Zelzate) bij de hoogste testconcentratie van de stalen 9.72 m³/ml.

Bekijken we de resultaten meer in detail per locatie op basis van relatieve inductie score (RIS) dan toont dit dat er voor Zelzate en Aarschot de grootste aantallen stalen (dus bemonsteringsdagen) zijn met beduidende inductie, of positief voor oestrogene activiteit (RIS > 1.3). Daartegenover staat dat voor locatie Borgerhout het grootste aandeel stalen (of bemonsteringsdagen) genoteerd wordt met geen beduidende oestrogene activiteit of stalen die als negatief ingedeeld worden (RIS ≤ 1.1). Dit wordt samengevat in Tabel 7.6.

Tabel 7.6: Verdeling van aandeel stalen, % van totaal positief of negatief voor relatieve inductie score van oestrogene activiteit per locatie en per geteste concentratie

Relatieve inductie score (RIS)	Zelzate			Aarschot			Borgerhout		
	2.43 m ³ /ml	4.86 m ³ /ml	9.72 m ³ /ml	2.43 m ³ /ml	4.86 m ³ /ml	9.72 m ³ /ml	2.43 m ³ /ml	4.86 m ³ /ml	9.72 m ³ /ml
% Positief (> 1.3)	60	72	70	62	73	70	30	52	47
% Negatief (≤ 1.1)	3	7	12	11	8	15	36	20	31

Vergelijking van bemonsteringen in functie van de verschillende periodes 1, 2, 3 en 4 (sept.- nov.= 1/ dec.- febr. = 2/ ma – mei = 3 en juni - aug.= 4) toont dat bij 2 van de 3 geteste concentraties van stalen, namelijk 4.86 m³/ml en 2.43 m³/ml er voor seizoen 1 een vergelijkbaar en sterk significant verschil is t.o.v. de andere periodes (p<0.005, in ANOVA, Tukey HSD unequal N). Dit effect werd niet opgepikt bij de hoogste testconcentratie, 9.72 m³/ml, zoals geïllustreerd in Figuur 7.14. Zoals eerder aangehaald bij de bespreking van Figuur 7.12 zou dit te maken kunnen hebben met het ontbreken van stalen voor analyse bij de hoogste concentratie, net voor die periode (seizoen 1) waar er hoge relatieve oestrogene activiteit werd gemeten.



Figuur 7.14: Spreiding van gemeten relatieve oestrogene inductie (RIS) bij 2 hoogste testconcentraties (a en b) i.f.v. tijdstip van bemonstering met indeling volgens seizoenen met sept.- nov.= 1; dec.- febr. = 2; ma – mei = 3 en juni - aug.= 4 .

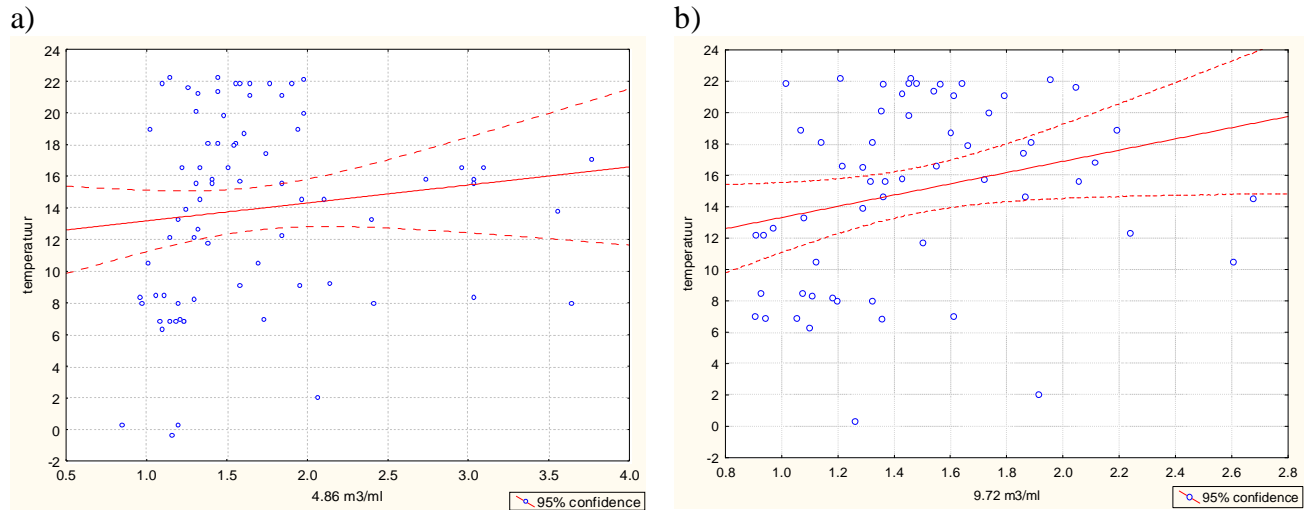
7.1.3.2 Invloed van klimatologische omstandigheden

Er werd nagegaan of er een relatie kon aangetoond worden tussen de gemeten relatieve oestrogene inductie en parameters met betrekking tot meteo informatie. Er werd voor neerslag en windrichting geen verband gevonden met hormoonverstorende activiteit, terwijl er via niet-parametrisch testen (Spearman rank) een duidelijk positief significant verband bleek tussen temperatuur en de relatieve oestrogene activiteit bij de 3 verschillende testconcentraties ($p < 0.05$). In Figuur 7.15 wordt dit geïllustreerd voor 2 testcondities. Het is in deze fase van het project niet duidelijk of dit verband met temperatuur eerder toevallig dan wel causaal is. Bovendien zijn er ons geen studies bekend die invloed van temperatuur op metingen van oestrogene activiteit beschrijven. Voor gegevens over de herkomst van de luchtmassa's werd een omgekeerd significant verband gevonden bij 2.43 en 4.86 m³/ml. Dit wil zeggen dat eerder de luchtmassa's uit het oosten (richting Duitsland, Ruhrgebied) een bijdrage zouden leveren tot de gemeten oestrogene activiteit.

De samenvattende tabel voor Spearman rank correlatie met de verschillende geteste parameters, met R en p-waarden wordt hierna gegeven (Tabel 7.7)

Tabel 7.7: Vergelijking van parameters voor meteo met relatieve inductie score voor oestrogene potentie (RIS). Bij significant verband werd de p-waarde ingekleurd.

Vergelijking parameters		n	Spearman R	T (N-2)	p-waarde
2.43 m³/ml	windrichting	53	-0.14	-1.03	0.3074
	temperatuur	78	0.24	2.13	0.0361
	neerslag	75	0.19	1.67	0.0996
	herkomst luchtmassa's (backtrack)	78	-0.39	-3.79	0.00029
4.86 m³/ml	windrichting	52	-0.17	-1.23	0.2254
	temperatuur	77	0.27	2.43	0.0175
	neerslag	74	0.18	1.58	0.1185
	herkomst luchtmassa's (backtrack)	77	-0.26	-2.42	0.01763
9.72 m³/ml	windrichting	38	-0.18	-1.11	0.2743
	temperatuur	60	0.35	2.83	0.0064
	neerslag	57	-0.05	-0.38	0.7061
	herkomst luchtmassa's (backtrack)	60	-0.19	-1.54	0.1293



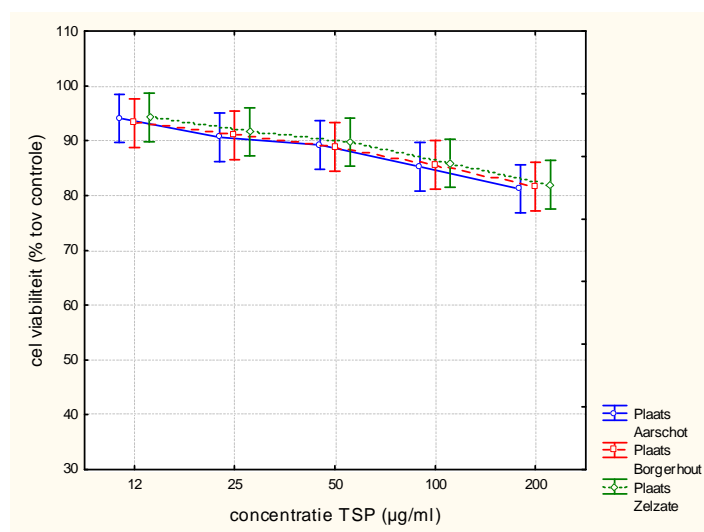
Figuur 7.15: Relatie tussen relatieve oestrogene inductie bij 2 testconcentraties van extracten luchtfilters (a bij 4.86 m³/ml en b bij 9.72 m³/ml) i.f.v. de temperatuur in de omgevingslucht.

7.1.4 Cytotoxiciteit

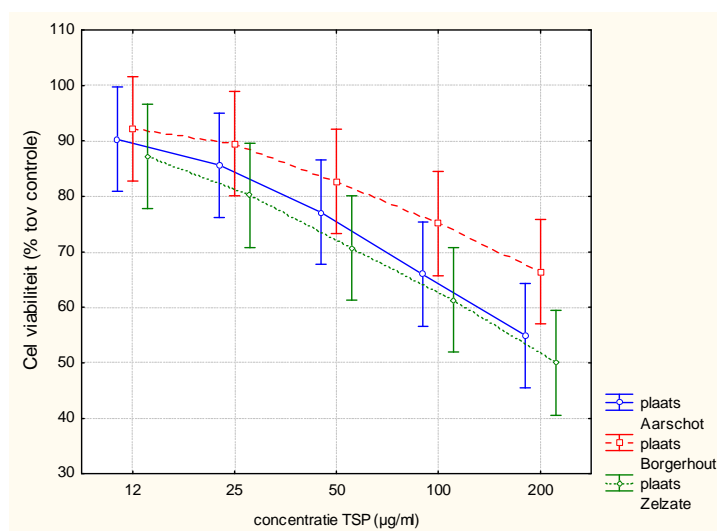
7.1.4.1 Trends in plaats en tijd

Het gemiddelde (over de volledige campagne) cytotoxisch effect van de partikels was vergelijkbaar voor de drie locaties in zowel de THP-1 als de A549 cellen (Factorial ANOVA, $p > 0.05$). In de Beas-2B cellijn daarentegen gaven de partikels afkomstig van Zelzate een significant hogere cytotoxiciteit in vergelijking met deze van Borgerhout (Factorial ANOVA, $p < 0.001$) (Figuur 7.16).

A



B.



Figuur 7.16: Vergelijking van de cytotoxiciteit van de partikels in (A) THP-1 en in (B) Beas-2B cellen tussen de verschillende monsternameplaatsen (gemiddelde \pm 95% CL).

Na blootstelling van THP-1 cellen vertoonden 14/28 partikelstalen uit Aarschot en 14/28 uit Borgerhout een significante dosisrespons terwijl er 20/30 stalen uit Zelzate significant cytotoxisch waren. Slecht één staal uit Borgerhout (20/4/07) en één staal uit Zelzate (27/3/07) vertoonden cytotoxiciteit in de A549 cellen. Partikels uit de regio Aarschot, Borgerhout en Zelzate veroorzaakten cytotoxiciteit in Beas-2B cellen in respectievelijk 19/28, 18/27 en 28/32 van de monstername dagen.

In de THP-1 en de Beas-2B cellijnen zijn er significante verschillen in cytotoxiciteit tussen de verschillende monstername dagen en dit voor de drie locaties (Figuur 7.17) (Factorial ANOVA, $p < 0.05$).

In de Beas-2B cellijn is duidelijk te merken dat de cytotoxiciteit in de drie meetplaatsen lager is in de periode tussen oktober 2006 tem februari 2007 (Figuur 7.17).

Deze resultaten zijn de eerste cytotoxiciteitsgegevens voor de 3 cellijnen voor de Vlaanderen. In vroegere campagnes (2000 en 2001) in opdracht van VMM werd

alleen met A549 en THP-1 cellen gewerkt (Don Porto Carero, 2002). In geen van beide cellijnen werd toen cytotoxiciteit vastgesteld maar de hoogst geteste concentratie bedroeg slechts 28 µg/ml.



Figuur 7.17: Variatie in de cytotoxiciteit (bij 200µgTSP/ml) voor de verschillende locaties in functie van de monsternamen dag.

7.1.4.2 Invloed van klimatologische omstandigheden

Er werd nagegaan of er een relatie kon aangetoond worden tussen de cytotoxiciteit van de partikels en meteo gegevens (neerslag, temperatuur, windrichting, windsnelheid). Een significante negatieve correlatie kon aangetoond worden tussen enerzijds het cytotoxische effect van de partikels in de Beas-2B ($r=-0.370$) en THP-1 cellen ($r=-0.224$) en de temperatuur. D.w.z. dat bij hogere temperaturen het schadelijke effect van de partikels groter is (percentage levende cellen in de test neemt af) (Spearman rank correlatie, $p<0.05$). In de A549-cellen was dezelfde correlatie ($r=-0.145$) te zien, echter niet significant. Voor de andere parameters konden er geen significante correlaties aangetoond worden.

Er konden geen correlaties aangetoond tussen de geïnduceerde cytotoxiciteit en de herkomst van de luchtmassa's (via backward trajectories) (Spearman rank correlatie).

7.1.5 Cytokineproductie

7.1.5.1 Trends in plaats en tijd

Significante verschillen in cytokineproductie (uitgedrukt als SI, gemiddelde van de verschillende bemonsteringsdagen) tussen de locaties konden worden aangetoond (Figuur 7.17):

- De TNF- α inductie is significant verhoogd in de stalen van Borgerhout t.o.v. de stalen van Zelzate. (Factorial ANOVA, $p=0.04$).
- De inducties van il-8 in A549 zijn significant verlaagd in de stalen van Zelzate t.o.v. de stalen van Aarschot (Factorial ANOVA, $p<0.01$).
- Zowel il-6 als il-8 opregulaties in Beas-2B zijn significant hoger na blootstelling aan de partikels afkomstig van Borgerhout in vergelijking met de twee andere locaties (Factorial ANOVA, il-6: $p<0.01$; il-8: $p=0.02$).

TNF- α , il-6 en il-8 (Beas-2B) volgen hetzelfde patroon en tonen aan dat het inflammatoir potentieel van de partikels uit het stedelijk gebied Borgerhout hoger is dan deze van de partikels uit de industriële en landelijke locatie.

Tabel 7.8 geeft een overzicht van de gemiddelde, minimum en maximum SI waarden per cytokine in functie van de blootstellingconcentratie van de partikels. Figuur 7.18 geeft een grafische voorstelling van de cytokineproductie per locatie.

Voor TNF- α en il-8 (A549) werd de SI na blootstelling van de cellen aan 200 μ g TSP/ml gebruikt in de verdere statistische analyses (dagvariaties, relatie tot endotoxine en meteorologische parameters). Omdat het cytotoxische effect van de partikels in de Beas-2B cellen veel sterker is, wordt in de verdere statistische analyses gewerkt met de SI van il-6 en il-8 na blootstelling aan 25 μ g TSP/ml. Bij deze concentratie is de gemiddelde leefbaarheid van de cellen 84%. Dit percentage is vergelijkbaar met de leefbaarheid van de cellen (82%) na blootstelling van THP-1 cellen aan 200 μ g TSP/ml. Op deze manier wordt uitgesloten dat de waargenomen effecten te wijten zijn aan het cytotoxische karakter van de partikels.

Alhoewel de gemiddelde cytokineproductie (TNF- α en il-6 en il-8 (Beas-2B)) onderscheid maakt tussen de regio's is het ook duidelijk dat de er op bepaalde monsternamen dagen grote verschillen zijn tussen de locaties (zie vergelijk maximum waarden in Tabel 7.8 en Figuur 7.19). Voor de 3 locaties werden er significante verschillen in de cytokineproductie (TNF- α en il-6 en il-8 (Beas-2B)) gevonden in functie van de bemonsteringsdag (Factorial ANOVA, $p<0.05$).

Uit Figuur 7.19 is af te leiden dat partikels verzameld na 20/4/07 meer aanleiding geven tot de productie van inflammatoire cytokines (met uitzondering van il-8 door A549).

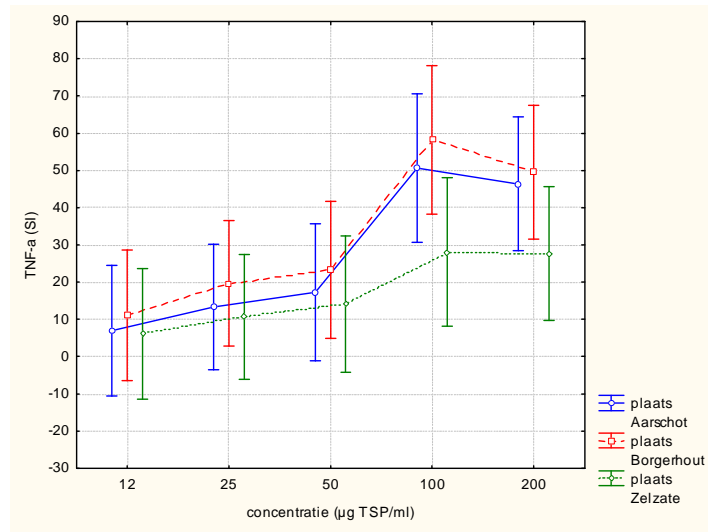
De productie van inflammatoire cytokines werd vergeleken tussen de 4 seizoenen. In de lente en de zomer was de TNF- α productie significant verhoogd t.o.v. de herfst en de winter (ANOVA, Tukey, $p<0.01$). Er konden geen significante verschillen aangetoond worden tussen de seizoenen voor il-8 productie door A549 en Beas-2B cellen noch voor il-6 inductie (ANOVA, $p>0.05$).

Tabel 7.8: Cytokineproductie (SI t.o.v. controle) na blootstelling van partikels uit verschillende locaties. (gemiddelde \pm SD, tussen haakjes min. en max. waarden)

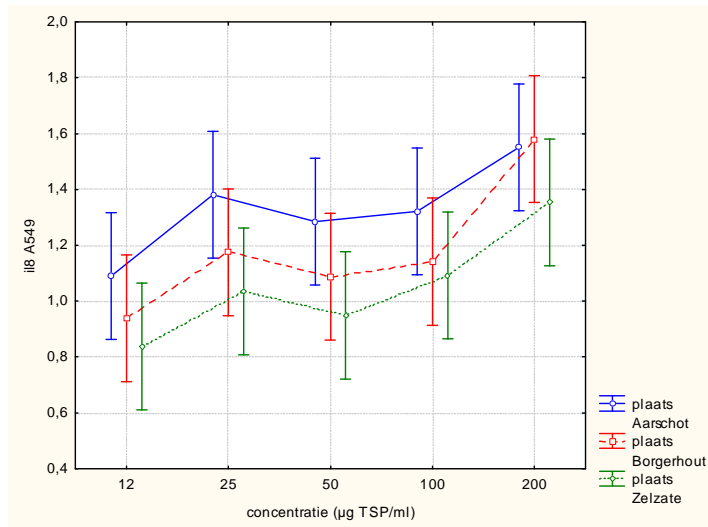
	$\mu\text{g TSP/ml}$						
	N*	0	12,5	25	50	100	200
TNF-α productie door THP-1 cellen							
Aarschot	24	1	7.59 \pm 5.3 (0.1-19)	10.3 \pm 8.7 (1.6-35.6)	19.2 \pm 17.3 (2.2-60.6)	29.9 \pm 29.9 (2.5-103.5)	40.4 \pm 44.3 (4.5-149.9)
Borgerhout	28	1	11,4 \pm 20.9 (0.7-83.6)	21,0 \pm 39.3 (1.5-149.3)	31,1 \pm 50.9 (2.0-231.9)	42,5 \pm 61.0 (2.7-260.2)	50,0 \pm 60.5 (4.6-258.0)
Zelzate	31	1	5,9 \pm 6.2 (0.3-25.0)	11,4 \pm 12.0 (0.3-53.8)	20,6 \pm 22.5 (2.3-104.8)	33,2 \pm 32.6 (2.7-137.8)	40,5 \pm 39.3 (3.8-161.7)
Il-8 productie door A549 cellen							
Aarschot	28	1	1,1 \pm 0.6 (0.2-3.8)	1,3 \pm 0.8 (0.4-4.2)	1,2 \pm 0.6 (0.4-3.9)	1,3 \pm 0.6 (0.3-2.9)	1,5 \pm 0.7 (0.2-3.6)
Borgerhout	28	1	1,0 \pm 0.3 (0.2-1.5)	1,2 \pm 0.7 (0.6-3.9)	1,1 \pm 0.3 (0.5-1.8)	1,2 \pm 0.3 (0.5-2.1)	1,6 \pm 0.9 (0.7-5.4)
Zelzate	31	1	0,8 \pm 0.3 (0.1-1.2)	1,0 \pm 0.6 (0-3.1)	1,0 \pm 0.3 (0.1-1.8)	1,1 \pm 0.4 (0.1-1.9)	1,4 \pm 0.6 (0.1-2.5)
Il-8 productie door Beas-2B cellen							
Aarschot	28	1	1,2 \pm 0.5 (0.6-2.5)	1,5 \pm 0.8 (0.7-3.7)	1,7 \pm 1.2 (0.5-4.9)	2,0 \pm 1.9 (0.5-1.9)	1,9 \pm 1.9 (0.3-7.7)
Borgerhout	28	1	3,3 \pm 9.0 (0.8-48.8)	4,7 \pm 12.8 (0.9-66.4)	5,2 \pm 13.6 (0.2-64.7)	6,2 \pm 15.7 (0.7-64.7)	5,5 \pm 14.0 (0.5-57.2)
Zelzate	32		1,4 \pm 1.7 (0.7-10.5)	1,7 \pm 1.9 (0.6-11.4)	1,9 \pm 1.7 (0.8-9.8)	2,2 \pm 2.0 (0.5-10.2)	2,1 \pm 1.9 (0.4-9.8)
Il-8 productie door Beas-2B cellen							
Aarschot	24	1	1,7 \pm 1.0 (0.9-4.0)	2,1 \pm 1.3 (0.9-5.8)	2,5 \pm 1.9 (0.8-7.1)	2,9 \pm 2.4 (0.5-9.9)	3,6 \pm 3.2 (0.9- 15.3)
Borgerhout	27	1	6,4 \pm 20.5 (0.7-107.8)	8,8 \pm 28.6 (0.8-149.6)	9,1 \pm 27.1 (0.7-140.3)	11,2 \pm 32.5 (0.9-165.2)	8,8 \pm 22.1 (0.5-107.0)
Zelzate	32	1	2,2 \pm 5.3 (0.6-31.2)	2,8 \pm 6.9 (0.5-40.1)	3,1 \pm 7.1 (0.8-41.6)	3,8 \pm 8.9 (0.9-51.9)	5,6 \pm 16.9 (0.7-95.6)

*N: aantal geteste filters

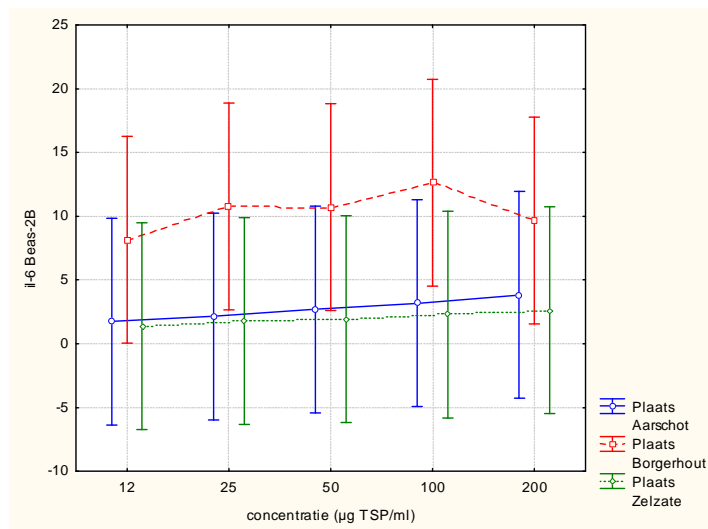
A)



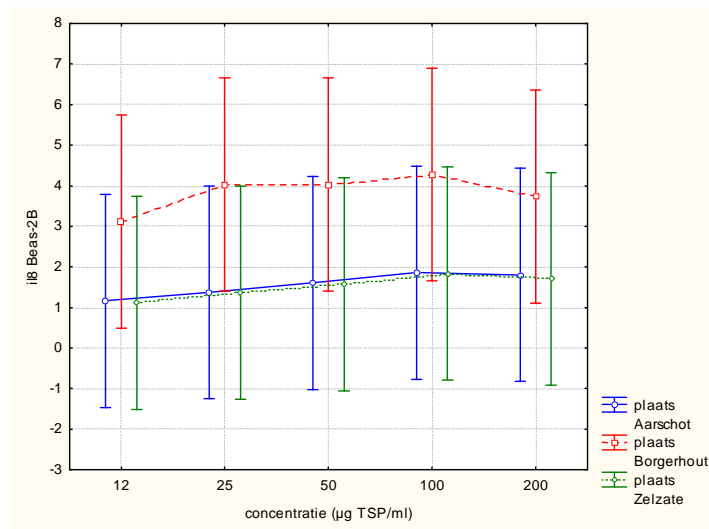
B)



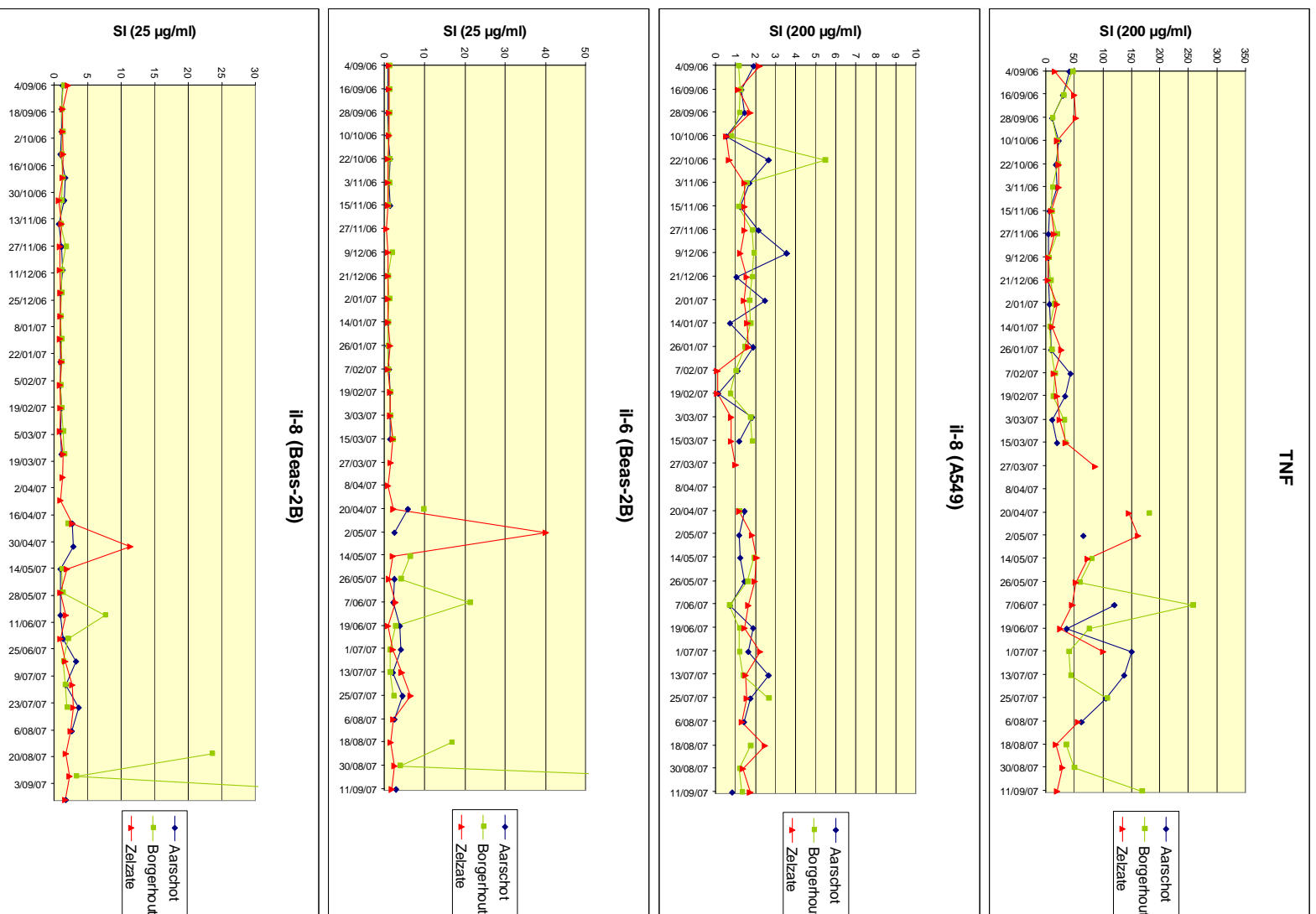
C)



D)



Figuur 7.18: Dosisrespons relatie van de cytokineproductie (A:TNF- α , B:il-8 in A549; C:il-6 in Beas-2B; D:il-8 in Beas-2B) na blootstelling aan partikels van verschillende locaties (punten zijn gemiddelde SI \pm 95% CL van de verschillende monsternamen dagen).



Figuur 7.19: Variatie in de cytokine-inductie (SI) voor de verschillende locaties in functie van de monstername dag.

Voor een beperkt aantal stalen kan een deel van de cytokineproductie verklaard worden door de aanwezigheid van endotoxines. Eerder werd aangetoond dat vanaf een concentratie van 1.6 U/ml endotoxine een significante toename van de hoeveelheid TNF- α kan worden waargenomen. Echter bij de hoogst geteste concentratie endotoxine (12.7 U/ml) in deze experimenten werd voor TNF- α een

SI=1.6 genoteerd. De endotoxine waarde werd echter nooit gemeten in de filters. De hoogst gemeten endotoxineconcentratie in de partikels bedroeg 2.23 U/ml. Een endotoxineconcentratie van ≥ 1.6 U/ml werd gemeten voor alle locaties op 20/4/07, voor Borgerhout op 7/6/07 en voor Zelzate op 6/8/07 en 2/5/07. Op deze dagen was de TNF- α productie sterk verhoogd.

Een significant positieve correlatie kon aangetoond worden tussen de hoeveelheid endotoxine in de stalen en de gemeten productie van TNF- α door THP-1 (regressie analyse).

TNF- α	r = 0.813	p < 0.001
IL-8(A549)	r = -0.1	p = 0.360
Il-6 (Beas-2B)	r = 0.119	P = 0.284
Il-8 (Beas-2B)	r = 0.064	P = 0.617

De resultaten van il-8 in A549 kunnen vergeleken worden met een vroegere VMM meetcampagne in Vlaanderen (Schoeters et al., 2001). In deze laatste studie werd in het voorjaar (mei en juni) een significant verhoogde il-8 productie waargenomen na blootstelling aan partikels afkomstig van Essen (landelijk), Zwijndrecht (industriële), Berendrecht (industriële) en Deurne (stedelijk). Deze seizoenstendens wordt in de huidige studie niet bevestigd voor il-8 in A549 maar werd wel waargenomen voor de andere cytokines. Voor de VMM studie werd gesuggereerd dat de effecten op il-8 productie te wijten zijn aan partikels afkomstig van sites met een industriële invloed. De resultaten van deze pilotstudie wijzen op een verhoogd immunotoxisch effect in de stalen afkomstig van het stedelijke gebied Borgerhout.

7.1.5.2 Invloed van klimatologische omstandigheden

Er werd nagegaan of er een relatie kon aangetoond worden tussen de cytokineproductie en meteo gegevens (neerslag, temperatuur, windrichting, windsnelheid). De resultaten van een vroegere studie gaven aanwijzingen dat de weersomstandigheden een belangrijk rol spelen bij de inductie van immunologische effecten door partikels (Schoeters *et al.*, 2001). De inflammatoire effecten (il-8 productie) traden vooral op bij droog en warm weer;

Een significant positieve correlatie kon aangetoond worden tussen temperatuur en TNF- α ($r=0.576$), il-6 ($r=0.402$) en il-8 (Beas-2B) ($r=0.533$) productie (Spearman rank correlatie, $p < 0.05$). Voor il-8 productie in A549 werd een significante correlatie aangetoond met de windsnelheid ($r=0.351$).

Er konden geen correlaties aangetoond tussen de geïnduceerde cytokineproductie en de herkomst van de luchtmassa's (via backward trajectories) (Spearman rank correlatie).

7.2 Relatie van de gemeten eindpunten tot pollutie

Zwevend stof is een algemene verzamelnaam voor fijne deeltjes met uiteenlopende samenstelling en afmetingen. De deeltjes zijn zo klein dat ze ingeademd kunnen worden. Door de grote verscheidenheid in aard en samenstelling wordt zwevend stof beschouwd als drager of container van een reeks toxische componenten (chemisch en fysisch).

De verschillende fysische (massa, aantal, grootte) en chemische factoren hebben ieder hun bijdrage tot de verschillende gezondheidseffecten die worden aangetoond.

Stof bestaat uit een organische en een anorganische fractie. In de koolstoffractie onderscheidt men elementair koolstof (anorganisch) en organische koolstof. Elementaire koolstof behoort tot het primaire stof, en bestaat uit ultrafijne grafietdeeltjes. Bij onvolledige verbranding van fossiele brandstoffen geeft dit elementaire koolstof aanleiding tot grijze of zwarte rook. Zwarte rook is fijn stof van roetdeeltjes en is even ongezond als andere vormen van fijn stof. De organische koolstoffractie van zwevend stof wordt gevormd door primaire emissies van organische stoffen en door condensatie van vluchtige organische stoffen. Roet wordt gevormd door het samenvoegen van die elementaire koolstofdeeltjes en koolstofwaterstof verbindingen, en bevat onder meer poly-aromatische koolwaterstoffen (PAKs). Organische componenten vormen een belangrijke fractie van de totale aërosolmassa. Hoofdbronnen van PAKs zijn emissies van motorvoertuigen, houtverbranding, cokesovens, aluminiumproductie, woningverwarming, energieproductie en afvalverbranding.

Daarnaast bevat stof ook anorganisch materiaal. Hierin zitten de ionen zoals SO_4^{-2} , NO_3^- , NH_4^+ , Na^+ , Cl^- en K^+ , de zware metalen met als belangrijkste Pb, Cd, Cr, Ni, Zn, Mn, V, en elementen zoals Ca, Si, Fe, Ti, Al. In totaal kan men tot meer dan 40 verschillende elementen in roetstof terugvinden. Tot slot bevat stof nog resten van banden, remmen, opwaaiend stof, zeezouten, pollen, schimmels en sporen. De zware metalen in zwevend stof zijn voornamelijk van antropogene oorsprong zoals verbranding van fossiele brandstoffen (olie, kolen, hout enz.), afvalverbranding en metaalverwerkende industrie. Steenkoolverbranding wordt gecorreleerd aan de aanwezigheid van S en Se, olieverbranding aan de aanwezigheid van Ni en V, opwaaiend stof aan Al, Ca, Fe, K, Si en Ti en een verbrandingsoven aan Pb en Zn.

Tabel 7.9 geeft een overzicht van de verschillende chemische factoren en de gezondheidseffecten die ze kunnen veroorzaken. Al gedurende vele jaren wordt onderzoek verricht naar de factoren van het fijn stof mengsel die verantwoordelijk kunnen zijn voor de geobserveerde gezondheidseffecten en via welk mechanisme de deeltjes in staat zijn om gezondheidseffecten te veroorzaken. In deze paragraaf wordt aandacht besteed aan de specifieke bijdragen van pollutanten tot de gemeten toxiciteit in de biotesten uitgevoerd in het kader van deze pilootstudie. Daarvoor werden resultaten van de toxiciteitstesten vergeleken met de chemische meetresultaten van meetposten die stalen nemen op dezelfde locaties en tijdstippen. Op deze manier kan de complementariteit van chemische en toxicologische testresultaten beoordeeld worden en kunnen prioriteiten gelegd worden voor een verdere brongerichte aanpak.

Tabel 7.9: Verschillende chemische aspecten van fijn stof die een rol kunnen spelen in de toxicologische verklaring van effecten

Chemische groep	Belangrijkste component	Biologisch effect
Transitiemetalen	Fe, V, Cu, Zn, Ni	Inflammatie, DNA-breuken
Organische componenten	PAKs, OC	Inflammatie, DNA-breuken, irritatie
Sulfaten en nitraten	SO ₄ ⁻ , NO ₃ ⁻ ,	Permeabiliteit van het luchtwegepitheel, wijziging longfunctie (astma)
Biologische componenten	Pollen, bacteriën, sporen	Inflammatie, irritatie

De resultaten van de chemische metingen worden hier niet besproken daar ze geen deel uitmaken van deze studie. De gemeten concentraties werden door VMM ter beschikking gesteld om een verdere interpretatie van de bioassay resultaten toe te laten.

Volgende chemische meetresultaten waren beschikbaar:

- PM10 (µg/m³) (daggemiddelde)
- PAKs (ng/m³) (fluorantheen, pyreen, benzo(a)anthraceen*, chryseen*, benzo(b)fluorantheen*, benzo(k)fluorantheen*, benzo(e)pyreen, benzo(a)pyreen*, dibenzo(a,h)anthraceen*, benzo(ghi)peryleen*, indeno(1,2,3-cd)pyreen*) (*: carcinogene PAKs volgens IARC (International Agency for Research on Cancer) classificatie)
- Elementen (Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Rh, Pd, Cd, Pt, Pb, Se)(ng/filter)
- Elementair(EC) & organisch koolstof (OC) (µg/m³) Het elementair koolstof (EC) kan beschouwd worden als black carbon of “roet”. OC is een directe maat voor het organisch materiaal.

De bemonstering- en analysemethode voor PAK-bepaling in lucht waarvan de data in deze pilootstudie gebruikt werden is niet dezelfde als deze die gebruikt wordt in het VMM-meetnet organische metingen. De gevolgde methode is monsterneming op een absorptiebuisje (PDMS/Tenax) bij laag debiet (150 ml/min) waardoor zowel de vluchtige fractie als de deeltjesfractie bemonsterd wordt. Gezien het zeer laag aanzuigdebiet (150 ml/min i.p.v. 1000 l/min bij high volume sampling) mag aangenomen worden dat de bemonsterde deeltjes dicht bij PM10 liggen. De bemonsterde componenten worden vrijgesteld door thermische desorptie en rechtstreeks geïnjecteerd op een GC-MS. De GC-MS analyse gebeurt in de SIM-mode (detectie met selective ion monitoring). Gebruikte apparatuur: Markes UNITY thermal desorber met ULTRA autosampler gekoppeld aan een Agilent 6890/5973 GC-MS. Met de vluchtige PAKs wordt in de verdere statistische analyses geen rekening gehouden.

De PM10 metingen evenals de elementanalyses en de elementaire en organische koolstof (EC en OC) metingen werden uitgevoerd in het kader van een VMM project met als doel de (chemische) karakterisatie van fijn stof (PM10). In tegenstelling tot het huidige project (TSP bemonstering) werd er specifiek voor PM10 bemonsterd op kwartfilters. De chemische analyses (elementen en OC en EC) zijn dan ook geldig voor de PM10 fractie. De toxicologische eindpunten zijn gemeten op de totale

inadembare fractie van het zwevend stof (TSP). De verhouding PM10/TSP kan sterk variëren van dag tot dag en tussen locaties. In de literatuur worden ratio's weergegeven die variëren tussen 0.104 en 0.914 met een jaargemiddelde van 0.495 (Cicero-Fernandez *et al.*, 1993). Gelijkaardige bevindingen werden gerapporteerd door (Brook *et al.*, 1997) waarbij PM10 verantwoordelijk is voor 44% van de TSP fractie. In een studie uitgevoerd door (Mugica *et al.*, 2002) varieerde de gemiddelde (79 gepaarde metingen) PM10-bijdrage tot de totale hoeveelheid zwevend stof (TSP) tussen 29% en 41% afhankelijk van de meetplaats. In een Chinese studie was 60-70% van TSP toe te schrijven aan PM10 (Zhang *et al.*, 2002). Berico *et al.* (1997) stelde vast dat de gemiddelde TSP concentratie slecht 20% hoger is dan de PM10 waarden. In deze studie werden geen TSP/m³ metingen uitgevoerd. Alleen de massa verzamelde partikels (TSP) na methanolextractie van 1/4 van de bemonsterde filter werd bepaald in functie van de blootstellingsexperimenten.

7.2.1 Salmonella mutageniciteitstest (Ames)

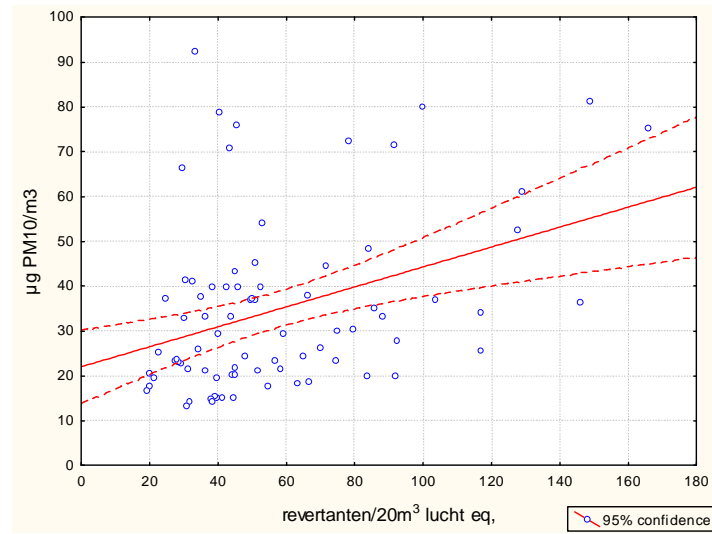
Bij blootstelling aan een dagequivalent van 20m³ lucht equivalent kan de gemeten biologische respons afhankelijk zijn van zowel de hoeveelheid particulier materiaal per m³ lucht als van de aard van de chemische belading van de partikels.

De totale hoeveelheid gecollecteerd zwevend stof is belangrijk voor de intensiteit van de mutagene respons die wordt opgewekt. Een significante positieve correlatie kon aangetoond worden tussen de directe ($r=0.38$, $p<0.05$) en indirecte ($r=0.46$, $p<0.05$) mutageniciteit en de concentratie PM10/m³ (regressie analyse) (Figuur 7.20).

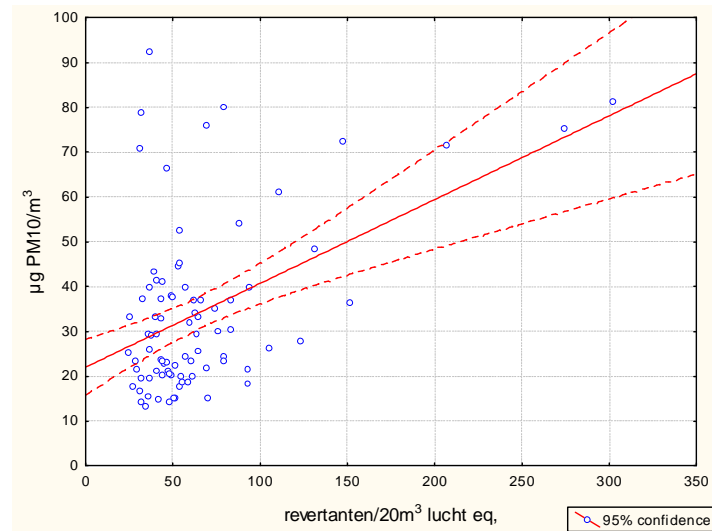
Niet enkel de hoeveelheid fijn stof is de bepalende factor voor het opwekken van de mutagene respons, ook de chemische samenstelling van de partikels is belangrijk. In Figuur 7.21 is duidelijk te zien dat op sommige dagen hoge mutagene activiteit (revertanten/20m³ lucht eq.) werd waargenomen in stalen met een lage concentratie van PM10/m³.

Op dagen met een overschrijding van het daggemiddelde fijn stof (PM10) (concentratie hoger dan 50 µg/m³) werden vaak ook een hogere mutagene activiteit teruggevonden in de extracten. Er zijn echter ook dagen met een overschrijding van de grenswaarden waarop de mutagene activiteit niet sterk verhoogd is. Dit wijst erop dat niet alleen de massa stofdeeltjes belangrijk zijn maar ook de belading. Tabel 7.10 geeft een overzicht van de top 20 dagen waarop de hoogste mutageniciteit werd gedetecteerd samen met de gemeten PM10 concentratie op die dagen.

A.



B.



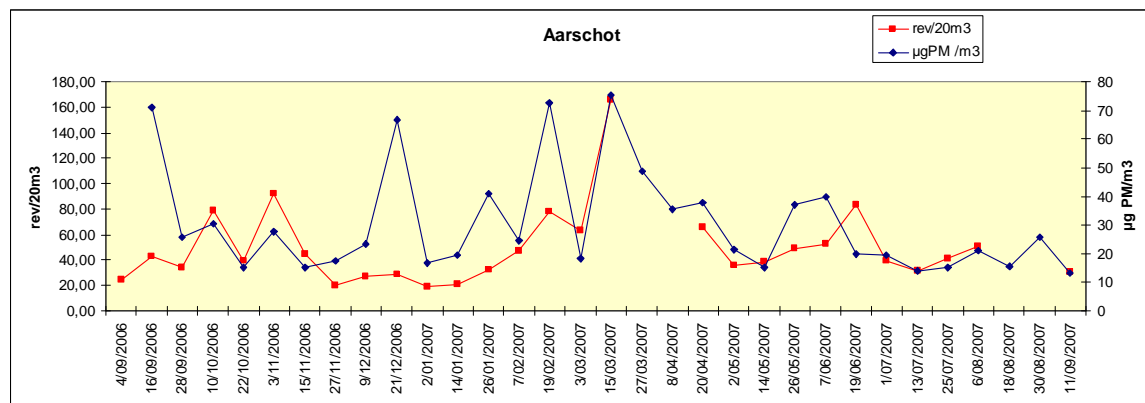
Figuur 7.20: Relatie tussen (A) directe en (B) indirecte mutageniteit en concentratie PM10.

Tabel 7.10: Overzicht van dagen gerangschikt volgens gemeten mutagene activiteit en de PM10 concentratie op die dagen.

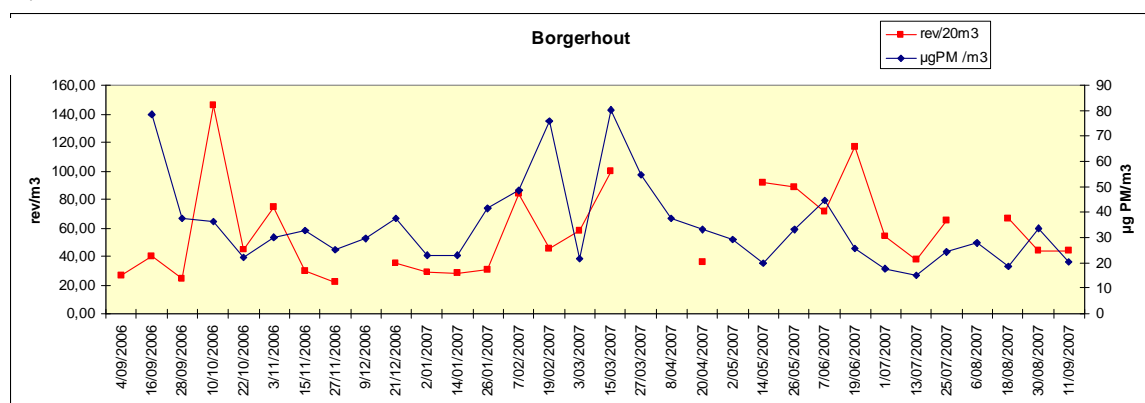
Aarschot			Borgerhout			Zelzate		
Datum	PM10 µg/m ³	rev/ 20m ³	Datum	PM10 µg/m ³	rev/ 20m ³	Datum	PM10 in µg/m ³	rev/ 20m ³
15/03/2007	79,811	440,0	10/10/2006	38,814	296,8	15/03/2007	81,286	451,3
19/02/2007	74,088	225,6	7/02/2007	51,560	214,7	19/02/2007	71,676	298,3
3/11/2006	29,721	215,0	19/06/2007	29,028	181,3	27/03/2007	61,010	240,0
10/10/2006	31,196	162,3	15/03/2007	85,041	178,7	7/06/2007	52,576	181,7
3/03/2007	17,631	156,0	26/05/2007	36,564	152,6	14/05/2007	34,328	179,0
19/06/2007	21,993	138,4	14/05/2007	20,930	152,4	3/03/2007	26,410	175,0
26/05/2007	39,135	132,0	3/03/2007	25,272	151,0	26/05/2007	37,020	165,4
7/02/2007	26,546	126,4	3/11/2006	31,451	150,3	10/10/2006	35,180	160,0
15/11/2006	17,770	115,0	7/06/2007	51,342	124,0	3/11/2006	23,354	153,3
20/04/2007	39,561	114,7	18/08/2007	20,743	122,3	7/02/2007	54,282	141,3
7/06/2007	43,777	109,6	25/07/2007	26,369	122,0	26/01/2007	39,906	139,7
6/08/2007	24,587	98,7	19/02/2007	79,338	114,6	22/10/2006	29,358	122,3
25/07/2007	17,803	91,3	22/10/2006	17,226	114,3	15/11/2006	36,902	116,5
22/10/2006	14,593	90,7	1/07/2007	16,286	107,7	19/06/2007	23,576	116,3
13/07/2007	14,303	80,0	11/09/2007	22,515	92,7	28/09/2006	45,411	104,0
2/05/2007	26,011	77,3	21/12/2006	40,388	85,0	21/12/2006	37,502	93,0
1/07/2007	13,350	76,7	30/08/2007	36,213	83,7	27/11/2006	20,247	88,7
26/01/2007	42,763	76,0	13/07/2007	18,090	79,0	8/04/2007	43,523	83,7
21/12/2006	50,335	75,3	14/01/2007	25,675	75,0	9/12/2006	29,463	80,0
14/05/2007	16,026	75,0	2/01/2007	23,826	73,7	20/04/2007	40,006	79,0
16/09/2006	73,499	74,3	15/11/2006	27,148	73,0	14/01/2007	23,898	71,0
28/09/2006	30,252	71,0	16/09/2006	86,120	72,0	16/09/2006	92,500	70,3
11/09/2007	17,223	64,7	26/01/2007	44,288	70,6	1/07/2007	14,339	70,0

Er werd nagegaan of de gemeten mutagene activiteit kan verklaard worden door de chemische samenstelling van de partikels. De resultaten worden weergegeven in Tabel 7.11. De gemeten mutagene activiteit (direct en indirect) van de filterextracten kon niet gerelateerd worden aan het totale PAK-gehalte of aan de som carcinogene PAKs). Een significant positieve correlatie werd wel gevonden tussen de totale mutageniciteit en fluorantheen ($r=0.277$, $p<0.05$) en pyreen ($r=0.227$, $p<0.05$). Beide pollutanten zijn niet-carcinogene PAKs. Een significant positieve correlatie daarentegen kon ook aangetoond worden tussen de hoeveelheid organische koolstof in de PM10 fractie en de directe ($r=0.32$, $p=0.004$) en indirecte ($r=0.89$, $p=0.008$) mutagene activiteit.

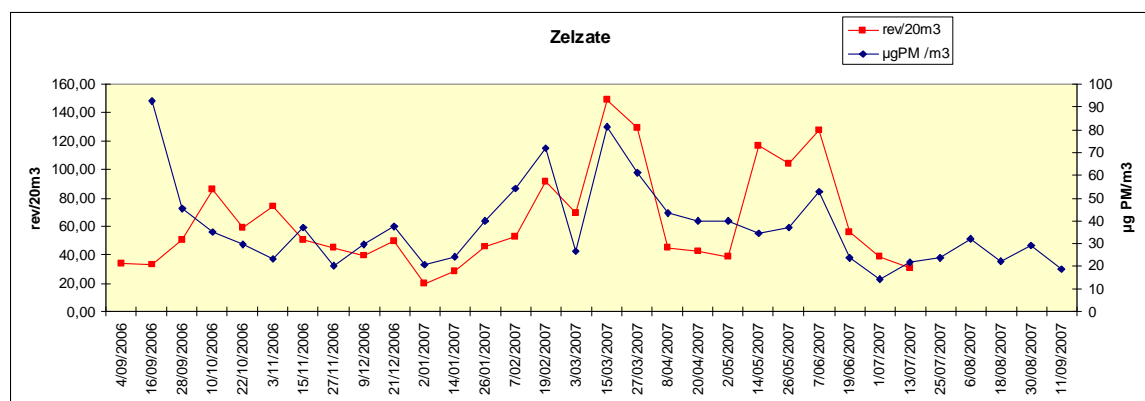
A.



B.



C.



Figuur 7.21: Mutagene activiteit per filter versus concentratie PM10 per filter (A:Aarschot, B:Borgerhout, C:Zelzate).

Als tweede benadering werd er getracht om de relatieve potenties van de verschillende PAKs ten opzichte van benzo-a-pyreen (B(a)P) mee in rekening te brengen. BaP is de meest toxische, mutagene en kankerverwekkende PAK. De 16 meest toxische PAKs worden vergeleken tot BaP. Dit wordt uitgedrukt via een Toxische Equivalentie Factor (TEF) of de relatieve carcinogene potentie van de individuele PAKs ten opzichte van BaP. Aan BaP wordt een TEF=1 toegekend. De gemeten hoeveelheden van de verschillende PAKs worden vermenigvuldigd met hun TEF factoren. De som van deze gegevens geeft een indruk van de totale carcinogene potentie. Daar verschillende auteurs verschillende TEF waarden weergeven werden de minimale en maximale waarden uit literatuur gebruikt. De individuele concentraties werden vervolgens vermenigvuldigd met of minimale (min TEF) of

maximale (max TEF) TEF waarden en als som gecorreleerd met de direct, indirecte en totale mutageniciteit van de filterextracten. Er werden geen significante correlaties gevonden (Spearman rank correlatie, $p < 0.05$).

Tabel 7.11: Correlatie tussen mutagene respons en pollutanten. (Spearman rank correlatie, r =correlatiecoëfficiënt)

	Rev/20m ³ -S9		Rev/20m ³ +S9	
	r	p-waarde	r	p-waarde
Som PAKs	0.057	0.619	0.178	0.108
Som carcinogene PAKs	0.064	0.592	0.167	0.148
Organische koolstof	0.320	0.004	0.287	0.008

Er zijn geen directe parallellen tussen het meten van een beperkte set van chemische parameters (PAKs) en de biologische meting. Biologische effectmetingen reageren op het mengsel van alle aanwezige stoffen samen, hierbij kunnen interacties tussen stoffen optreden, er wordt ook rechtstreeks rekening gehouden met biobeschikbaarheid. Dat er buiten de PAKs nog andere organische stoffen met een mutagene potentie aanwezig zijn op de filter bewijst de positieve significante correlatie van de directe en indirecte mutageniciteit met de hoeveelheid organische koolstof. In de literatuur zijn er meerdere studies gepubliceerd waarin de gemeten mutagene respons in de Ames test niet of slechts gedeeltelijk kon verklaard worden door PAKs (Du Four *et al.*, 2004; Brits *et al.*, 2004; Claxton *et al.*, 2004).

7.2.2 Cat-tox

Via het VMM-meetnet werden resultaten verkregen voor verschillende pollutanten zoals polyaromatische koolwaterstoffen (PAKs), de meest voorkomende metalen, PM10, OC, EC en TC. Voor de metalen werden geen correlatie analyses uitgevoerd, vermits de ASE extractieprocedure metalen niet opneemt.

7.2.2.1 PAKs

Niet-parametrische Spearman's rank correlaties werden gebruikt om de relaties tussen genexpressie bij de hoogste blootstellingsconcentratie en tevens ook de hoogste fold inductie en de niet-vluchtige PAKs te onderzoeken (Tabel 7.12 en Tabel 7.13). Het piekstaal in Zelzate werd niet meegerekend in deze dataset. Expressiedata van Hsp70, NfKbre en p53 vertoonden geen variatie over de ganse dataset en werden dan ook uitgesloten uit verdere analyse.

Tabel 7.12: Individuele Spearman's rank correlaties tussen genen en de individuele PAKs data. R-waarden worden weergegeven, vetgedrukte zijn significant ($p < 0.05$).

	fluorantheen	pyreen	benzo(a)anthraceen	chryseen	benzo(b)fluorantheen	benzo(k)fluorantheen	benzo(e)pyreen	benzo(a)pyreen	dibenzo(a,h)anthraceen	benzo(ghi)peryleen	indeno(1,2,3-cd)pyreen
Cyp1A1	0.358	0.442	0.431	0.482	0.311	0.114	0.420	0.136	0.071	0.416	0.434
GstYa	-0.339	-0.285	0.034	-0.042	-0.070	-0.026	0.108	0.082	0.252	0.385	0.004
Xre	-0.447	-0.381	-0.141	-0.239	-0.098	-0.141	-0.271	-0.135	0.097	0.222	0.047
Hmtiia	-0.332	-0.405	0.021	-0.092	-0.097	-0.057	0.059	0.024	0.425	0.204	0.095
Fos	0.168	0.183	0.464	0.386	0.434	0.354	0.358	0.271	-0.291	0.019	0.022
Cre	-0.099	-0.020	0.179	0.219	0.219	0.298	0.298	0.299	0.179	0.060	0.020
Rare	-0.141	0.083	0.002	0.116	0.083	0.004	0.002	0.068	0.273	0.211	0.484
Gadd153	0.156	-0.020	-0.205	-0.235	-0.169	0.051	-0.263	-0.147	0.023	-0.205	-0.229
Gadd45	0.312	0.389	0.272	0.359	0.313	0.080	0.166	0.032	-0.397	-0.010	0.144
Grp78	-0.237	-0.238	-0.123	-0.187	-0.235	-0.394	-0.027	-0.188	0.280	0.250	0.129

Om statistische redenen zoals reeds eerder vermeld werd het piekstaal van Zelzate weggelaten. Vermits we deze effecten wel degelijk gemeten hebben werd er gekeken naar de invloed op de correlaties indien dit staal wel wordt meegenomen in de PAKs analyses. Indien we het piekstaal van Zelzate wel meerekenen voor de correlaties, zien we voornamelijk bij CYP1A1 meerdere PAKs positief gecorreleerd (B(a)A, chryseen, BeP, IcdP). Gezien de p waarden voor de correlaties zonder dit piekstaal reeds rond de 0.05 lagen is het toch een meerwaarde om de bijkomende correlaties te vermelden.

Het relatief lage aantal individuele PAKs die gecorreleerd kunnen worden met de gemeten genexpressie-activiteit was enigszins verwacht, gezien de complexe mengsels die de filterextracten vormen.

In literatuur betreffende de effecten van luchtvervuiling op de humane gezondheid, worden 8 PAKs (benzo(a)anthraceen, chryseen, benzo(b)fluorantheen, benzo(k)fluorantheen, benzo(a)pyreen, dibenzo(a,h)anthraceen, benzo(ghi)peryleen, indeno(1,2,3-cd)pyreen) van de gemeten koolwaterstoffen vaak gegroepeerd als de carcinogene PAKs (c-PAKs) (Talioli *et al.*, 2007); (Sevastyanova *et al.*, 2008). De gesommeerde concentraties van deze groep PAKs werd in het verleden meermaals gebruikt voor analyse van PAKs-geïnduceerde effecten. Als bemerking dient hier wel vermeld te worden dat bij het sommeren van concentraties geen rekening wordt gehouden met het feit dat de individuele waarden niet in dezelfde grootteorde liggen. Als tweede benadering werd er getracht om de relatieve potenties van de verschillende PAKs ten opzichte van B(a)p (TEF = 1) mee in rekening te brengen. Aangezien er nog geen absolute TEF waarden bestaan voor de verschillende PAKs werden de minimale en maximale waarden uit literatuur gebruikt (Cornelis *et al.*, 2006). De individuele concentraties werden vervolgens vermenigvuldigd met of minimale (min TEF) of maximale (max TEF) TEF waarden en als som gecorreleerd met de individuele genen

Tabel 7.13).

Tabel 7.13: Spearman's Rank correlaties tussen individuele genen en de gesommeerde PAKs. R-waarden worden weergegeven, vetgedrukte r-waarden zijn significant ($p < 0.05$).

	Tot.PAKs	c-PAKs	nc-PAKs	Max TEF	Min TEF
Cyp1A1	0.455	0.391	0.341	0.259	0.220
GstYa	-0.134	0.034	-0.317	0.038	-0.048
Xre	-0.424	-0.228	-0.254	-0.145	-0.260
Hmtiia	-0.146	0.110	-0.210	0.265	0.234
Fos	0.236	0.325	0.179	-0.031	0.103
Cre	0.219	0.298	-0.219	0.179	0.298
Rare	0.159	0.186	-0.279	0.161	0.083
Gadd153	-0.108	-0.205	0.205	-0.147	-0.175
Gadd45	0.248	0.190	0.321	-0.131	-0.072
Grp78	-0.169	-0.082	-0.276	0.142	0.025

Tot.PAKs: som van alle gemeten niet-vluchtige PAKs; c-PAKs: som van de gemeten niet-vluchtige carcinogene PAKs; nc-PAKs: som van de gemeten niet-vluchtige niet-carcinogene PAKs.

Er werd enkel een sterke correlatie gevonden tussen Cyp1A1 en totale PAKs. Dit is te verwachten, aangezien Cyp1A1 de meest beschreven merker is voor PAKs. Voor de TEF gecorrigeerde sommaties werden geen correlaties gevonden. De grote variatie in de minimale en maximale TEF-waarden (tot factor 1000 verschil) bemoeilijkt het vinden van accurate correlaties.

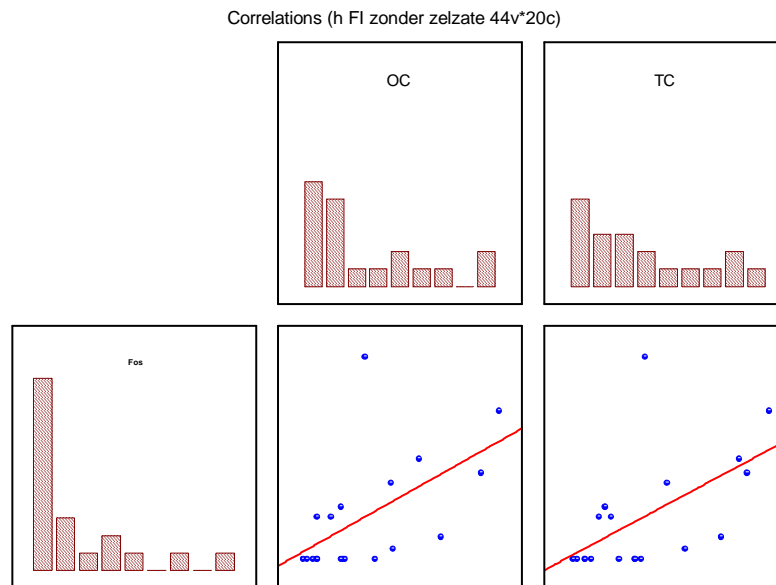
7.2.2.2 *PM10, OC, EC en TC*

Naast de PAKs zijn er ook nog een aantal belangrijke andere maatstaven om de luchtkwaliteit chemisch te evalueren zoals PM (particulair materiaal), OC (organische koolstof) en EC (elementaire koolstof). Volgende correlaties moeten wel met enige voorzichtigheid bekeken worden, aangezien geen Cat-tox-metingen werden gedaan met particulier materiaal. Het kan ons echter wel een indicatie opleveren voor algemene relatie tussen Cat-tox data en luchtverontreiniging.

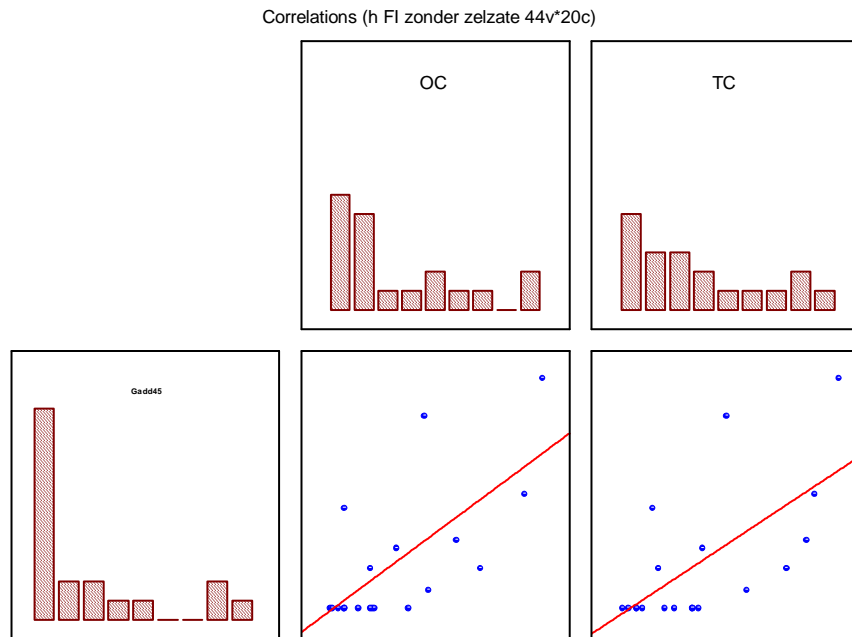
De Spearman correlaties tonen duidelijk aan dat er een aantal significante positieve correlaties zijn tussen enerzijds OC en het DNA-schade gerelateerde gen Fos en tussen OC en EC en DNA-schade merker Gadd45 (Tabel 7.14, Figuur 7.22 en Figuur 7.23). Het elementair koolstof (EC) kan beschouwd worden als black carbon of dus "roet". OC is een directe maat voor het organisch materiaal (OM) (Louie *et al.*, 2005).

Tabel 7.14: Enkelvoudige Spearman rangorde correlaties, r-waarden worden weergegeven. Vetgedrukte r-waarden zijn significant ($p < 0.05$).

	OC	EC	PM10
Cyp1A1	0.437	0.257	0.525
GstYa	-0.236	-0.240	-0.246
Xre	-0.068	-0.046	0.060
Hmtia	-0.349	-0.332	-0.170
Fos	0.650	0.450	0.302
Cre	-0.387	-0.215	-0.344
Rare	-0.338	-0.355	-0.207
Gadd153	-0.056	0.132	0.138
Gadd45	0.693	0.470	0.388
Grp78	-0.154	-0.183	0.041

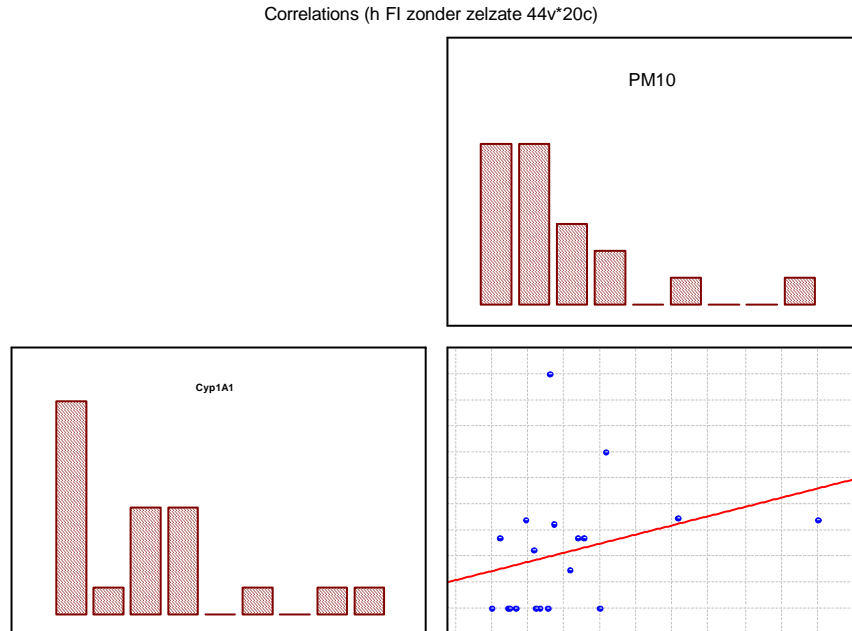


Figuur 7.22: Individuele correlaties tussen OC (x-as linkse figuur), TC (x-as rechtse figuur) en Fos (y-as). Histogrammen met de fold inductie categoriën op de x-as en de frequentie in de y-as.



Figuur 7.23: Individuele correlaties tussen OC (x-as linkse figuur), TC (x-as rechtse figuur) en Gadd 45 (y-as). Histogrammen met de fold inductie categoriën op de x-as en de frequentie in de y-as.

Anderzijds vinden we een positieve correlatie tussen de hoeveelheid PM10 en de inductie van Cyp1A1 (Figuur 7.24).



Figuur 7.24: Spearman rank correlatie tussen PM10 (x-as) en Cyp1A1 (y-as). Histogrammen met de fold inductie categoriën op de x-as en de frequentie op de y-as.

In combinatie met de eerdere bevinding dat Xre-inductie stijgt naarmate de windsnelheid daalt, werd geanalyseerd of PM10 al dan niet negatief correleert met windsnelheid. Hoewel geen significante correlatie ($r=-0.409$; $p=0.13$; $n=15$) gevonden werd, geeft de r-waarde wel een trendindicatie voor de inverse relatie tussen PM10 en windsnelheid. Indien we OC, EC en TC correleren aan windsnelheid zien we voor

allen een duidelijke inverse relatie ($r=-0.563$, $p=0.02$; $r=-0.534$, $p=0.03$ en $r=-0.593$, $p=0.02$, respectievelijk, $n=15$).

Zowel de gevonden correlaties voor Xre, Cyp1A1, Fos en Gadd45 geven een indicatie van hetzelfde fenomeen, nl. hoe lager de windsnelheid, hoe hoger de stofconcentratie in de lucht, en dus ook gecontamineerde stofconcentratie, hoe hoger de inductie van PAKs-specifieke en DNA-schade merkers.

7.2.3 MELN test

Er werd nagegaan of er een verband is tussen de gemeten oestrogene activiteit en beschikbare pollutant gegevens. De statistische evaluatie betreft enkel parameters die betrekking hebben op het organische gedeelte van het geïncubeerde materiaal op de filters vermits uitsluitend analyses op ASE extracten werden uitgevoerd in de MELN test. Om te zien of het gemeten signaal functie is van de hoeveelheid geïncubeerde particulier materiaal werd eveneens vergeleken met de hoeveelheid PM10 (andere collectiemethode) en de hoeveelheid deeltjes TSP geïncubeerde op de filters waarop ASE extractie werd toegepast.

Tabel 7.13 geeft een samenvatting van de resultaten van een Spearman rank test.

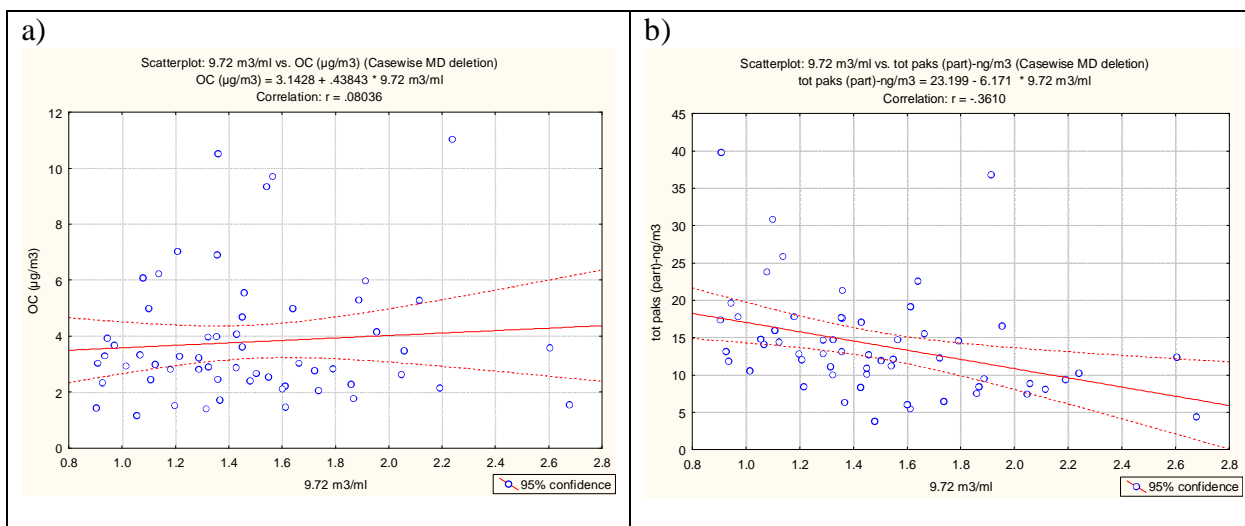
Er werd voor de fractie partikels PM10, of de totale hoeveelheid partikels op de filter (TSP) geen verband gevonden met de gemeten oestrogene activiteit. Ook voor het gehalte aan organisch koolstof (zie Figuur 7.25a), elementair koolstof of totaal koolstof werd geen significant verband gevonden met de hormonale activiteit in de stalen.

Uitzondering zijn de metingen voor totale PAKs (zie Figuur 7.25b), en carcinogene PAKs die een significant negatief verband tonen met de oestrogene activiteit bij blootstelling aan de hoogste testconcentratie ($9.72 \text{ m}^3/\text{ml}$). Er is nogal wat tegenspraak in de literatuur in verband met de oestrogene versus anti-oestrogene potentie van PAKs in het algemeen, en afhankelijk van de gebruikte test voor hormoonreceptorbinding en activatie zijn er verschillende resultaten (ICCVAM, 2003). Verder wordt aangenomen dat de *in vivo* werking eerder indirect kan gebeuren langs interferentie met de AhR, de aryl hydrocarbon receptor. Wanneer de oestrogene activiteit vergeleken wordt met PAK gehalten, maar uitgedrukt als TEF waarden (min. en max.) dan bleek er in geen enkel geval een significant verband (Tabel 7.15).

Bij detailanalyse voor de specifieke PAK verbindingen blijkt er voor fluoroantheen ($p=0.02$), chryseen ($p=0.01$), benzo(b)fluoroantheen ($p=0.0007$), benzo(k)fluoroantheen ($p=0.003$) en benzo(e)pyreen ($p=0.009$) een significant omgekeerd verband te zijn met de gemeten oestrogene activiteit. Er is geen duidelijke verklaring voor dit beeld tenzij dat aanwezige oestrogene activiteit afkomstig van andere stoffen (niet gemeten) voor een gedeelte onderdrukt wordt door PAKs. Dit fenomeen werd ook door (Taneda *et al.*, 2002) beschreven. De MELN test die we opgezet hebben, net met het oog op detectie van hetzij oestrogene, hetzij anti-oestrogene activiteit bleek echter aan te tonen dat in extracten van in Vlaanderen bemonsterde luchtstalen geen anti-oestrogene activiteit aanwezig was. Vanwege de complexe matrix waarmee we hier werken kunnen we de aanwezigheid van andere organische pollutanten (bijv. pesticiden, PCBs,...) die niet gemeten werden niet uitsluiten, terwijl deze mogelijk ook kunnen bijdragen tot de gemeten oestrogene activiteit.

Tabel 7.15: Vergelijking van pollutent parameters en totaal partikels met relatieve oestrogene inductie. Bij significant verband werd p-waarde ingekleurd.

Vergelijking parameters		n	Spearman R	T (N-2)	p-waarde
2.43 m³/ml	TSP filters	81	0.18	1.63	0.108
	PM10	78	0.03	0.26	0.799
	Totaal PAK	78	0.03	0.27	0.787
	Carc. PAK	72	0.07	0.56	0.578
	TEF min. PAKtotaal				
	TEF max. PAKtotaal				
	OC	78	0.16	1.44	0.155
	EC	78	0.14	1.21	0.229
	TC	78	0.16	1.37	0.175
4.86 m³/ml	TSP filters	80	0.16	1.39	0.168
	PM10	77	-0.04	-0.33	0.739
	Totaal PAK	78	-0.03	-0.29	0.773
	Carc. PAK	72	-0.02	-0.14	0.888
	TEF min. PAKtotaal				
	TEF max. PAKtotaal				
	OC	77	0.11	1.00	0.321
	EC	77	0.15	1.33	0.186
	TC	77	0.12	1.07	0.286
9.72 m³/ml	TSP filters	63	0.22	1.77	0.082
	PM10	60	0.00	0.03	0.972
	Totaal PAK	61	-0.43	-3.65	0.001
	Carc. PAK	58	-0.36	-2.93	0.005
	TEF min. PAKtotaal				
	TEF max. PAKtotaal				
	OC	60	0.02	0.19	0.853
	EC	60	-0.09	-0.68	0.501
	TC	60	-0.02	-0.13	0.896



Figuur 7.25: Relatie tussen relatieve inductie score voor oestrogene potentie (RIS) bij een testconcentratie van 9.72 m³/ml en pollutant metingen voor totaal organisch koolstof, die niet significant is (a) en totale PAKs, die significant is volgens Spearman rank testing (b)⁷.

7.2.4 Cytotoxiciteit

Er werd nagegaan of de gemeten cytotoxiciteit kan verklaard worden door de chemische samenstelling van de partikels. De chemische elementmetingen zijn gedeeld door totaal PM₁₀ op de filter, de resulterende waarden zijn dan (nanogram element)/(microgram PM₁₀). Dit geeft de relatieve aanwezigheid weer per element. Deze normering is uitgevoerd omdat de biologische blootstelling steeds gebeurd is met een vaste hoeveelheid TSP. De detectielimietwaarde is gebruikt voor metingen met waarden beneden de detectielimiet. Volgende elementen werden niet opgenomen in de analyse omdat meer dan de helft van de metingen beneden de detectielimiet ligt: 'P', 'Ni', 'Rh', 'Pd', 'Cd', 'Pt', 'Se'. Een randgeval is As. De As metingen werden in de dataset opgenomen maar bevatten veel metingen onder de detectielimiet.

De abundantie van de elementen en cytotoxisch effect correlaties werden bepaald met een Spearman rank correlation coefficient. Tabel 7.16 geeft een overzicht van de resultaten. Significante correlaties zijn gemarkeerd (Spearman rank correlatie, $p < 0.05$).

Positieve correlaties werden gevonden tussen de som van de PAKs, OC en EC. Daar de cytotoxiciteit uitgedrukt wordt als het percentage levende cellen t.o.v. van de solvent controle betekent dit dat deze chemische componenten geen verklaring geven voor de groeiinhibitie in de culturen. De positieve relatie is meest uitgesproken in de Beas-2B cellijn ($p < 0.003$).

Negatieve correlaties in de drie cellijnen werden gevonden met de elementen Al, Si, Ti en Ca. Deze componenten verklaren een deel van de celschade in de assay. De Beas-2B cellijn bleek het meest gevoelig te zijn, bij deze cellen zijn de correlaties significant ($p < 0.05$). De aanwezigheid van As draagt ook bij tot het cytotoxische effect in de Beas-2B ($p < 0.05$).

⁷ Details in verband met Spearman rank testen zijn gebundeld in Tabel 7.15.

De elementen Zn, Pb en Cu geven een positief effect op de leefbaarheid de A549 cellen ($p < 0.05$) terwijl PAKs, OC en EC een significant positief effect hebben op de Beas-2B cellen.

Tabel 7.16: Correlatie tussen cytotoxische respons en polluenten.(Spearman rank correlatie, r =correlatiecoëfficiënt).

Polluent	THP-1		A549		Beas-2B	
	r	p	r	p	r	p
Som PAKs	0,126	0,263	0,230	0,039	0,608	< 0,001
OC*	0,011	0,918	0,095	0,389	0,319	0,003
EC**	0,153	0,166	0,037	0,737	0,373	<0,001
'Al'	-0,160	0,145	-0,127	0,251	-0,325	0,003
'Si'	-0,111	0,314	-0,259	0,018	-0,373	0,000
'Ti'	-0,139	0,206	-0,202	0,065	-0,252	0,020
'Ca'	-0,037	0,737	-0,191	0,081	-0,153	0,164
'Mn'	-0,008	0,943	0,064	0,561	0,004	0,973
'Fe'	0,014	0,899	-0,085	0,442	0,051	0,647
'Cr'	-0,106	0,336	0,195	0,075	0,131	0,236
'Zn'	-0,113	0,305	0,308	0,004	0,189	0,085
'Pb'	-0,022	0,843	0,270	0,013	0,222	0,042
'S'	-0,284	0,009	-0,001	0,993	-0,061	0,582
'Cl'	0,088	0,424	0,195	0,075	0,310	0,004
'K'	0,009	0,937	0,118	0,283	0,120	0,277
'V'	0,187	0,089	-0,169	0,125	0,036	0,744
'Cu'	-0,141	0,201	0,273	0,012	0,196	0,074
'As'	-0,038	0,733	0,076	0,491	-0,291	0,007

*: OC:organische koolstof

** :EC:elementaire koolstof

In een studie met de muis monocyt cellijn J774A.1 wordt het cytotoxische effect van PM10 gelinkt aan de aanwezigheid van de elementen S, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Zn en Pb (Rosas Perez *et al.*, 2007)

7.2.5 Cytokineproductie

Er werd nagegaan of de gemeten inflammatoire respons kan verklaard worden door de chemische samenstelling van de partikels. Voor TNF- α en il-8 (A549) werd de SI na blootstelling van de cellen aan 200 μ g TSP/ml gebruikt in de statistische analyses. Omdat het cytotoxisch effect van de partikels in de Beas-2B cellen veel sterker is, wordt in de verdere statistische analyses gewerkt met de SI van il-6 en il-8 na blootstelling aan 25 μ g TSP/ml. Bij deze concentratie is de gemiddelde leefbaarheid van de cellen 84%. Dit percentage is vergelijkbaar met de leefbaarheid van de cellen (82%) na blootstelling van THP-1 cellen aan 200 μ g TSP/ml. Alhoewel de trends tussen chemische samenstelling en cytokineproductie bij de verschillende blootstellingconcentraties TSP dezelfde zijn, wordt hiermee uitgesloten dat de waargenomen effecten te wijten zijn aan het cytotoxisch karakter van de partikels.

De chemische elementmetingen zijn gedeeld door totaal PM10 op de filter, de resulterende waarden zijn dan (nanogram element)/(microgram PM10). Dit geeft de relatieve aanwezigheid weer per element. Deze normering is uitgevoerd omdat de biologische blootstelling steeds gebeurd is met een vaste hoeveelheid TSP. De detectielimietwaarde is gebruikt voor metingen met waarden beneden de

detectielimiet. Volgende elementen werden niet opgenomen in de analyse omdat meer dan de helft van de metingen beneden de detectielimiet ligt: 'P','Ni','Rh','Pd','Cd','Pt','Se'. Een randgeval is As. De As metingen werden in de dataset opgenomen maar bevatten veel metingen onder de detectielimiet.

Spearman rank correlation coefficients werden gebruikt om relaties tussen de abundantie van de elementen en immunologische effecten weer te geven. Tabel 7.17 geeft een overzicht van de resultaten. Significante correlaties zijn gemarkeerd (Spearman rank correlatie, $p < 0.05$).

Daar de productie van il-8 in de A549 cellen laag was en weinig variatie vertoonde tussen de dagen werd er slechts één significante correlatie met het element K gevonden.

Significant negatieve correlaties werden gevonden tussen de productie van TNF- α en totale PAKs, OC en EC. Deze twee laatste correleerden ook negatief met de il-6 productie ($p < 0.05$).

De elementen Al, Si, Ti en Ca zijn positief gecorreleerd met de cytokineproductie (niet il-8 in A549) maar de relatie was alleen significant voor de TNF- α en il-8 (Beas-2B) productie. De metalen Mn, Fe, Cr, Zn, Cu en Pb bleken negatief gecorreleerd met de productie van il-6 (Beas-2B) ($p < 0.05$). Dezelfde waarneming werd gezien tussen de metalen Zn, Cu en Pb en TNF- α productie ($p < 0.05$). De Il-8 productie (Beas-2B) was ook negatief gecorreleerd met Pb ($p < 0.05$). De aanwezigheid van het element Cl bleek een negatief effect te hebben op de cytokineproductie in THP-1 en beas-2B ($p < 0.05$).

Tabel 7.17: Correlatie tussen cytokineproductie en polluenten.(Spearman rank correlatie, r =correlatiecoëfficiënt).

Polluent	TNF- α	Il-8 (A549)	Il-6 (Beas-2B)	Il-8 (Beas-2B)
	r	r	R	r
Som PAKs	-0,539	0,179	0.251	0.158
OC	-0,259	-0,041	-0.341	-0.197
EC	-0,262	0,133	-0.331	-0.075
'Al'	0,306	-0,102	0,128	0.274
'Si'	0,408	-0,084	0.143	0.269
'Ti'	0,277	0,044	0.008	0.232
'Ca'	0,247	0,125	0.051	0.295
'Mn'	-0,007	-0,025	-0.253	0.080
'Fe'	-0,026	0,052	-0.228	0.128
'Cr'	-0,176	0,043	-0.286	-0.045
'Zn'	-0,357	-0,097	-0.377	-0.145
'Pb'	-0,447	-0,002	-0.472	-0.221
'S'	0,194	-0,201	-0.129	-0.042
'Cl'	-0,401	0,092	-0.262	-0.314
'K'	-0,228	0,272	-0.360	-0.107
'V'	-0,046	0,051	-0.039	-0.002
'Cu'	-0,326	-0,056	-0.383	-0.068
'As'	0,042	-0,192	-0.147	-0.006

*: OC:organische koolstof

** :EC:elementaire koolstof

Blootstelling van particulier materiaal aan macrofagen en bronchiale epitheelcellen induceert de productie van (pro)-inflammatoire cytokines. Een specifieke rol van overgangsmetalen aanwezig op PM bij de inductie van il-6, il-8 en TNF- α via de inductie van oxidatieve stress wordt gesuggereerd (Donaldson and MacNee, 2001). De resultaten van deze studie bevestigen deze waarneming niet.

In het Europese project RAIAP werd il-8 productie door A549 meegenomen als biologische effect parameter ((Steerenberg *et al.*, 2006a)). In deze studie werd een uitgebreid panel van elementen, organische stoffen en PAKs gemeten op de gecollecteerde partikels (PM10, PM2.5). Voor il-8 werden geen significante correlaties gevonden met chemische componenten. Naast il-8 werd ook il-6, TNF- α en MIP2 gemeten in primaire rat alveolaire macrofagen en epitheelcellen. Voor al deze parameters werden significant positieve correlaties vastgesteld met de chemische elementen Nd, Sm, Be, U, Ba, Fe, Ce, Hf, Al, Mo, Sb, Ti, Sr, Sc, Cr, Cu, La, Mg, Si, K, Mn, Co, Ca (crustal material) en Na en Cl (sea spray). Negatieve correlaties doch niet significant werden gezien tussen de verschillende cytokines en As, Cd, Zn, Pb, Ni, V, Se en tal van organische stoffen.

Gelijkaardige significante trends werden teruggevonden in dit pilootproject tussen cytokine inductie (TNF- α , il-6 en il-8 productie door Beas-2B) en enerzijds Al, Si, Ti, Ca en anderzijds Pb, Zn en OC.

In een Japanse studie werden correlaties gevonden tussen il-8 productie in Beas-2B met Cr en Mn (Huang *et al.*, 2003). TNF- α productie door muis macrofagen (RAW 264.7 cellijn) correleerde met Fe en Cr. Deze resultaten worden niet bevestigd in deze pilootstudie.

In een studie naar de biologische respons van opgewaaid stof (PM2.5) werd een positieve correlatie gevonden tussen il-6 en de Ca:Al ratio en de som van toxische metalen As, Se, Hg en Pb (Veranth *et al.*, 2006).

In primaire humane bronchiale epitheelcellen (NHBE) was de il-6 en il-8 productie significant gecorreleerd met de groep elementen Cr/Al/Si/Ti/Fe/Cu (Becker *et al.*, 2005a; Becker *et al.*, 2005b). Fe en Si vertoonden een positieve correlatie met il-6 en Cr was gecorreleerd met il-8 productie.

De speciale rol van de metaalcomponenten op PM10 bij de inductie van il-6, il-8 en TNF- α werd aangetoond in humane bronchiale epitheelcellen door het toevoegen van een metaalchelator (Carter *et al.*, 1997).

In een studie met de muis monocyt cellijn J774A.1 en PM10 blootstelling werd aangetoond dat de productie van il-6 en TNF- α voornamelijk te wijten was aan de aanwezigheid van de elementen S, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Zn en Pb (Rosas Perez *et al.*, 2007)

Tijdens de volledige campagne werd op 7 van 32 dagen in één of meerdere locaties een overschrijding van de daggrenswaarden voor fijn stof vastgesteld (daggemiddelde PM10 concentratie hoger dan 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). De cytokineproductie werd in de vorige analyses uitgedrukt in functie van de blootstelling aan 200 μg TSP/ml. Door rekening te houden met de hoeveelheid μg PM10/ m^3 bemonsterde omgevingslucht, kan de cytokineproductie ook uitgedrukt worden per m^3 lucht. Deze benadering geeft een beter idee over het mogelijk schadelijk risico bij inademing van één m^3 lucht. De omrekening werd uitgevoerd voor alle monsternames. De immunotoxische potentie per m^3 varieerde sterk tussen de monsternamen. Als we de inflammatoire potentie van één m^3 lucht vergelijken met de gemeten PM10 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) concentratie dan stellen we vast dat niet alleen op dagen met overschrijding van de dagwaarden voor

fijn stof maar ook op andere dagen met PM10 concentraties < 50 µg PM10/ m³ er hoge immunotoxische effecten van de partikels werden waargenomen.

In Tabel 7.18 worden de bemonsteringsdagen gerangschikt volgens dalende immunotoxische potentie (fold inductie TNF-α/m³, fold inductie il-6/m³).

Tabel 7.18: Inflammatoire potentie per m³ bemonsterde lucht (fold inductie TNF-α/m³, fold inductie il-6/m³).

Aarschot			Borgerhout			Zelzate		
Datum	PM10 µg/m ³	TNF/m ³	Datum	PM10 µg/m ³	TNF/m ³	Datum	PM10 µg/m ³	TNF/m ³
7/06/2007	43,777	26,30	7/06/2007	51,342	66,23	2/05/2007	39,933	32,29
19/02/2007	74,088	12,28	20/04/2007	35,267	31,72	20/04/2007	40,006	29,12
16/09/2006	73,499	10,97	11/09/2007	22,515	18,89	27/03/2007	61,010	26,13
1/07/2007	13,350	10,00	25/07/2007	26,369	14,09	16/09/2006	92,500	22,78
13/07/2007	14,303	9,87	15/03/2007	85,041	14,06	15/03/2007	81,286	14,38
25/07/2007	17,803	9,37	16/09/2006	86,120	13,42	14/05/2007	34,328	12,57
2/05/2007	26,011	8,53	19/06/2007	29,028	10,85	7/06/2007	52,576	12,19
15/03/2007	79,811	7,90	26/05/2007	36,564	10,76	28/09/2006	45,411	11,94
6/08/2007	24,587	7,73	30/08/2007	36,213	9,01	26/05/2007	37,020	9,73
7/02/2007	26,546	5,74	14/05/2007	20,930	8,41	6/08/2007	31,861	8,90
19/06/2007	21,993	3,99	19/02/2007	79,338	4,99	1/07/2007	14,339	7,18
10/10/2006	31,196	3,57	3/03/2007	25,272	4,02	19/02/2007	71,676	6,59
3/11/2006	29,721	2,79	7/02/2007	51,560	4,01	26/01/2007	39,906	5,37
26/01/2007	42,763	1,92	13/07/2007	18,090	3,89	30/08/2007	29,013	4,11
28/09/2006	30,252	1,69	18/08/2007	20,743	3,66	7/02/2007	54,282	3,93
22/10/2006	14,593	1,26	10/10/2006	38,814	3,59	10/10/2006	35,180	3,29
21/12/2006	50,335	1,15	1/07/2007	16,286	3,28	22/10/2006	29,358	3,26
3/03/2007	17,631	0,92	28/09/2006	43,500	2,41	3/03/2007	26,410	3,08
14/01/2007	20,628	0,75	26/01/2007	44,288	2,07	19/06/2007	23,576	2,96
9/12/2006	25,249	0,69	27/11/2006	19,075	1,85	3/11/2006	23,354	2,66

Aarschot			Borgerhout			Zelzate		
Datum	PM10 in µg/m ³	il-6/m ³	Datum	PM10 in µg/m ³	il-6/m ³	Datum	PM10 in µg/m ³	il-6/m ³
20/04/2007	39,561	2,69	12/01/1900	22,515	12,05	2/05/2007	39,933	23,89
15/03/2007	79,811	2,01	8/01/1900	51,342	8,97	26/01/2007	39,906	1,65
19/02/2007	74,088	1,97	4/01/1900	20,743	4,45	15/03/2007	81,286	1,53
2/05/2007	26,011	1,37	1/01/1900	36,564	1,90	27/03/2007	61,010	1,32
19/06/2007	21,993	1,09	1/01/1900	85,041	1,43	7/06/2007	52,576	1,08
7/06/2007	43,777	0,95	0/01/1900	79,338	0,97	19/02/2007	71,676	1,01
26/05/2007	39,135	0,83	0/01/1900	36,213	0,72	1/07/2007	14,339	0,99
7/02/2007	26,546	0,78	0/01/1900	29,028	0,71	30/08/2007	29,013	0,73
25/07/2007	17,803	0,75	0/01/1900	86,120	0,44	25/07/2007	23,530	0,65
16/09/2006	73,499	0,68	0/01/1900	25,272	0,37	14/05/2007	34,328	0,51
3/03/2007	17,631	0,59	0/01/1900	26,369	0,35	6/08/2007	31,861	0,47
6/08/2007	24,587	0,52	0/01/1900	35,267	0,26	16/09/2006	92,500	0,46
11/09/2007	17,223	0,51	0/01/1900	51,560	0,25	7/02/2007	54,282	0,36
1/07/2007	13,350	0,43	0/01/1900	43,500	0,25	3/03/2007	26,410	0,36
14/05/2007	16,026	0,31	0/01/1900	31,315	0,24	11/09/2007	18,659	0,28
26/01/2007	42,763	0,22	0/01/1900	44,288	0,22	28/09/2006	45,411	0,23
28/09/2006	30,252	0,22	0/01/1900	38,814	0,21	20/04/2007	40,006	0,22
3/11/2006	29,721	0,21	0/01/1900	31,451	0,20	8/04/2007	43,523	0,22
10/10/2006	31,196	0,19	0/01/1900	18,090	0,19	21/12/2006	37,502	0,21
14/01/2007	20,628	0,13	0/01/1900	23,826	0,18	18/08/2007	22,374	0,20

7.3 *Inschatting van gezondheidsrisico's*

7.3.1 Implementatie van genotox, immunotox en hormonale verstoring resultaten voor inschatting gezondheidsrisico

Een van de vooropgestelde verwachtingen van dit pilootproject was om een betere inschatting te kunnen uitvoeren van de gezondheidsrisico's geassocieerd met lokale luchtkwaliteit. De toxiciteitstesten werden geselecteerd mede op basis van een gekende relatie tussen de gemeten eindpunten *in vitro* en de toxische werkingsmechanismen van polluenten *in vivo* bij de mens.

De *in vitro* biologische testen geven een goed beeld over de potentiële toxiciteit van de aanwezige polluenten d.w.z. een gevaarsidentificatie, maar vooraleer we het risico op gezondheidsschade in absolute termen kunnen afleiden moet er eerst een gegevensbestand worden opgebouwd met achtergrondwaarden en moet een relatie met gezondheidseffecten v.b. gemeten via biomonitoring ook kwantitatief onderbouwd worden. Op basis van de gekende analogie tussen de gemeten eindpunten *in vitro* en de toxische werkingsmechanismen van polluenten *in vivo* bij de mens, kan men stellen dat de toxicologische eindpunten aangeven dat er mogelijk een verhoogd risico bestaat voor bepaalde gezondheidseffecten. Het trachten om te rekenen van b.v. een verhoogd risico op longkanker, op basis van de biologische effectmetingen is zeer ambitieus en gaat nog gepaard met tal van onzekerheden. Wel kunnen we stellen dat een hogere mutagene activiteit van de stofdeeltjes mogelijk ook kan betekenen dat het risico op longkanker verhoogd. Er zijn echter veel tussenliggende factoren, zoals de biobeschikbaarheid van de chemische stoffen voor de doelwitcellen in de longen, omzettingsreacties (toxificatie en ontgiftiging) in het lichaam,....

Om beter aan deze verwachting tegemoet te komen, zou er een systeem kunnen uitgewerkt worden waarbij de toxische potentie van de partikels uitgedrukt wordt als equivalent van de toxische potentie van gekende toxische stoffen waarvan het risico voor de mens wel beter gekwantificeerd is.

Deze oefening werd uitgevoerd voor de mutagene activiteit van de filterextracten. BaP⁸ (5 µg/plaat) werd telkens meegenomen in de *Salmonella* mutageniciteitstest. De mutagene activiteit (revertanten/20m³ lucht) van de verschillende filterextracten werd uitgedrukt t.o.v. het aantal revertanten/plaat na blootstelling aan 5 µg BaP (BaP=1). De gemiddelde (± SD) relatieve mutagene potentie (t.o.v. 5 µg BaP) van de filterextracten bedroeg 0.24 ± 0.17 (n=88) en varieerde tussen 0.09 en 1.09. De gemiddelde mutagene potentie van de blanco filters bedroeg 0.10. In Tabel 7.19 wordt een overzicht gegeven van de filters (plaats en datum) met de hoogste relatieve mutagene potentie. Deze aanpak toont aan dat er twee stalen zijn op 15/03/07 (Zelzate en Aarschot) met een mutagene potentie die vergelijkbaar is met deze van 5 µg BaP.

⁸ Het kankerrisico voor Benzo(a)pyreen (B(a)P) is 1 extra kankergeval per 100 000 personen, bij een levenslange blootstelling aan een concentratie van 0,12 ng/m³ (WHO, 2000).

Tabel 7.19: Relatieve mutagene potentie van de filterextracten (t.o.v. mutagene activiteit van BaP in de Ames test)

Datum	Plaats	Relatieve mutagene potentie
15/03/2007	Zelzate	1,09
15/03/2007	Aarschot	0,99
19/02/2007	Zelzate	0,75
19/02/2007	Aarschot	0,53
10/10/2006	Borgerhout	0,50
27/03/2007	Zelzate	0,49
7/02/2007	Borgerhout	0,47
26/05/2007	Aarschot	0,43
3/11/2006	Aarschot	0,41
3/03/2007	Zelzate	0,38
26/01/2007	Zelzate	0,34
3/03/2007	Aarschot	0,33
3/03/2007	Borgerhout	0,33
26/05/2007	Borgerhout	0,33
19/06/2007	Borgerhout	0,33
14/05/2007	Zelzate	0,32
7/02/2007	Zelzate	0,32
26/05/2007	Zelzate	0,32
14/05/2007	Borgerhout	0,31
7/06/2007	Aarschot	0,30

De beschikbare gegevens van het Vlaams humaan biomonitoring meetnetwerk werden vergeleken met de *in vitro* testresultaten alsook beschikbare lokale epidemiologische gegevens die in verband kunnen gebracht worden met buitenluchtkwaliteit.

Het biomonitoring meetnetwerk werd opgezet in acht aandachtsgebieden met een kenmerkende en verschillende milieubelasting: Antwerpse agglomeratie; Gentse agglomeratie; fruitstreek rond Sint-Truiden; Landelijk (gebieden in Oost- en West-Vlaanderen en Vlaams-Brabant); Havens: Antwerpse haven en Gentse kanaalzone; Olen; zone Albertkanaal (van Geel tot Beringen). Twee (Gentse kanaalzone, Antwerpen) van de 8 gebieden komen overeen met deze pilootstudie.

Volgende resultaten m.b.t. gezondheidseffectparameters werden verkregen in het Steunpunt M&G:

- Astma en allergie

In alle campagnes (pasgeborenen, adolescenten, volwassenen) werd meer astma in de stedelijke gebieden (Gent, Antwerpen) vastgesteld dan in de landelijke gebieden, maar de verschillen waren enkel significant bij de moeders van de pasgeborenen. Moeders uit de stedelijke agglomeraties rapporteerden meer astma. In Gent meldden 8% van de moeders een 'astmadiagnose door arts' t.o.v. 4% als referentiegemiddelde. In Antwerpen gaven 20 % moeders aan 'ooit astmaklachten' te hebben t.o.v. 16% als referentiegemiddelde. In landelijk Vlaanderen werd minder astma (1% en 10% voor respectievelijk beide astma definities) en minder allergie voor dieren (5% t.o.v. 12% als referentiegemiddelde) gerapporteerd.

Bij deelnemers met hogere loodgehalten kwam astma en hooikoorts meer voor.

Als we kijken naar de inflammatoire respons van de partikels in deze pilootstudie dan was er een tendens tot hogere activiteit in de stalen afkomstig van Borgerhout. Dit stemt overeen met de observatie in de M&G studie waar astma meer voorkwam in de stedelijke gebieden. Epidemiologisch onderzoek

in Vlaanderen toonde ook aan dat er verschillen gemeten werden in de prevalentie van respiratoire symptomen en astma tussen inwoners van stedelijke en landelijke gebieden (Wieringa *et al.*, 1998; Wieringa *et al.*, 2001).

De resultaten van deze pilootstudie bevestigen echter niet de associatie tussen het lood en astma. In deze pilootstudie werden negatieve correlaties vastgesteld tussen de aanwezigheid van lood op de filters en de productie van TNF- α , il-6 en il-8 (in beide cellijnen). Wel moet opgemerkt worden dat de loodgehalten in de M&G studie werden gemeten in het bloed van deelnemers en het hier dus niet gaat om loodconcentraties in de omgevingslucht.

- Endocriene merkers

Pasgeborenenstudie: Voor wat betreft de informatie in deze studie zijn enkel de gegevens voor het gebied Borgerhout te vergelijken met resultaten biomonitoring.: Bij de moeders die spontaan bevielen (868 van de 1196) werd de zwangerschapsduur per gebied vergeleken met het referentiegemiddelde. Er werden geen significante verschillen met de Vlaamse referentiewaarde vastgesteld voor 'tijd tot zwangerschap' (time to pregnancy) bij 437 moeders die van hun eerste kind bevielen en de vraag hadden beantwoord. De kortste tijd tot de zwangerschap werd gerapporteerd door de moeders in de Albertkanaalzone (7,8 maanden) en in de Antwerpse agglomeratie (8,0 maanden). In de meeste andere gebieden varieerde de tijd tot zwangerschap van 9.5 tot 11.5 maanden. Een tijd tot zwangerschap van 12 maanden, wordt als normaal beschouwd.

Adolescenten: Ook voor deze populatiegroep blijken er enkel voor de Antwerpse agglomeratie relevante gegevens die in verband te brengen zijn met de meetcampagnes voor lucht in Borgerhout.

Op basis van de gegevens van het CLB kon voor 767 jongens en 636 meisjes de seksuele ontwikkeling worden gemeten. De puberteitsontwikkeling werd door de schoolarts beoordeeld volgens een internationaal score-systeem van Marschall en Tanner, op een schaal van 1 (start van puberteit) tot 5 (volwassen stadium). Bij jongens werden genitale ontwikkeling (G)(ontwikkeling van de geslachtsdelen) en pubisbeharings (P)(beharings van de schaamstreek) gemeten; bij meisjes werden borstontwikkeling (B) en pubisbeharings (P)(beharings van de schaamstreek) beoordeeld. De metingen maken deel uit van de standaardprocedures die worden uitgevoerd door de schoolarts. Omdat jongens trager tot seksuele ontwikkeling komen dan meisjes en omdat het onderscheid tussen stadia 2 en 3 met meer betrouwbaarheid kan gemaakt worden dan het onderscheid tussen stadia 3 en 4, werd voor de jongens het percentage weergegeven waarbij de genitale ontwikkeling of pubisbeharings reeds stadium 3, 4 of 5 bereikt had. In de totale groep had 92,2% van de jongens stadium 3, 4 of 5 van de genitale ontwikkeling bereikt en 87,9% had stadium 3, 4 of 5 van de pubisbeharings bereikt. Een statistisch significante achterstand werd waargenomen voor de Antwerpse agglomeratie.

Omdat meisjes vroeger tot seksuele ontwikkeling komen dan jongens, werd voor de meisjes het percentage weergegeven waarbij de borstontwikkeling en de pubisbeharings reeds stadium 4 of 5 bereikt hadden. In de totale groep had 85,9% van de meisjes stadium 4 of 5 van de borstontwikkeling bereikt en 87,1% had stadium 4 of 5 van de pubisbeharings bereikt. In vergelijking met deze gemiddelde waarden was het percentage meisjes dat stadium 4 of 5 had bereikt significant lager in de Antwerpse agglomeratie en in de havengebieden, vooral in het Antwerpse havengebied. Voor dit laatste gebied zijn er geen bemonsteringen van lucht, en is het niet relevant om deze gegevens te relateren met de bemonstering in Borgerhout.

Volwassenen: Bij vrouwen werd het aantal miskramen bevraagd. In de totale groep had 17,7% (95% BI: 14,2-21,9) van de vrouwen één of meerdere miskramen gehad. Dit percentage miskramen verschilde niet significant tussen de regio's ($p=0,24$), na correctie voor de leeftijd van de moeder op het moment van de miskraam. Deze gegevens laten niet toe om enig verband te leggen met monitoring van luchtpollutie.

Het is niet evident om hiervoor beschreven aandoeningen in verband te brengen met de huidige meetcampagnes van luchtpollutie en bepaling van oestrogene activiteit. Immers de MELN bioassay, waarmee agonistische en antagonistische activiteit voor de oestradiol receptor gemeten wordt, beschrijft slechts een gedeelte, hoewel niet onbelangrijk deel van de processen die met endocriene verstoring te maken hebben. We hebben met dit pilootproject duidelijk aangetoond dat chemicaliën met oestrogene potentie zich verspreiden via de lucht. Echter het betreft een zeer complex mengsel van chemische pollutanten die op zeer diverse target sites in het endocriene systeem, n.l. verschillende hormoonreceptoren, steroid metabolisme, ... kunnen inwerken. Dit maakt dat het niet haalbaar is om op basis van de huidige kennis met het ontbreken van éénduidige causale verbanden tussen blootstelling aan hormoonverstorende stoffen en humane gezondheidseffecten, conclusies te maken omtrent gezondheidsrisico's in de context van deze beperkte Vlaamse monitoring studie. Bovendien blijkt dat er in sommige gevallen in de Antwerpse agglomeratie wel afwijkingen zijn op vlak van endocriene verstoring, maar het is net op de locatie Borgerhout dat de gemeten oestrogene activiteit gemiddeld lager is dan in Zelzate of Aarschot. Voor deze laatste gebieden werd echter geen bruikbare informatie in het biomonitoringonderzoek en endocriene merkers verzameld.

- Merkers voor DNA schade

Adolescenten: De komeetttest geeft aan hoeveel procent van het DNA (erfelijk materiaal) beschadigd werd en is dus een maat voor de druk op het DNA. Deze schade kan nog hersteld worden. Er bleken significante streekverschillen te bestaan. Hogere waarden werden gevonden in Antwerpen, de Antwerpse haven en in de Albertkanaalzone.

Volwassenen: Bij de volwassenen was de waarde van de komeetttest significant hoger in de Gentse agglomeratie.

De mutagene activiteit van de bemonsterde lucht bleek in deze pilootstudie sterker aanwezig te zijn in stalen van de industriële locatie Zelzate. Het is niet eenvoudig de resultaten van de *Salmonella* mutageniciteitstest te vergelijken met de resultaten van de komeetttest. De komeetttest is een "biomarker of biological effective dose", d.w.z. een maat voor de blootstelling aan stoffen die DNA schade toebrengen. Sommige van die stoffen kunnen ook mutaties veroorzaken. Er kan een verband zijn tussen beide metingen, maar het hoeft niet.

7.3.2 Implementatie van Cat-tox resultaten voor inschatting gezondheidsrisico

Organische extracten van particulier materiaal bevatten voornamelijk verschillende polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAKs) en de relatie tussen deze stoffen en oxidatieve stress/DNA schade werd reeds meermaals aangetoond in *in vivo* en *in*

vitro studies (Risom *et al.*, 2005); (Vineis and Husgafvel-Pursiainen, 2005). PAKs kunnen een directe aanleiding geven tot negatieve effecten door hun werking als pro-oxidantia of productie van vrije radicalen. Hierdoor wordt oxidatieve stress en de inductie van inflammatoire responsen gepromoot (Risom *et al.*, 2005); (Kampa and Castanas, 2008). Wanneer de vrije radicalen concentratie stijgt, kan een status van oxidatieve stress ontstaan. Inductie van DNA-schade door oxidatieve stress kan een weerspiegeling zijn van een primaire carcinogene blootstelling afhankelijk van verschillende parameters als leeftijd, geslacht, BMI, fysieke conditie of consumptie van vers fruit en groenten (Risom *et al.*, 2005); (Vineis and Husgafvel-Pursiainen, 2005). Een aanhoudende oxidatieve stress toestand werd meermaals geassocieerd met een waaier van degeneratieve ziektebeelden als cardiovasculaire ziekten (atherosclerose, hartaanval), chronische inflammatieziekten (rheumatoïde artritis), aandoeningen van het centraal zenuwstelsel en kanker (Kampa and Castanas, 2008).

In de Cat-tox-assay hebben 3 genen een directe gevoeligheid voor PAKs: **Cyp1A1**, **Xre** en **GstYa** (Vincent *et al.*, 1997). De AhR of dioxine receptor is de primaire doelreceptor voor PAKs. Xre is het xenobiotic respons element dat een bindingsite voor de AhR receptor vormt. Een belangrijke biologische respons volgend op de activatie van AhR is inductie van drug metaboliserende mono-oxygenases zoals cytochrome P450 1A1 (Cyp1A1), Cyp1A2 en Cyp1B1, zowel als fase II enzymes als glutathione-S-transferase (Gst). In de hier uitgevoerde studie is de mate van inductie van deze drie genen in dalende volgorde: Xre > Cyp1A1 > GstYa. Dit is in overeenstemming met de studie van Vincent *et al.* (1997) waarbij Cat-tox werd gebruikt als stress-indicator voor partikels in stof. Hoewel Cyp-activatie een belangrijke rol speelt in detoxificatie van xenobiotica, kunnen ze ook de toxische of mutagene potentie van een stof verhogen (zoals de metabole activatie van PAKs). In deze studie werd een duidelijke correlatie gevonden tussen Cyp1A1 inductie en verhoogde totale PAKs concentraties in de bemonsterde luchtstalen. Verschillende chronische nadelige gezondheidseffecten van xenobiotica, zoals veranderde celproliferatie, neurotoxiciteit, embryotoxiciteit, immunotoxiciteit als carcinogeniciteit, werden reeds gerelateerd aan AhR-afhankelijke events (Janosek *et al.*, 2006). Meer specifiek zou het carcinogene geassocieerde PAKs wordt veronderstelt in grote mate gecorreleerd te zijn met inductie van Cyp1A1 (Vincent *et al.*, 1997).

Naast deze specifieke stress-merkers voor PAKs, bezit de Cat-tox test eveneens een aantal algemene indicatoren voor inductie van oxidatieve stress en DNA-schade.

Het proto-oncogen **c-Fos** is een vroege-response gen dat sterk geassocieerd wordt met controle van celgroei (vnl. DNA-synthese) en -sterfte. Verhoging van de basale Fos-expressie kan een signaal geven om de cel in te leiden in apoptosis (dead pathway) (Afshari *et al.*, 1994). De c-Fos promotor is gevoelig voor stress factoren zoals zware metalen en heat shock. c-Fos maakt samen met een ander proto-oncogen c-Jun deel uit van het AP-1 transcriptie factor complex. Misregulatie van deze transcriptiefactor komt vaak voor bij carcinogenese. Opregulatie van AP-1 en het Fos gerelateerd antigen, Fra-1, wordt dikwijls gevonden processen als tumorpromotie, kankergroei en metastases (Young and Colburn, 2006). In bronchiale (16HBE) en alveolaire (C10) epitheelcellen werd inductie van het proto-oncogen c-Fos gemeten na blootstelling aan partikels van dieselmotortoot en ultrafijne en PM_{2.5}-luchtpartikels en werd een eerste link gelegd naar mogelijke rol in ontstaan en progressie van longkanker (Baeza-Squiban *et al.*, 1999) (Timblin *et al.*, 2002).

Reeds meermaals werd aangetoond dat inductie van **Gadd45** (growth arrest and DNA damage protein 45) een gevoelige merker is voor genotoxische stress, zoals na

blootstelling aan carcinogene PAKs. Gadd45 speelt hierbij een belangrijke rol in DNA-herstel, celcyclusregulatie en apoptosis en heeft bijgevolg een belangrijk aandeel in het behouden van genomische stabiliteit. Momenteel wordt de inductie van dit gen, gekoppeld aan een reporter, volgens het principe van de Cat-tox test, geëvalueerd als mogelijk nieuwe gevoelige en specifieke gentoxiciteitstest (Hastwell *et al.*, 2006).

Zowel Fos als Gadd45 zijn positief gecorreleerd met OC, Gadd45 is eveneens positief gecorreleerd met EC en bovendien is Fos positief gecorreleerd aan benzo(a)anthraceen.

De laatste groep van merkers konden niet direct gerelateerd worden aan gemeten chemische componenten of klimatologische parameters, maar kunnen wijzen op een specifieke activiteit of aanwezigheid van een specifieke component.

Grp78 (glucose regulated protein 78) is een gevoelige merker voor endoplasmatische reticulum (ER) stress in het algemeen en proteïne misvouwing in het bijzonder. Het is een chaperon-eiwit dat proteïnes door het vouwproces leidt. Grp78 wordt geïnduceerd door ER-stress en zorgt ervoor dat de cel de accumulatie van onvolmaakte, misvouwde proteïnes in het ER aankan (McCullough *et al.*, 2001).

Gadd153 (growth arrest and DNA damage protein 153) is een leucine zipper transcriptie factor die robuust geëxprimeerd wordt bij ER-stress. In tegenstelling tot GRP78, dat eveneens geïnduceerd wordt door ER-stress, stimuleert Gadd153 het apoptosis-proces door down-regulatie van Bcl2, depletie van cellulaire glutathione en inductie van ROS (McCullough *et al.*, 2001). Hierdoor is de activatie van Gadd153 indicatief voor DNA schade geïnduceerd door reactive oxygen species (ROS) of agentia die breuken in DNA-streng veroorzaken (Bernstein *et al.*, 1999). ER-stress zou een sleutelrol spelen in verschillende processen als immuniteit, diabetes, tumorgroei en verscheidene neurodegeneratieve ziektes (Zhao and Ackerman, 2006).

Rare (retinoic acid response element) is een specifieke merker-gen voor aanwezigheid van retinoïden. Het meest beschreven werkingsmechanisme van retinoïden is namelijk binding op retinoïc acid receptor (RAR) of de retinoid X receptor (RXR), die vervolgens binden op promotoren met een Rare, waardoor transcriptie geïnduceerd wordt (Janosek *et al.*, 2006). Aangezien retinoïden en de retinoïde-pathway belangrijk zijn bij de regulatie van morfogenese, ontwikkeling, reproductie en apoptosis, kunnen stoffen die via deze pathway inwerken een belangrijke invloed op deze processen hebben. Een mogelijke embryotoxische en teratogene werking van sommige PAKs door interactie op de retinoïde-pathway werd reeds gesuggereerd, hoewel het exacte werkingsmechanisme en de interferentie met andere pathways nog ongekend is (Novak *et al.*, 2008).

Hmt2a (humaan metallothioneïne 2a, MT-2A) speelt waarschijnlijk een belangrijke rol in de intracellulaire opslag en sequestratie van zware metalen zoals cadmium en zink, maar spelen eveneens een rol in cellulaire weerstand aan alkyl-agentia en radiatie. Naast het reeds uitgebreid beschreven gebruik van metallothioneïnes als biomerker voor blootstelling aan zware metalen, zou de werking van MT-2A, het belangrijkste lid van de humane MT-familie, als vrije zuurstofradicalen-vanger een belangrijke bijdrage als blootstellingsbiomerker van O₃, NO₂ en PM kunnen betekenen. Deze pollutanten zijn namelijk mogelijke potente oxidantia en induceren vrije radicalenvorming (Oudinet *et al.*, 2006). Verder onderzoek naar deze biomerker in uitgebreide epidemiologische studies is echter vereist.

De Cat-tox resultaten tonen op verschillende merkers een duidelijke indicatie voor een verhoogd stress-niveau als gevolg van blootstelling aan de bemonsterde luchtstalen. Zowel de AhR-merkers (Cyp1A1, Xre en GstYa) als DNA-schade (c-fos en Gadd45) merkers zijn gecorreleerd met verschillende chemische parameters gemeten in de luchtstalen. Hierdoor is de mogelijkheid op verhoogde DNA-schade reëel na blootstelling aan de bemonsterde luchtstalen. Of dit al dan niet een indicatie geeft van een verhoogd risico op carcinogeniciteit kan in deze studie alleen niet geconcludeerd worden (zie aanbevelingen).

8 Conclusie en aanbevelingen

Deze studie beoogde het uitwerken en het uitvoeren van een pilootproject waarin zwevend stof, geïncubated op filters, toxicologisch werd gekarakteriseerd door gebruik te maken van biologische testen.

De belangrijkste conclusies en aanbevelingen worden hieronder samengevat.

Fase I

- In dit project werd aangetoond dat de logistiek voor staalname voor een effectgericht meetnetwerk kan afgestemd worden op het bestaande VMM PAK meetnetwerk dat gebruik maakt van high volume samplers van het type Digitel.
- Het aansluiten op een bestaand meetnetwerk heeft een aantal voordelen:
 - Er dienen geen extra meettoestellen te worden aangekocht.
 - Historische gegevens van de chemische metingen zijn gekend voor de meetplaats.
 - De Digitel toestellen hebben een automatische filterwisselaar en een voorraad aan filters voor 14 dagen.
 - Het meetnetwerk omvat meetplaatsen in de buurt van woonzones. Dit is interessant in het kader van onderzoek naar de predictiviteit van de bioassays voor de volksgezondheid.
 - De bemonsteringsdagen kunnen homogeen gespreid worden over de vier seizoenen (4^e EUdochterrichtlijn lucht).

Anderzijds moet er gewezen worden op een mogelijk nadeel:

- Alleen de partikelfase wordt in routine bemonsterd. Om de semi-vluchtige fase te bemonsteren moet een PUF-adsorber worden aangebracht welke niet automatisch kan gewisseld worden.

Aanbeveling:

De Digitel toestellen hebben het nadeel dat temperatuur gedurende de bemonstering kan oplopen. Onder invloed van verhoogde temperatuur en verhoogde concentraties ozon en stikstofoxiden kunnen chemische reacties plaatsgrijpen op de filter waardoor bemonsterd materiaal kan omgezet worden in andere (meer toxische?) stoffen. Voor monsternamen i.f.v. de biologische testen kan daarom best gezocht worden naar een alternatieve bemonsteringslogistiek waarbij de filters de dag na de monsternamen opgehaald worden.

Fase II

Het onderzoek in de 2^{de} fase van het pilootproject heeft een aantal mogelijkheden aangetoond:

- De methode (methanolextractie) die gebruikt werd in de Europese effectgerichte studie RAIAP om partikels van de filters te verwijderen werd geïmplementeerd. Deze methode heeft het voordeel dat het drooggewicht van de partikels kan bepaald worden zodat de blootstellingconcentratie in de bioassays nauwkeurig gekend is.
- De organische extractie (ASE) van de filters werd succesvol uitgevoerd. Achtergrondtoxiciteit van de filters en de extractieprocedures werd nagegaan in de verschillende *in vitro* testen. Noch in de Ames test noch in de long

epitheelcellijnen (A549 en Beas-2B) en macrofaag cellijn (THP-1) werden schadelijke effecten gemeten met deze blanco filters.

- Beladen filters werden getest in de verschillende *in vitro* testsystemen. Effecten van de ASE-extracten of van het particulier materiaal konden gedetecteerd worden.
- De biologische testen waren reproduceerbaar.

De keuze van filters bleek voor één van de testen nadelig te zijn en moet in de toekomst herzien worden:

- Extracten van blanco filters gaven een positief signaal in de MELN-test en de Cat-tox test. Hiermee werd rekening gehouden bij de interpretatie van de resultaten van de beladen filters. Het is essentieel om voldoende controles in te bouwen om de resultaten op betrouwbare wijze te interpreteren.

Aanbeveling

- Extracten van blanco filters gaven een positief signaal in de MELN-test. Een verdere optimalisatie (filter keuze) van de organische extractie procedure is aanbevolen voor deze test.
- Het werken met organische extracten heeft de beperking dat alleen organische stoffen die aanwezig zijn op de partikels worden aangeboden aan de biologische testsystemen. In werkelijkheid wordt op die manier een onderschatting gemaakt van de potentiële toxiciteit vb. metalen worden niet weerhouden in de organische extractie. Eventueel kunnen organische verbindingen van metalen wel weerhouden worden. Dit zou verder onderzocht moeten worden.
- Een andere optie is om een extractieprocedure uit te werken voor wateroplosbare contaminanten (zoals metalen) waar de biologische testen op kunnen uitgevoerd worden.

Fase III

De praktijkervaring met *in vitro* testen tijdens de 3^{de} fase van dit pilootproject heeft een ganse reeks van belangrijke mogelijkheden, tot voordelen aangetoond:

- De campagne werd succesvol uitgevoerd wat er nogmaals op wijst dat afstemming van effectgerichte studies met het bestaande VMM-meetnet mogelijk is.
- De beladen filters uit de testcampagne werden getest in de verschillende *in vitro* testsystemen. Effecten van de ASE-extracten en van het particulier materiaal konden gedetecteerd worden. De resultaten tonen aan dat de batterij van testen inderdaad vervuilde luchtstalen herkent en dat er zich in de stalen (combinaties van) potentieel schadelijke stoffen bevinden. De effecten zijn reeds opspoorbaar in particulier materiaal dat zich bevindt in een lucht volume van 20 m³, dit is het volume dat per dag wordt ingeademd door een standaard volwassen persoon.
- Mutagene activiteit werd in 77 van 88 filterextracten aangetoond. Het mutagene effect is dosis-afhankelijk. Voor de Ames test bedroeg het verschil tussen het laagste en het hoogste aantal revertanten/20 m³ lucht eq. dat gemeten werd in deze campagne een factor 15. In 2 stalen werd zelfs een activiteit teruggevonden die vergelijkbaar is met die van 5 µg benzo(a)pyreen.⁹
- Cytotoxische effecten van de partikel fractie van de bemonsterde filters werden gemeten in de humane bronchiale Beas-2B epitheliale cellijn en de macrofagen

⁹ Het kankerrisico voor benzo(a)pyreen (B(a)P) is 1 extra kankergeval per 100 000 personen, bij een levenslange blootstelling aan een concentratie van 0,12 ng/m³ (WHO, 2000).

THP-1 cellijn maar niet in de humane alveolaire A549 cellijn. Het cytotoxisch effect was concentratie-afhankelijk. De bronchiale cellen waren het meest gevoelig voor het cytotoxisch karakter van de partikels..

- Een inflammatoire respons werd gemeten in de humane macrofagen cellijn (THP-1) en de humane bronchiale epitheel cellijn (Beas-2B). De meerderheid van de stalen gaven een verhoogde TNF- α (in THP-1 cellen), il-6 en il-8 (in Beas-2B cellen) productie t.o.v. de blanco filters. De cytokine inductie was concentratie-afhankelijk. Il-8 werd niet geïnduceerd na blootstelling van de alveolaire epitheelcellen (A549).
- De gemeten inflammatoire respons kan niet verklaard worden door de gemeten endotoxine concentraties op de filters.
- Voor het eerst werd in Vlaanderen met behulp van de MELN-assay de aanwezigheid van stoffen met oestrogene activiteit in organische extracten van luchtfilters aangetoond. De relatieve inductie van oestrogene activiteit varieerde tussen 0.85 en 3.76 voor alle stalen.
- De resultaten van de humane genprofielingsassay (Cat-tox) toonden aan dat er unieke genexpressieprofielen werden gevonden per extract. De significante inducties van verschillende merkers van de Cat-tox assay toonden een verhoogde stressrespons na blootstelling aan organische extracten van een dagequivalent van 20 m³ lucht.

Aanbevelingen

- Inflammatoire parameters zouden regelmatig gemonitord moeten worden, immers effecten zijn te verwachten na acute blootstelling, piekblootstellingen zijn in dit geval belangrijk. Het lijkt niet nodig om de drie cellijnen hiervoor in te zetten. De voorkeur gaat uit naar het meten van inflammatoire merker TNF- α in de THP-1 cellijn (humane macrofagen) of il-6/il-8 in de Beas-2B cellijn (humane bronchiale epitheelcellen) De cytokine-inductie in deze laatste cellijn is echter laag (gemiddelde cytokine-inductie van respectievelijk 4.5 en 2.6) in vergelijking met TNF- α inductie (gemiddelde cytokine-inductie van 47). Een verdere optimalisatie van de Beas-2B assay met als doel de cytokineproductie te verhogen wordt daarom voorgesteld.
- Wanneer DNA-schade en biologische stress accumuleert is dit schadelijk voor de gezondheid. Deze metingen kunnen best uitgevoerd worden op organische extracten die gepoold worden over een tijdsspanne v.b. per seizoen.
- Het beeld dat we krijgen met MELN-test is hoogst interessant, nl de eerste keer hebben we een aanwijzing voor oestrogene activiteit in luchtstalen. Het is echter nog te vroeg om de test in te zetten in een meetnet, de logistiek moet beter worden uitgewerkt (aard van de filters), de reproduceerbaarheid en de betekenis van de waarneming moet nog verder worden onderzocht.
- In functie van de doestelling kunnen effectgerichte metingen op luchtstalen uitgevoerd worden op afzonderlijke stalen (24h monstername) of op gepoolde stalen;
 - Om een beter inzicht te krijgen in de determinanten voor variaties in de bioassays v.b. effecten van weersomstandigheden of de relatie met chemische parameters is het aanbevolen om geen mengstalen te maken van verschillende dagen.
 - Wanneer de vraagstelling gericht is op een globale inventarisatie per regio v.b. om de luchtkwaliteit in een regio te karakteriseren of om een link te kunnen leggen met gezondheid zouden stalen over bepaalde tijdsspannen kunnen gepoold worden. Simultaan kunnen volgende

aspecten uitgevoerd worden: humane biomonitoring, bevraging van de studiebevolking, inventarisatie van de dagelijkse sterftcijfers en ziekenhuisopnames.

Fase IV

Fase IV zocht in op de relatie tussen luchtvervuiling en de resultaten van de bioassays. In dit rapport werd het effect van de locatie onderzocht, werden tijdstrends geanalyseerd, werd de invloed van klimatologische omstandigheden geanalyseerd voor elk van de bioassays.

- Het mutageen, inflammatoir en hormoonverstorend profiel van de luchtstalen varieerde in functie van de locatie:
 - Gemiddeld genomen was er geen verschil in mutagene activiteit (direct en indirect) tussen de locaties, echter op bepaalde dagen werden significante verschillen tussen de locaties waargenomen. De hoogste mutagene effecten werden gemeten in de stalen afkomstig van Zelzate.
 - De filters afkomstig van Borgerhout vertoonden de hoogste inductie van TNF- α , il-6 en il-8 (Beas-2B cellijn).
 - De hoogste oestrogene activiteit werd aangetoond in de extracten afkomstig van Zelzate en Aarschot.
- Het toxicologisch profiel van de beladen filters varieerde sterk tussen de monsternamedagen met betrekking tot mutagene, cytotoxische, inflammatoire en hormoonverstorende potentie.
- Seizoensverschillen werden waargenomen in alle bioassays.
 - Een verhoogde mutagene en inflammatoire activiteit werd vastgesteld in de lente.
 - Genexpressieprofielen en oestrogene potentie waren verhoogd in de herfst.
- Er werden correlaties aangetoond tussen de biologische eindpunten en meteorologische parameters:
 - De mutagene activiteit correleerde met luchtmassa's afkomstig uit N/NW/W.
 - Een positieve correlatie werd vastgesteld tussen de omgevingstemperatuur en de inflammatoire en oestrogene potentie van de stalen.
- Sterk verhoogde mutagene en inflammatoire effecten werden niet alleen vastgesteld op dagen met overschrijding van de dagwaarden voor fijn stof maar ook op andere dagen. Niet enkel de hoeveelheid fijn stof is een bepalende factor voor het opwekken van een biologische respons, ook de chemische samenstelling van de partikels is belangrijk.
- Het bleek slechts in beperkte mate mogelijk om de waargenomen toxicologische effecten eenvoudig te verklaren door de aanwezigheid van chemische componenten.

Aanbevelingen

- Fijn stof is gevaarlijk voor onze gezondheid - zowel op korte als op lange termijn. Een simultane studie met toxicologische karakterisatie en gezondheidsonderzoek bij de bevolking zou het verband tussen luchtverontreiniging en korte termijn gezondheidseffecten verder kunnen bevestigen. Hiervoor komen vooral de metingen van inflammatoire markers in aanmerking. Relatie naar respiratoire

effecten zijn relevant om te onderzoeken. Met volgende eindpunten zouden verbanden kunnen worden gelegd om beter de relatie tussen luchtkwaliteit en gezondheidsschade te evalueren : effect-biomarker metingen inclusief niet-invasieve testen op uitgeademde lucht, bevraging van de studiepopulatie v.b. naar luchtwegklachten of verergering van astma, medicatiegebruik, ziekenhuisopnames, inventarisatie van de sterftcijfers,. Een dergelijke studie zou bijdragen om het voorspellend karakter van de inflammatoire testen voor korte termijn gezondheidseffecten beter in kaart te brengen. *Gezondheidsstudies uit Noord-Amerika en Europa leggen een verband tussen korte periodes van luchtvervuiling (24 uur) en gezondheidseffecten op korte termijn. Het aantal luchtwegklachten stijgt en leidt tot meer spoedopnamen. Luchtwegeninfecties en astma worden erger, mensen hoesten meer en het gebruik van geneesmiddelen die de luchtwegen verwijden neemt toe. Heel wat studies verbinden acute blootstelling aan fijn stof van PM_{10} en $PM_{2.5}$ ook met vervroegd overlijden. Dat is vooral het geval bij ouderen met hart- en longproblemen. Bij kinderen vermindert fijn stof de longfunctie bij TSP-concentraties boven de $180 \mu\text{g}/\text{m}^3$ of wanneer er meer dan $110 \mu\text{g}/\text{m}^3$ inadembare deeltjes (PM_{10}) zijn.* Door rechtstreeks inflammatie te meten i.p.v. hoeveelheid fijn stof, kan verwacht worden dat de blootstellingseffect relaties verfijnd worden.

- Onderzoek naar de relatie tussen biologische testen op stofdeeltjes en lange termijn gezondheidseffecten (carcinogenese, verhoogde incidentie van luchtwegproblemen (astma, COPD), verminderde longfunctie, hart- en vaatziekten,...) vraagt een andere aanpak. Alhoewel geen absolute risico's kunnen bepaald worden, kunnen er wel relatieve risico's worden ingeschat. Er zou een systeem kunnen uitgewerkt worden waarbij men de toxische potentie van de zwevende stof partikels uitdrukt als equivalent aan de toxische potentie van gekende longtoxische stoffen waarvan het risico voor de mens wel beter gekwantificeerd is.
- Voor wat betreft de mutagene, inflammatoire en hormoonverstorende testen is ook de gedifferentieerde respons per site belangrijk om verder uit te werken: welk toxicologisch profiel heeft een site v.b. in de buurt van industriële zones.
- De rol van weersomstandigheden en seizoensvariatie kunnen verduidelijkt worden d.w.z. stalen nemen op eenzelfde plaats in verschillende meteorologische omstandigheden
- Om te bepalen welke chemische determinanten verantwoordelijk zijn voor de waargenomen responsen moeten de toxicologische gegevens vergeleken worden met de chemische karakteristieken van de stofdeeltjes. Deze studie heeft aangetoond dat een aantal aspecten nog verbeterd kunnen worden en verder dienen te worden onderzocht
- De rijke dataset kan nog verder met meer complexe statistische technieken onderzocht worden. Zo zou het nuttig zijn om de relatie tussen chemische componenten, locatie en bioassays verder uit te werken o.a. met behulp van Principal Component Analyse en discriminantanalyse.

9 Aanbevelingen voor de ontwikkeling van een effectgericht meetnet voor evaluatie van stofdeeltjes

In de LNE voorstudie (Witters et al., 2005) werd de vraag gesteld of effectgerichte metingen op luchtstalen inzetbaar zouden zijn voor verschillende scenario's:

- Scenario 1 = voor het inschatten op korte termijn van gezondheidsrisico's samenhangend met een (lokaal) incident of met bijzondere weers- of andere omstandigheden. Dit past onder meer in een rampenplan.
- Scenario 2 = lange termijn scenario of geïntegreerde monitoring van milieukwaliteit als effectgericht bewakingssysteem, v.b. scenario voor monitoring of trendanalyse.
- Scenario 3 = voor een diepgaand onderzoek naar mogelijke problemen voor humane gezondheid

Het pilootproject met de behaalde resultaten heeft aangetoond dat de effectgerichte metingen op luchtstalen inzetbaar zijn voor scenario 2. De opzet en de uitwerking van deze pilootstudie was niet van die aard om op basis van huidige resultaten de verwachtingen voor scenario 1 en/of scenario 3 afdoende in te vullen. Dit sluit echter niet uit dat effectgerichte metingen voor deze scenario's kunnen ingezet worden.

Met betrekking tot inzetbaarheid voor scenario 2 hebben we duidelijk aangetoond dat de biologische testen een toxicologisch beeld van de verzamelde partikels geven d.w.z. de *in vitro* testresultaten duiden op het potentieel gevaar. Zelfs in stalen die equivalent zijn aan een ademvolume van 1 dag (20m³) kunnen biologische effecten worden opgespoord.

De relatie met het absolute gezondheids risico voor de mens is moeilijker te leggen op dit moment o.a. omdat we . nog geen dataset hebben van effectgerichte metingen waarmee we gezondheidseffecten kunnen relateren. Het feit dat er effecten werden gemeten geeft aan dat de partikels en/of de chemische componenten biobeschikbaar zijn voor de gebruikte bioassays. Door gebruik te maken van o.a. humane luchtwegcellen kan een betere inschatting gemaakt worden van de luchtweggerelateerde gezondheidseffecten.

Al kunnen de *in vitro* resultaten niet rechtstreeks gerelateerd worden naar absolute gezondheidsrisico's voor de mens, toch geeft een respons in een *in vitro* test aan dat er zich in het staal (combinaties van) potentieel schadelijke stoffen bevinden en geeft aan welk type van effecten we kunnen verwachten op populatieniveau.. Deze signaalfunctie kan dan ook een belangrijk instrument zijn in de monitoring van de luchtkwaliteit en voor monitoring van gezondheidseffecten. Bovendien kunnen we de toxische potentie van stalen onderling vergelijken en op die manier kunnen relatieve risico's worden geëvalueerd.

In functie van deze doeleinden kunnen effectgerichte metingen op luchtstalen ingezet worden volgens een verschillende opzet van meetcampagnes.

1. Monitoring van de luchtkwaliteit via bemonstering van stofdeeltjes

De effectgerichte metingen kunnen gebruikt worden in een meetnet met als doel de gegevens over algemene luchtkwaliteit in Vlaanderen aan te vullen met informatie over het toxicologische profiel van de deeltjes in de lucht. De luchtkwaliteit voor een gegeven locatie kan toxicologische worden gekarakteriseerd. Men kan een

onderscheid maken tussen de luchtverontreiniging op verschillende locaties o.a. landelijke, industriële en stedelijke regio's. Door gedurende lange periodes op vaste plaatsen te meten kunnen historische datareeksen per locatie vastgelegd worden en kan de evolutie van de luchtkwaliteit opgevolgd worden. Dit zou moeten toelaten om onder "normale" omstandigheden referentiewaarden (normaalwaarden, piekwaarden en dagdagelijkse variabiliteit) voor bepaalde locaties binnen Vlaanderen vast te leggen. Door een continue controle van de luchtkwaliteit kunnen trends in de tijd opgevolgd worden.

In het kader van een eerstelijnsmonitoring kunnen de biologische testen beschouwd worden als 'bewakingssysteem' met een belangrijke alarmfunctie inzake luchtkwaliteit. Doordat de biotesten ook mengseltoxiciteit meten bieden ze een toegevoegde waarde bij de huidige fysisch-chemische monitoring van de luchtkwaliteit. Een lange termijn trend monitoring met een basisset van effectmetingen, simultaan en complementair aan huidige meetnetten is vereist om referentie- en drempelwaarden voor elk van de biologische testen te definiëren. Het gelijktijdig inventariseren van gezondheidseffecten (v.b. bevraging van de bevolking, hospitaalopnames,...) kan de voorspelbaarheid van de biotesten voor gezondheidsschade beter in kaart brengen en hulp bieden bij het vastleggen van referentie- en drempelwaarden. Op basis hiervan zullen test-specifieke criteria toelaten een situatie als uitzonderlijk te beoordelen. De referentiewaarde kan berekend worden op basis van het gemiddelde van de meetresultaten van een lange periode (minstens één jaar) op meerdere plaatsen binnen Vlaanderen. Drempelwaarden kunnen enerzijds berekend worden via het bepalen van de P₉₀ waarde of anderzijds op basis van de relatie met gezondheidseffecten. De berekende P₉₀ drempelwaarde heeft niet noodzakelijk een gezondheidsgerelateerde betekenis. Bij uitzonderlijke situaties kunnen ook andere (meer gespecialiseerde) biotesten in combinatie met chemische identificatie ingezet worden om oorzaken of bronnen op te sporen.

De vereiste samplingmethode voor een effectgericht meetnet is cruciaal opdat voldoende staalvolume zou kunnen worden afgeleverd zodat de batterij van biotesten op dezelfde stalen kan gebeuren. Een dergelijk effectgericht meetnet kan daarom best afgestemd worden op het bestaande VMM 'meetnet organische metingen' dat de concentraties van vluchtige organische stoffen, PAK en nitro-PAK in de lucht onderzoekt. Dit meetnet maakt gebruik van high volume samplers met een debiet van 900 l/min (54m³/h). Deze grootvolume monsterneming is noodzakelijk om voldoende lucht (in de vorm van TSP) te bemonsteren om de batterij van *in vitro* testen uit te voeren. De effectgerichte testen kunnen uitgevoerd worden op de verzamelde partikels en/of op organische extracten van de bemonsterde filters.

Op basis van de resultaten van het uitgevoerde pilootproject worden voor het testen van de organische extracten van beladen filters, twee testen als basisset voorgesteld: 1) Ames test en 2) Cat-tox test. De MELN test, hoewel relevant voor het eindpunt hormoonverstoring, werd voorlopig niet weerhouden omdat de resultaten aantoonde dat er nog enige bijkomende optimalisatie vereist is op vlak van monsternamen (b.v. positief achtergrondsignaal in de blanco filters te reduceren). De basistesten hebben, zoals bleek uit het uitgevoerde pilootproject, een aantal belangrijke voordelen:

- Beide testen geven een vrij volledig beeld van genotoxiciteit, oxidatieve stress en DNA-schade.
- De Ames test wordt aanzien als de standaardtest voor genotoxiciteit. Cat-tox heeft in deze basisset dan weer een meerwaarde als humaan *in vitro* systeem voor diverse stressgerelateerde eindpunten.

- Beide testen kunnen uitgevoerd worden na bemonstering op teflon filters die geschikt zijn voor gebruik in high volume samplers.
- Er kan overwogen worden om voor deze metingen stalen te poolen vb per seizoen. Immers accumulatie van DNA schade en van biologische stress zijn belangrijke factoren voor gezondheidseffecten. Piekblootstellingen zijn waarschijnlijk minder interessant voor de chronische effecten die optreden ten gevolge van DNA schade of biologische stress.

Als basistest voor het testen van de partikelfractie wordt een immunotoxiciteitstest voorgesteld. De voorkeur gaat uit naar het meten van de inflammatoire merker TNF- α in de THP-1 cellijn (humane macrofagen) of il-6/il-8 in de Beas-2B cellijn (humane bronchiale epitheelcellen) Deze laatste cellijn is gevoeliger voor het cytotoxische karakter van de partikels. De cytokine inductie in deze cellijn is echter laag (gemiddelde cytokine-inductie van respectievelijk 4.5 en 2.6) in vergelijking met de TNF- α inductie, in THP1 cellen (gemiddelde cytokine-inductie van 47). Naar *in vivo* relevantie zijn deze bronchiale cellen daarentegen interessanter. Stofdeeltjes kunnen ook componenten bevatten van biologische oorsprong, zoals bacteriën, endotoxines, sporen en pollen/pollenfragmenten. Vooral de endotoxines, afkomstig van gram-negatieve bacteriën, zijn potente inducers van inflammatoire responsen. Het is aanbevolen om naast endotoxine metingen eventueel ook pollenmetingen uit te voeren op de bemonsterde luchtstalen. Op die manier kan er een onderscheid gemaakt worden tussen biologische agentia of chemische agentia die een inflammatoire respons opwekken.

In een routinematige set-up kunnen de biotesten relatief snel (10-15 werkdagen) worden uitgevoerd. Vermits gezondheidseffecten ten gevolge van inflammatoire stress vooral zullen optreden na acute blootstelling, lijkt het aangewezen om deze metingen op frequente basis uit te voeren, piekblootstellingen zijn belangrijk.

Het toxicologische profiel van de luchtstalen varieert sterk in functie van plaats en tijd (v.b. Voor de Ames test bedroeg het verschil tussen het laagste en het hoogste aantal revertanten /20m³ lucht eq. dat gemeten werd in deze campagne een factor 15. Voor de inductie van de inflammatoire merker TNF- α bedroeg dit verschil zelfs een factor 50.). Bioassays met een steil dosis- antwoord verband laten beter toe om differentiële toxiciteit op te sporen.

Of individuele stalen moeten worden geanalyseerd of dat er mengstalen moeten worden aangemaakt hangt vooral af van de vraagstelling. Om een inzicht te krijgen in determinanten van variatie in de biologische respons is het beter om geen mengstalen te maken. Wanneer de vraagstelling gericht is op karakterisatie van de luchtkwaliteit in een regio of vb nabij een industriële installatie zou over bepaalde tijdspannes kunnen gepoold worden.

In functie van de doelstelling en de beschikbare middelen dient het aantal staalnameplaatsen en -dagen bepaald worden. Bij voorkeur worden meetplaatsen met diverse aard van vervuiling opgenomen en worden de bemonsteringsdagen verspreid over de verschillende seizoenen. Om de relatie naar gezondheidsaspecten beter te kunnen evalueren gaat de voorkeur uit naar meetplaatsen met een voldoende grootte qua bevolkingsdichtheid.

2. Monitoring van de luchtkwaliteit in probleemgebieden of bij acute situaties

De voornoemde biologische testen kunnen ook toegepast worden voor het inschatten van de schadelijkheid van de lucht in 'hotspots' (vb een plaatselijk incident of bijzondere omstandigheden). In dergelijke situaties kan het inzetten van effectgerichte metingen een meerwaarde bieden naast de chemische analyses. Het optreden van een schadelijk effect van een complex mengsel kan zelden beschreven worden als de som van de effecten van voorkomende stoffen (synergistische, additieve,... effecten). De klassieke analytische technieken sporen enkel bekende stoffen op. De bioassays geven een globaal toxicologisch profiel van de verzamelde partikels en geven daarom meer informatie over hun mogelijk schadelijke effect voor de mens. Ze zijn eveneens richtinggevend voor de aard van schadelijke effecten die te verwachten zijn (early warning). De effectgerichte tests kunnen als screening gehanteerd worden om eventueel verdergaand onderzoek naar enerzijds gezondheidseffecten en anderzijds bronnen van vervuiling vooraf te gaan.

Afhankelijk van de beschikbare bemonsteringstoestellen kunnen verschillende biologische testen ingezet worden in dit rampenscenario.

Als de aard van de vervuiling onbekend is, kan de Cat-tox test uitgevoerd worden op organische extracten van bemonsterde lucht. De eindpunten in de volledige Cat-tox zijn gekozen om een representatief beeld te krijgen van de meest significante stressgerelateerde effecten (genotoxiciteit, oxidatieve stress, proteïne opvouwing, DNA-schade, xenobiotische biotransformatie). De biologische effecten die op de partikelfractie kunnen bepaald worden omvatten mutageniciteit, immunotoxiciteit (inflammatie) en systemische toxiciteit (cytotoxiciteit).

3. Bepalen van de specifieke bijdrage van fysische of chemische karakteristieken van zwevend stof of klimatologische gegevens tot de gemeten toxiciteit

Het negatieve effect van luchtverontreiniging door fijn stof op de menselijke gezondheid wordt algemeen erkend. Het mechanisme waardoor deze ingeademde stofdeeltjes onze gezondheid aantasten is echter nog steeds niet duidelijk. Verschillende eigenschappen van de stofdeeltjes, zoals grootte en de samenstelling, spelen hierin een rol. TSP, PM10 en PM2.5 verschillen in hun toxicologische potentie waarbij de kleinere deeltjes het meest schadelijk zijn. Hoe kleiner de deeltjes worden, des te dieper ze in de longen kunnen doordringen en des te groter ook de specifieke oppervlakte wordt en de mogelijkheid voor allerlei chemische agentia om aan de deeltjes te adsorberen. Ook vanuit de regelgeving verschuift de aandacht naar het reglementeren van de fijne deeltjes (<2.5µm) ("Second Position Paper on Particulate Matter" van de CAFE Working Group on Particulate Matter, draft versie van 20 augustus 2003).

Toxicologische karakterisatie van stofdeeltjes kan ertoe leiden dat we een onderscheid zouden kunnen maken tussen erg gevaarlijke en minder gevaarlijke stofdeeltjes. Nu concentreren de beleidsmaatregelen zich vooral op het verminderen van de totale hoeveelheid gemeten fijn stof, terwijl de belading erg bepalend kan zijn voor het gezondheidseffect dat zij teweeg kunnen brengen. De huidige normen voor PM10¹⁰ en

¹⁰ Op 21 november 1996 werd de Kaderrichtlijn 96/62/EG gepubliceerd, die de basis vormt voor het luchtkwaliteitsbeleid binnen de Europese Gemeenschap. Volgend op de kaderrichtlijn werden specifieke richtlijnen opgesteld voor een aantal prioritaire luchtvervuilende componenten. In de eerste Dochterrichtlijn 1999/30/EG zijn grenswaarden voor zwaveldioxide, stikstofdioxide en stikstofdioxiden,

PM2.5¹¹ zijn gebaseerd op massaconcentraties. Het verder opbouwen van de kennis omtrent het toxicologisch profiel van partikels zou een efficiënter beleid (o.a. de te normeren fracties van zwevend stof, vastleggen van drempelwaarden) mogelijk kunnen maken om de gevolgen van fijn stof voor de volksgezondheid te reduceren. Het is belangrijk om alle mogelijke scenario's van reducties te onderzoeken en na te gaan welke reducties ook effectief een vermindering van toxische effecten zal teweeg brengen. De combinatie van biologische effectmetingen en chemische metingen kunnen ingezet worden om nieuwe beleidsnormen, reductiemaatregelen of interventies te evalueren.

Een van de onderzoeksprioriteiten om beleidsbeslissingen met betrekking tot fijn stof te verbeteren is gericht op het determineren van de risico's en de belangrijkste schadelijke componenten aanwezig op het zwevend stof. De biologische effectmetingen kunnen een bijdrage leveren om te identificeren welke fysische (grootte, aantal) of chemische karakteristieken (PAKs, metalen,...) van zwevend stof verantwoordelijk zijn voor het gevonden biologische effect. Het biologisch onderzoek laat toe het belang van de effecten van de verschillende fracties van zwevend stof te onderzoeken. Via specifieke bemonstering (high volume cascade impactor met slit nozzle impactor) kunnen verschillende fracties (op basis van deeltjesgrootte) bemonsterd worden (Steerenberg *et al.*, 2006).

In deze pilootstudie werden de resultaten van de toxiciteitstesten vergeleken met de chemische meetresultaten van meetposten die stalen nemen op dezelfde locaties en tijdstippen. De gebruikte bemonstering- en extractiemethode in deze pilootstudie waren verschillend in functie van het einddoel v.b. chemische karakterisatie versus biologische testen. Voor de PAKs analyse gebeurde de monsterneming op een absorptie buisje (PDMS/Tenax) bij laag debiet (150 ml/min) gevolgd door thermische desorptie en rechtstreekse GC-MS analyse. De elementanalyses en de elementaire en organische koolstof metingen werden uitgevoerd na PM10 bemonstering op een kwartfilter. Voor de biologische testen werd gebruik gemaakt van TSP bemonstering op teflon filters. De organische componenten op de partikels werden geëxtraheerd via de ASE methode. Om een betere vergelijking mogelijk te maken tussen de toxicologische effecten en de chemische karakteristieken van de stofdeeltjes zouden beiden methoden beter op elkaar afgestemd moeten worden. Bij voorkeur maar indien mogelijk (cfr. toxiciteit van filtermateriaal in de biologische testen) worden de chemische metingen en de biologische testen uitgevoerd op dezelfde filters, en alleen

zwevende deeltjes en lood in de lucht opgenomen. Sinds 1 januari 2005 mag voor PM10 de daggrenswaarde van 50 µg/m³ niet meer dan 35 keer per jaar overschreden worden. De jaargrenswaarde voor PM10 ligt sindsdien op 40 µg/m³. In 2008 wordt de "Richtlijn van het Europees parlement en de Raad betreffende de luchtkwaliteit en schonere lucht voor Europa" van kracht, welke de kaderrichtlijn en de eerste drie dochterrichtlijnen bundelt en herziet. Hierin blijven voor PM10 bovenstaande grenswaarden van kracht.

¹¹ Voor PM2,5 zijn er momenteel nog geen Vlaamse of Europese grenswaarden. In de te publiceren richtlijn "Richtlijn van het Europees parlement en de Raad betreffende de luchtkwaliteit en schonere lucht voor Europa(CAFE)" wordt een jaargemiddelde PM2,5-concentratie geregeld in 3 fasen: tegen 1 januari 2010 25 µg/m³ als streefwaarde, tegen 1 januari 2015 25 µg/m³ als grenswaarde en tegen 2020 20 µg/m³ als indicatieve grenswaarde. Daarnaast wordt er tegen 2020 een streefwaarde inzake vermindering van de blootstelling ten opzichte van 2010 of 2011 gedefinieerd. Hiertoe wordt een gemiddelde blootstellingindex (GBI) gedefinieerd, dit is de gemiddelde PM2,5-concentratie van alle stedelijke achtergrondstations over de laatste 3 jaar binnen een bepaalde lidstaat. Een vermindering van 20% wordt vooropgesteld. Daarnaast dient tegen 2020 ernaar gestreefd te worden dat de GBI maximaal 18 µg/m³ bedraagt. Voor 2015 wordt een grenswaarde voor de GBI van 20 µg/m³ vastgelegd.

dan kan met zekerheid de complementariteit en de gedeeltelijke overlap qua meetgegevens aangetoond worden.

Voor een toxicologisch meetnet met als doel het bepalen van de specifieke bijdrage van fysische of chemische karakteristieken van zwevend stof tot de gemeten toxiciteit, zou afstemming op een meetnet met PM10 of beter nog PM2.5 bemonstering de voorkeur genieten. In Vlaanderen zijn er twee grote meetnetten waarbinnen PM10, PM2.5 en zwarte rook wordt gemeten. Het telemetrisch meetnet omvat landelijke, voorstedelijke, stedelijke en industriële stations en heeft als doel de algemene luchtkwaliteit in Vlaanderen te meten. Het meetnet “specifieke studies” meet voornamelijk dezelfde stoffen als het telemetrisch meetnet, maar dan vlakbij probleemgebieden.

PM10 en PM2.5 bemonstering maakt gebruik van lage volume bemonstering. Met een capaciteit van 55m³/dag, is het bemonsterd staalvolume echter ontoereikend voor het uitvoeren van de basisset (Ames-test en Cat-tox test) op organische extracten zoals beschreven voor de geïntegreerd monitoring van de luchtkwaliteit. Blootstellingconcentraties die overeenkomen met dagequivalenten (geschatte hoeveelheid ingeademde lucht/24uur) worden namelijk aanbevolen in een effectgerichte evaluatie van luchtpollutie. Om een hoogste blootstellingconcentratie te bekomen van een dagequivalent van 20m³ lucht, is voor een volledige Cat-tox test een volume van 250µl van 2000m³/ml (100% DMSO) nodig. Voor de lage volume bemonstering komen we echter maar aan een volume van 83m³/ml of 2000m³/40µl. Er kan eventueel wel afgestapt worden van de dagequivalent-concentraties, doch de bekomen effecten zijn dan niet meer representatief voor een dagblootstelling en zullen bovendien gevoelig lager liggen. In de Ames test werden er significante mutagene effecten waargenomen bij concentraties van 5m³ lucht equivalent.

De biologische effecten van de partikels die in dergelijke studie kunnen worden gemeten omvatten cytotoxiciteit, immunotoxiciteit (inflammatie) en mutageniciteit. Daar de toxiciteit van de fijne partikels hoger is, kan de blootstelling gebeuren met minder materiaal.

Ook de invloed van meteorologische omstandigheden op de luchtkwaliteit kan bestudeerd worden. In dit kader zou het opvolgen van temperatuursveranderingen in de context van ‘global warming’ aan belang kunnen winnen. Immers in dit pilootproject werd aangetoond dat het toxicologische profiel (immunotoxisch en oestrogeen-actieve potentie) van de bemonsterde filters wijzigt in functie van de temperatuur. Temperatuursverhogingen kunnen de chemische processen in de lucht met de verspreiding van pollutanten kunnen beïnvloeden en daardoor het toxische karakter van het zwevend stof veranderen. Door een relatie te leggen tussen de toxiciteit van de deeltjes en de windsnelheid en windrichting, kan nagegaan worden uit welke richting de meest toxische vervuiling komt. Op die manier kunnen bronnen mee worden opgespoord.

4. Betere inschatting van de gezondheidsrisico's geassocieerd met lokale luchtkwaliteit

Effectgerichte metingen op luchtstalen kunnen ingezet worden om een betere inschatting te maken van de gezondheidsrisico's geassocieerd met lokale luchtkwaliteit. Alhoewel we geen absolute gezondheidsrisico's kunnen inschatten momenteel (daarvoor ontbreken oa. achtergrondgegevens) kunnen we toch relatieve

risico's inschatten door vb stalen van verschillende locaties te vergelijken of door stalen van verschillende tijdstippen te vergelijken. Het verdient aanbeveling de metingen te standardiseren naar massa. Dit laat toe om het toxicologisch profiel van verschillende stalen beter te vergelijken. Door in tweede instantie rekening te houden met de partikelconcentratie per m³ lucht kan bijkomend het toxisch potentieel per m³ lucht worden aangegeven. Wanneer de resultaten van de bioassay vergeleken worden met een positieve controle v.b. respons op 5 µg benzo-a-pyreen in de Ames test, dan kan de risico inschatting v.b. van het kankerverwekkend vermogen beter onderbouwd worden.

De kwaliteitsbeoordeling van lucht met betrekking tot humane blootstelling gebeurt momenteel via een stofgerichte aanpak waarbij de mate van verontreiniging aan de hand van chemische analyses wordt beoordeeld. De VMM controleert voortdurend de kwaliteit van de lucht door de aanwezigheid van (weliswaar een beperkt gamma) schadelijke stoffen in de omgevingslucht te meten (<http://www.vmm.be/lucht>). Op basis van blootstellingmodellen heeft de overheid (Europese Unie en het Vlaamse gewest) grens- en richtwaarden vastgelegd per vervuilende stof. Deze benadering houdt geen rekening met mengseltoxiciteit. Effectgerichte metingen zijn een instrument om aan dergelijke problemen tegemoet te komen dankzij de geïntegreerde evaluatie van de potentiële schade van aanwezige stoffen in een complexe matrix, zoals een luchtmengsel. De biologische testen geven een globaal toxicologisch profiel van de omgevingslucht. In deze pilootstudie, maar ook in andere studies bleek het niet altijd mogelijk om de waargenomen biologische effecten eenvoudig te verklaren door de aanwezigheid van de componenten die chemisch werden gemeten. Dit impliceert mogelijks de effecten van mengseltoxiciteit of van aanwezige stoffen met potentieel schadelijke werking die geen deel uitmaken van het courante chemische meetnet. Dit is ondermeer zeer waarschijnlijk voor een aantal chemische stoffen met een hormoonversturende werking.

Hoewel het vaststaat dat blootstelling aan luchtpollutie een risico kan inhouden voor de humane gezondheid, blijven leemtes in de identificatie van mechanismen die aan de basis liggen van de epidemiologische waargenomen effecten bestaan. Een systematische studie waarbij het epidemiologisch onderzoek wordt gekoppeld aan een grondige analyse van het type vervuiling is daarom belangrijk. Verschillende toxicologische studies tonen aan dat het aantal deeltjes en de grootte van de deeltjes belangrijker zijn voor het veroorzaken van biologische responsen dan de massaconcentratie. In dit kader zou het interessant zijn om de massaconcentratie (die gemeten wordt in verschillende meetnetten), deeltjesconcentratie en toxiciteit van de PM10 fracties te analyseren en deze gegevens te enten op een epidemiologische studie die in dezelfde, bij voorkeur langere periode en regio van monsternames wordt uitgevoerd. Deze opzet is zeker nuttig daar strengere emissienormen waarschijnlijk zullen leiden tot een emissiereductie van "grotere" stofdeeltjes met a.d. 10-2.5 µm, doch de fractie ultrafijne partikels (0.1 µm), die verantwoordelijk is voor de meest uitgesproken biologische effecten en die geen significante fractie van de massa vertegenwoordigt, zal niet verdwijnen.

Om de toxicologische profielen van de lucht te combineren met gezondheidseffecten zou er nauw samengewerkt kunnen worden met het Steunpunt Milieu & Gezondheid. De keuze van de bemonsteringssites en tijdstippen of periodes in functie van gezondheidsonderzoek zou het verband tussen luchtverontreiniging en schadelijke gezondheidseffecten beter kunnen aantonen. Binnen het Steunpunt zullen cases of aandachtgebieden gedefinieerd worden waar humane biomonitoring zal uitgevoerd

worden. In deze probleemgebieden kan gelijktijdig met het gezondheidsonderzoek (biomarkermetingen, bevraging van de studiepopulatie, dagelijkse sterftcijfers en ziekenhuisopnames) PM10 bemonsterd worden. Afhankelijk van de aard van de vervuiling en in functie van de gezondheidsklachten kunnen biotesten geselecteerd worden om uitgevoerd te worden op de bemonsterde luchtstalen. De toxiciteitstesten in de pilootstudie werden geselecteerd mede op basis van een gekende relatie tussen de gemeten eindpunten *in vitro* en de toxische werkingsmechanismen van polluenten *in vivo* bij de mens. Ook in de stedelijke gebieden, waar de prevalentie van astma hoger is dan in de landelijke gebieden, zou het nuttig zijn om luchtstalen te onderwerpen aan het meten van v.b. inflammatoire markers om na te gaan of er een correlatie is met de gezondheidsklachten.

5. Onderzoek naar toxiciteit van ultrafijne deeltjes (PM0.1)

De ultrafijne deeltjes worden momenteel naar voren geschoven als de meest waarschijnlijke factor die verantwoordelijk is voor de geobserveerde gezondheidseffecten bij de huidige omgevingsconcentraties. Deze ultrafijne deeltjes zijn voornamelijk afkomstig van lokale verbrandingsprocessen). Er zijn een aantal factoren die suggereren dat de ultrafijne deeltjes inderdaad meer toxisch zijn dan de grotere deeltjes. Immers er zijn de verschillende depositiepatronen van ultrafijne deeltjes in de long en de grotere specifieke oppervlakte van de deeltjes waardoor ze ook meer toxische stoffen zoals organische stoffen, metalen, vrije radicalen en gassen kunnen adsorberen en meevoeren naar de diepere luchtwegen.

Het “expert panel on air quality standards” concludeert in zijn rapport dat PM10 als standaard voorlopig volstaat, maar dat verder onderzoek op het meten en evalueren van ultrafijne deeltjes zeker noodzakelijk is (DETR-EPAQS, 2001).

Effectgerichte metingen kunnen een belangrijk hulpmiddel zijn om het schadelijke karakter van deze ultrafijne partikels beter in te schatten.

In het kader van een adequate en betaalbare effectmonitoring van Vlaanderen is de frequentie van de bemonstering voor stofdeeltjes en de keuze van biologische testen belangrijk. Hierna wordt een overzicht gegeven van de verschillende items waarmee rekening moeten gehouden bij het opmaken van een budget voor een geïntegreerd biologisch meetnet.

- Biologische testen

Salmonella mutageniciteitstest

€ 145 per staal (indien 10 stalen simultaan worden getest) (3 concentraties en nodige controles zonder S9)

Voorstel: poolen van de stalen per seizoen

Cat-tox

De kostprijs is relatief hoog, waardoor massaal en intensief testen waarschijnlijk niet te verantwoorden is vanuit financieel perspectief.

De kostprijs voor het uitvoeren van een Cat-tox met de 13 eindpunten, zoals gebruikt in dit project, is € 500. Dit houdt in het testen van de verschillende verdunningen, de blanco's en de nodige replicaten voor één staal. Hierbij wordt het meest complete beeld verkregen van de potentiële stress-gerelateerde effecten.

Omwille van economische overweging kan eventueel een 'mini-Cat-tox' uitgevoerd worden. De meest indicatieve eindpunten kunnen geselecteerd worden op basis van resultaten uit deze effectstudie. Volgende genen kunnen in deze studie als meest indicatief worden beschouwd voor luchtpollutie: Cyp1A1, Xre, GstYa, Fos, Gadd45 en Grp78. Dit is duidelijk een tweede optie, omdat de eindpunten in de volledige Cat-tox als dusdanig zijn gekozen om een representatief beeld te krijgen van de meeste stress-gerelateerde effecten (genotoxiciteit, oxidatieve stress, defecte proteïne opvouwing, DNA schade, xenobiotische biotransformatie). De kostprijs hiervan bedraagt 300€.

Door gebruik te maken van een commercieel ELISA detectiesysteem heeft dit een gevoelige weerslag op de prijs. In de toekomst zal door het gebruik van nieuwe detectiesystemen, mogelijks deze prijs dalen. Wegens wetenschappelijke confidentialiteit kan hier momenteel echter niet dieper op ingegaan worden.

voorstel: poolen van de stalen per seizoen

Cytotoxiciteit en immunotoxiciteit

Cytotoxiciteitstest op 1 cellijn (5 testconcentraties en controles): € 180 per staal (indien er 10 stalen gelijktijdig worden getest)

Immunotoxiciteitstest (bepaling van 1 cytokine via Elisa): € 445 (voor 16 stalen)

Voorstel: frequent meten in relatie met analyse van gezondheidseffecten en gezondheidsklachten.

Oestrogene potentie op extracten van luchtfilters (MELN test)

- Meting van oestrogene en anti-oestrogene activiteit, simultaan met cytotoxiciteit bij 3 testconcentraties met positieve controles en filterblanco: 243 €/staal mits 4 stalen simultaan worden getest.
- Er is ook de optie (gezien huidige resultaten) om enkel oestrogene activiteit simultaan met cytotoxiciteit bij 3 testconcentraties met positieve controles en filterblanco te testen: 122 €/staal mits 8 stalen simultaan worden getest.

Voorstel: optimaliseren van teststysteem vooraleer opname in meetnet

Endotoxine bepaling

€ 120 per staal

€ 600 indien 25 stalen simultaan

- Kostprijs van de filters

Afhankelijk van de grootte en het materiaal van de filters kan de kostprijs verschillen. De prijs van de teflon gecoat glasvezelfilters (Membraan filters-PTFE, TE 38, Ø 150 mm) die gebruikt werden in dit pilootproject bedroeg € 701/25filters (prijs 2008)

- Extracties

Extra manuren moeten voorzien worden voor het uitvoeren van de organische extracties en het verzamelen van de partikels van de filters. De tijd nodig voor het uitvoeren van de ASE en de methanol extractie bedraagt respectievelijk € 100 en € 130 per staal.

- Personeel voor logistieke ondersteuning

Extra manuren moeten voorzien worden voor het plaatsen en het ophalen van de filters op de meetstations. De personeelskost is afhankelijk van het aantal meetplaatsen en de frequentie van de bemonstering.

- Bemonsteringstoestellen

Afhankelijk van de doelstelling van de studie moet er ook rekening mee worden gehouden dat er nieuwe toestellen moeten worden aangekocht b.v. toestellen voor simultane bemonstering voor chemische en biologische analyses of een high volume cascade impactor voor het verzamelen van deeltjes van verschillende grootte.

10 Referenties

- Afshari, C. A., Bivins, H. M., and Barrett, J. C. (1994). Utilization of a fos-lacZ plasmid to investigate the activation of c-fos during cellular senescence and okadaic acid-induced apoptosis. *J Gerontol* **49**, B263-269.
- Alfaro-Moreno, E., Martinez, L., Garcia-Cuellar, C., Bonner, J. C., Murray, J. C., Rosas, I., Rosales, S. P., and Osornio-Vargas, A. R. (2002). Biologic effects induced in vitro by PM10 from three different zones of Mexico City. *Environ Health Perspect* **110**, 715-720.
- Baeza-Squiban, A., Bonvallet, V., Boland, S., and Marano, F. (1999). Airborne particles evoke an inflammatory response in human airway epithelium. Activation of transcription factors. *Cell Biol Toxicol* **15**, 375-380.
- Bakand, S., Winder, C., Khalil, C., and Hayes, A. (2005). Toxicity Assessment of Industrial Chemicals and Airborne Contaminants: Transition from In Vivo to In Vitro Test Methods: A Review. *Inhalation Toxicology* **17**, 775.
- Becker, S., Dailey, L. A., Soukup, J. M., Grambow, S. C., Devlin, R. B., and Huang, Y. C. (2005a). Seasonal variations in air pollution particle-induced inflammatory mediator release and oxidative stress. *Environ Health Perspect* **113**, 1032-1038.
- Becker, S., Mundandhara, S., Devlin, R. B., and Madden, M. (2005b). Regulation of cytokine production in human alveolar macrophages and airway epithelial cells in response to ambient air pollution particles: Further mechanistic studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* **207**, 269.
- Berckmans, P., Leppens, H., Vangenechten, C., and Witters, H. (2007). Screening of endocrine disrupting chemicals with MELN cells, an ER-transactivation assay combined with cytotoxicity assessment. *Toxicol In Vitro* **21**, 1262-1267.
- Berico, M., Luciani, A., and Formignani, M. (1997). Atmospheric aerosol in an urban area--measurements of TSP and PM10 standards and pulmonary deposition assessments. *Atmospheric Environment* **31**, 3659.
- Bernstein, H., Payne, C. M., Bernstein, C., Schneider, J., Beard, S. E., and Crowley, C. L. (1999). Activation of the promoters of genes associated with DNA damage, oxidative stress, ER stress and protein misfolding by the bile salt, deoxycholate. *Toxicol Lett* **108**, 37-46.
- Binkova, B., Cerna, M., Pastorkova, A., Jelinek, R., Benes, I., Novak, J., and Sram, R. J. (2003). Biological activities of organic compounds adsorbed onto ambient air particles: comparison between the cities of Teplice and Prague during the summer and winter seasons 2000-2001. *Mutat Res* **525**, 43-59.
- Brits, E., Schoeters, G., and Verschaeve, L. (2004). Genotoxicity of PM10 and extracted organics collected in an industrial, urban and rural area in Flanders, Belgium. *Environ Res* **96**, 109-118.
- Brook, J. R., Dann, T. F., and Burnett, T. (1997). The relationship among TSP, PM[10], PM[2.5], and inorganic constituents of atmospheric particulate matter at multiple Canadian locations. *Journal of the Air & Waste Management Association* **47**, 2-19.
- Brunekreef, B., and Holgate, S. T. (2002). Air pollution and health. *The Lancet* **360**, 1233.
- Buschini, A., Cassoni, F., Anceschi, E., Pasini, L., Poli, P., and Rossi, C. (2001). Urban airborne particulate: genotoxicity evaluation of different size fractions by mutagenesis tests on microorganisms and comet assay. *Chemosphere* **44**, 1723-1736.

- Carter, J. D., Ghio, A. J., Samet, J. M., and Devlin, R. B. (1997). Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent. *Toxicol Appl Pharmacol* **146**, 180-188.
- Cerna, M., Pastorkova, A., Vrbikova, V., Smid, J., and Rossner, P. (1999). Mutagenicity monitoring of airborne particulate matter (PM10) in the Czech Republic. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **444**, 373.
- Cerna, M., Pochmanova, D., Pastorkova, A., Benes, I., Lenicek, J., Topinka, J., and Binkova, B. (2000). Genotoxicity of urban air pollutants in the Czech Republic. Part I. Bacterial mutagenic potencies of organic compounds adsorbed on PM10 particulates. *Mutat Res* **469**, 71-82.
- Cicero-Fernandez, P., Thistlewaite, W. A., Falcon, Y. I., and Guzman, I. M. (1993). TSP, PM10 and PM10/TSP ratios in the Mexico City Metropolitan area: a temporal and spatial approach. *J Expo Anal Environ Epidemiol* **3 Suppl 1**, 1-14.
- Claxton, L. D., Matthews, P. P., and Warren, S. H. (2004). The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: Salmonella mutagenicity. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **567**, 347.
- Claxton, L. D., Warren, S., Zweidinger, R., and Creason, J. (2001). A comparative assessment of Boise, Idaho, ambient air fine particle samples using the plate and microsuspension Salmonella mutagenicity assays. *Sci Total Environ* **275**, 95-108.
- Cornelis, C., Bierkens, J., De Vlieger, I., Liekens, I., Nouwen, J., Provoost, J., Weltens, R., Wevers, M., G. Wouters, G., Du Four, V., and N, V. L. (2006). Evaluatie van de bloostelling aan PAK's- inventarisatiestudie. Deel I: voorstel gidsstoffen en inventarisatie emissie, immissie en omzettingsreacties. *Studie in opdracht van de dienst Milieu & Gezondheid van het departement leefmilieu, Natuur en Energie*.
- De Martinis, B. S., Kado, N. Y., de Carvalho, L. R., Okamoto, R. A., and Gundel, L. A. (1999). Genotoxicity of fractionated organic material in airborne particles from Sao Paulo, Brazil. *Mutat Res* **446**, 83-94.
- De Vizcaya-Ruiz, A., Gutierrez-Castillo, M. E., Uribe-Ramirez, M., Cebrian, M. E., Mugica-Alvarez, V., Sepulveda, J., Rosas, I., Salinas, E., Garcia-Cuellar, C., Martinez, F., Alfaro-Moreno, E., Torres-Flores, V., Osornio-Vargas, A., Sioutas, C., Fine, P. M., Singh, M., Geller, M. D., Kuhn, T., Miguel, A. H., Eiguren-Fernandez, A., Schiestl, R. H., Reliene, R., and Froines, J. (2006). Characterization and in vitro biological effects of concentrated particulate matter from Mexico City. *Atmospheric Environment* **40**, 583.
- DETR-EPAQS (2001) Department of the Environment, Transport and the Regions, UK-Expert Panel on Air Quality Standards (DETR-EPAQS), 2001. Airborne Particles. DETR, London, UK.
- Dick, C. A. J., Stone, V., Brown, D. M., Watt, M., Cherrie, J. W., Howarth, S., Seaton, A., and Donaldson, K. (2000). Toxic and inflammatory effects of filters frequently used for the collection of airborne particulate matter. *Atmospheric Environment* **34**, 2587.
- Don Porto Carero, A. (2002). Respiratory toxicity of airborne pollutant particles-In vitro studies. *PhD thesis, 2002/TOX/R/026*, 123 pp.
- Don Porto Carero, A., Hoet, P. H., Verschaeve, L., Schoeters, G., and Nemery, B. (2001). Genotoxic effects of carbon black particles, diesel exhaust particles, and urban air particulates and their extracts on a human alveolar epithelial cell

- line (A549) and a human monocytic cell line (THP-1). *Environ Mol Mutagen* **37**, 155-163.
- Donaldson, K., and MacNee, W. (2001). Potential mechanisms of adverse pulmonary and cardiovascular effects of particulate air pollution (PM10). *International Journal Of Hygiene And Environmental Health* **203**, 411.
- Du Four, V. A., Janssen, C. R., Brits, E., and Larebeke, N. V. (2005). Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples from different rural, urban and industrial sites in Flanders, Belgium. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **588**, 106.
- Du Four, V. A., Van Larebeke, N., and Janssen, C. R. (2004). Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples in Flanders, Belgium. *Mutat Res* **558**, 155-167.
- Ducatti, A., and Vargas, V. M. F. (2003). Mutagenic activity of airborne particulate matter as an indicative measure of atmospheric pollution. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **540**, 67.
- Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R., and Bullock, P. (2004). Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol In Vitro* **18**, 703-710.
- Hastwell, P. W., Chai, L. L., Roberts, K. J., Webster, T. W., Harvey, J. S., Rees, R. W., and Walmsley, R. M. (2006). High-specificity and high-sensitivity genotoxicity assessment in a human cell line: validation of the GreenScreen HC GADD45a-GFP genotoxicity assay. *Mutat Res* **607**, 160-175.
- Hetland, R. B., Cassee, F. R., Refsnes, M., Schwarze, P. E., Lag, M., Boere, A. J., and Dybing, E. (2004). Release of inflammatory cytokines, cell toxicity and apoptosis in epithelial lung cells after exposure to ambient air particles of different size fractions. *Toxicol In Vitro* **18**, 203-212.
- Huang, S. L., Hsu, M. K., and Chan, C. C. (2003). Effects of submicrometer particle compositions on cytokine production and lipid peroxidation of human bronchial epithelial cells. *Environ Health Perspect* **111**, 478-482.
- ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays. *NIH Publication No: 03-4503*.
- Imrich, A., Ning, Y., Lawrence, J., Coull, B., Gitin, E., Knutson, M., and Kobzik, L. (2007). Alveolar macrophage cytokine response to air pollution particles: oxidant mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol* **218**, 256-264.
- Janosek, J., Hilscherova, K., Blaha, L., and Holoubek, I. (2006). Environmental xenobiotics and nuclear receptors--Interactions, effects and in vitro assessment. *Toxicology in Vitro* **20**, 18.
- Kampa, M., and Castanas, E. (2008). Human health effects of air pollution. *Environ Pollut* **151**, 362-367.
- Li, N., Wang, M., Oberley, T. D., Sempf, J. M., and Nel, A. E. (2002). Comparison of the pro-oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages. *J Immunol* **169**, 4531-4541.
- Louie, P. K. K., J.G, W., J.C., C., A., C., D.W.M, S., and A.K.H., L. (2005). Seasonal characteristics and regional transport of PM_{2.5} in Hong Kong. *Atmospheric Environment* **39**, 1695-1710.
- Mazzarella, G., Ferraraccio, F., Prati, M. V., Annunziata, S., Bianco, A., Mezzogiorno, A., Liguori, G., Angelillo, I. F., and Cazzola, M. (2007). Effects of diesel exhaust particles on human lung epithelial cells: an in vitro study. *Respir Med* **101**, 1155-1162.

- McCullough, K. D., Martindale, J. L., Klotz, L. O., Aw, T. Y., and Holbrook, N. J. (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* **21**, 1249-1259.
- Mortelmans, K., and Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **455**, 29.
- Mugica, V., Maubert, M., Torres, M., Munoz, J., and Rico, E. (2002). Temporal and spatial variations of metal content in TSP and PM10 in Mexico City during 1996-1998. *Journal of Aerosol Science* **33**, 91.
- Nam, H. Y., Choi, B. H., Lee, J. Y., Lee, S. G., Kim, Y. H., Lee, K. H., Yoon, H. K., Song, J. S., Kim, H. J., and Lim, Y. (2004). The role of nitric oxide in the particulate matter (PM2.5)-induced NFkappaB activation in lung epithelial cells. *Toxicol Lett* **148**, 95-102.
- Novak, J., Benisek, M., and Hilscherova, K. (2008). Disruption of retinoid transport, metabolism and signaling by environmental pollutants. *Environ Int.*
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., and Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* **267**, 5421-5426.
- Osornio-Vargas, A. R., Bonner, J. C., Alfaro-Moreno, E., Martinez, L., Garcia-Cuellar, C., Ponce-de-Leon Rosales, S., Miranda, J., and Rosas, I. (2003). Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City air pollution particulate matter in vitro are dependent on particle size and composition. *Environ Health Perspect* **111**, 1289-1293.
- Oudinet, J. P., Meline, J., Chelmicki, W., Sanak, M., Magdalena, D. W., Besancenot, J. P., Wicherek, S., Julien-Laferriere, B., Gilg, J. P., Geroyannis, H., Szczeklik, A., and Krzemien, K. (2006). Towards a multidisciplinary and integrated strategy in the assessment of adverse health effects related to air pollution: the case study of Cracow (Poland) and asthma. *Environ Pollut* **143**, 278-284.
- Pozzi, R., De Berardis, B., Paoletti, L., and Guastadisegni, C. (2003). Inflammatory mediators induced by coarse (PM2.5-10) and fine (PM2.5) urban air particles in RAW 264.7 cells. *Toxicology* **183**, 243.
- Risom, L., Moller, P., and Loft, S. (2005). Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res* **592**, 119-137.
- Rosas Perez, I., Serrano, J., Alfaro-Moreno, E., Baumgardner, D., Garcia-Cuellar, C., Martin del Campo, J. M., Raga, G. B., Castillejos, M., Colin, R. D., and Osornio Vargas, A. R. (2007). Relations between PM10 composition and cell toxicity: A multivariate and graphical approach. *Chemosphere* **67**, 1218.
- Salvi, S., Blomberg, A., Rudell, B., Kelly, F., Sandstrom, T., Holgate, S. T., and Frew, A. (1999). Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* **159**, 702-709.
- Sandstrom, T., Cassee, F. R., Salonen, R., and Dybing, E. (2005). Recent outcomes in European multicentre projects on ambient particulate air pollution. *Toxicology and Applied Pharmacology* **207**, 261.
- Schoeters, G., Don Porto Carero, A., Brits, E., and Verschaeve, L. (2001). Naar een effectgerichte evaluatie van luchtkwaliteit in Vlaanderen. Studie in opdracht van VMM. 2001/TOX/R/008 (contract 99-1495).

- Seagrave, J. C., and Nikula, K. J. (2000). Multiple modes of responses to air pollution particulate materials in A549 alveolar type II cells. *Inhal Toxicol* **12 Suppl 4**, 247-260.
- Sevastyanova, O., Novakova, Z., Hanzalova, K., Binkova, B., Sram, R. J., and Topinka, J. (2008). Temporal variation in the genotoxic potential of urban air particulate matter. *Mutat Res* **649**, 179-186.
- Sonneveld, E., Jansen, H. J., Riteco, J. A., Brouwer, A., and van der Burg, B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci* **83**, 136-148.
- Steenberg, P. A., van Amelsvoort, L., Lovik, M., Hetland, R., Alberg, T., Halatek, T., Bloemen, H., Rydzynski, K., Swaen, G., Schwarze, P., Dybing, E., and Cassee, F. R. (2006a). Relation Between Sources of Particulate Air Pollution and Biological Effect Parameters in Samples from Four European Cities: An Exploratory Study. *Inhalation Toxicology* **18**, 333.
- Steenberg, P. A., van Amelsvoort, L., Lovik, M., Hetland, R. B., Alberg, T., Halatek, T., Bloemen, H. J., Rydzynski, K., Swaen, G., Schwarze, P., Dybing, E., and Cassee, F. R. (2006b). Relation between sources of particulate air pollution and biological effect parameters in samples from four European cities: an exploratory study. *Inhal Toxicol* **18**, 333-346.
- Steenberg, P. A., Withagen, C. E., van Dalen, W. J., Dormans, J. A., and van Loveren, H. (2004). Adjuvant activity of ambient particulate matter in macrophage activity-suppressed, N-acetylcysteine-treated, iNOS- and IL-4-deficient mice. *Inhal Toxicol* **16**, 835-843.
- Stone, V., Shaw, J., Brown, D. M., MacNee, W., Faux, S. P., and Donaldson, K. (1998). The role of oxidative stress in the prolonged inhibitory effect of ultrafine carbon black on epithelial cell function. *Toxicology in Vitro* **12**, 649.
- Taioli, E., Sram, R. J., Garte, S., Kalina, I., Popov, T. A., and Farmer, P. B. (2007). Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage (EXPAH project): description of the population under study. *Mutat Res* **620**, 1-6.
- Takizawa, H. (2004). Diesel exhaust particles and their effect on induced cytokine expression in human bronchial epithelial cells. *Current Opinion In Allergy And Clinical Immunology* **4**, 355.
- Taneda, S., Hayashi, H., Sakushima, A., Seki, K., Suzuki, A. K., Kamata, K., Sakata, M., Yoshino, S., Sagai, M., and Mori, Y. (2002). Estrogenic and anti-estrogenic activities of two types of diesel exhaust particles. *Toxicology* **170**, 153-161.
- Taneda, S., Mori, Y., Kamata, K., Hayashi, H., Furuta, C., Li, C., Seki, K., Sakushima, A., Yoshino, S., Yamaki, K., Watanabe, G., Taya, K., and Suzuki, A. (2004). Estrogenic and anti-androgenic activity of nitrophenols in diesel exhaust particles (DEP). *Biol. Pharm. Bull.* 835-837. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 835-837.
- Timblin, C. R., Shukla, A., Berlangier, I., BeruBe, K. A., Churg, A., and Mossman, B. T. (2002). Ultrafine airborne particles cause increases in protooncogene expression and proliferation in alveolar epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **179**, 98-104.
- Todd, M. D., Lee, M. J., Williams, J. L., Nalezny, J. M., Gee, P., Benjamin, M. B., and Farr, S. B. (1995). The CAT-Tox (L) assay: a sensitive and specific measure of stress-induced transcription in transformed human liver cells. *Fundam Appl Toxicol* **28**, 118-128.

- Van den Belt, K., Berckmans, P., Vangenechten, C., Verheyen, R., and Witters, H. (2004). Comparative study on the in vitro/in vivo estrogenic potencies of 17beta-estradiol, estrone, 17alpha-ethynylestradiol and nonylphenol. *Aquat Toxicol* **66**, 183-195.
- Van Grieken, R., de Hoog, J., Bencs, L., Spolnik, Z., Deutch, F., Rhaiwal, R., Stranger, M., Berghmans, P., and Bleux, N. (2003). Metingen van PM2.5 in Vlaanderen, 2001-2003. *Project uitgevoerd in opdracht van VMM (LUC/2001/126)*.
- Veranth, J. M., Moss, T. A., Chow, J. C., Labban, R., Nichols, W. K., Walton, J. C., Watson, J. G., and Yost, G. S. (2006). Correlation of in vitro cytokine responses with the chemical composition of soil-derived particulate matter. *Environ Health Perspect* **114**, 341-349.
- Vincent, R., Goegan, P., Johnson, G., Brook, J. R., Kumarathasan, P., Bouthillier, L., and Burnett, R. T. (1997). Regulation of promoter-CAT stress genes in HepG2 cells by suspensions of particles from ambient air. *Fundam Appl Toxicol* **39**, 18-32.
- Vineis, P., and Husgafvel-Pursiainen, K. (2005). Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis* **26**, 1846-1855.
- VMM (2007). Zwevend stof in Vlaanderen, periode 2005 en 2006.
- Wang, J., Xie, P., Xu, Y., Kettrup, A., and K-W., S. (2004). Differing estrogen activities in the organic phase of air particulate matter collected during sunny and foggy weather in a Chinese city detected by a recombinant yeast bioassay. *Atmospheric Environment* **38**, 6157-6166.
- Watterson, T. L., Sorensen, J., Martin, R., and Coulombe, R. A., Jr. (2007). Effects of PM2.5 collected from Cache Valley Utah on genes associated with the inflammatory response in human lung cells. *J Toxicol Environ Health A* **70**, 1731-1744.
- Wieringa, M. H., Vermeire, P. A., Van Bever, H. P., Nelen, V. J., and Weyler, J. J. (2001). Higher occurrence of asthma-related symptoms in an urban than a suburban area in adults, but not in children. *Eur Respir J* **17**, 422-427.
- Wieringa, M. H., Weyler, J. J., Nelen, V. J., Van Hoof, K. J., Van Bastelaer, F. J., Van Sprundel, M. P., and Vermeire, P. A. (1998). Prevalence of respiratory symptoms: marked differences within a small geographical area. *Int J Epidemiol* **27**, 630-635.
- Witters, H., Van Den Heuvel, R., Brits, E., Schoeters, G., Van Larebeke, N., Dufour, V., and Janssen, C. (2005). Evaluatie van de luchtkwaliteit in Vlaanderen door effectgerichte metingen in de omgevingslucht. Studie in opdracht van Aminal, cel Milieu & Gezondheid. *Vito rapport 2005/TOX/R011*, 238 pp.
- Young, M. R., and Colburn, N. H. (2006). Fra-1 a target for cancer prevention or intervention. *Gene* **379**, 1-11.
- Zhang, X. Y., Cao, J. J., Li, L. M., Arimoto, R., Cheng, Y., Huebert, B., and Wang, D. (2002). Characterization of Atmospheric Aerosol over XiAn in the South Margin of the Loess Plateau, China. *Atmospheric Environment* **36**, 4189.
- Zhao, H.-W., and Li, X.-Y. (2002). Ginkgolide A, B, and huperzine A inhibit nitric oxide-induced neurotoxicity. *International Immunopharmacology* **2**, 1551.
- Zhao, L., and Ackerman, S. L. (2006). Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Current Opinion in Cell Biology* **18**, 444.
- Zhao, X., Wan, Z., Chen, G., Zhu, H., Jiang, S., and Yao, J. (2002). Genotoxic activity of extractable organic matter from urban airborne particles in Shanghai, China. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **514**, 177.

11 Annex I: Salmonella mutageniciteit test (Ames)

Volgende resultaten worden weergegeven:

1) een overzicht van de individuele Ames resultaten voor de verschillende locaties uitgedrukt als revertanten/plaat bij de verschillende blootstellingsconcentraties (0, 5, 10, 20 m³ lucht equivalent) met (+S9) en zonder (-S9) metabole activatie. Opmerking: het aantal revertanten bij de concentratie van 0m³ lucht equivalent is het getelde aantal kolonies bij de DMSO blanco.

Extracten met een significante dosisrespons curve (regressie analyse, $p < 0.05$) zijn in vet aangeduid. Voor de extracten waarbij het aantal revertanten significante verhoogd is t.o.v. het extract van de blanco filter zijn de p-waarden weergegeven (ANOVA, gecombineerd met Tukey post hoc test indien deze eerste significant is ($p < 0.05$)).

De bemonsteringsdagen met een positief filterextract (d.w.z. aanwezigheid van mutagene activiteit gedefinieerd volgens de criteria in 6.1.1) zijn aangeduid in grijs.

2) een overzicht van het aantal revertanten na blootstelling aan

- de positieve controle stoffen,
- de extracten van de blanco filters,
- de extracten uitgevoerd in de afwezigheid van een filter (procedure blanco)

Aarschot	Datum	m3/plaat	TA98-S9				TA98+S9			
			gemiddelde	SD	Induction	ANOVA p waarde	gemiddelde	SD	Inductie	ANOVA p waarde
	4/09/2006	0	20,00	5,29	1,00	-	31,00	4,00	1,00	-
		5	28,33	2,08	1,42	-	26,67	1,53	0,86	-
		10	25,33	5,13	1,27	-	25,00	1,73	0,81	-
		20	24,33	6,66	1,22	-	24,33	2,52	0,78	-
	16/09/2006	0	20,00	5,29	1,00	-	31,00	4,00	1,00	-
		5	29,00	2,00	1,45	-	25,67	2,31	0,83	-
		10	32,33	4,51	1,62	-	24,00	3,00	0,77	-
		20	43,33	4,73	2,17	0,01	31,00	4,00	1,00	-
	28/09/2006	0	20,00	5,29	1,00	-	31,00	4,00	1,00	-
		5	22,33	0,58	1,12	-	30,67	4,73	0,99	-
		10	32,00	2,65	1,60	-	26,33	1,15	0,85	-
		20	34,00	5,00	1,70	-	37,00	2,00	1,19	0,02
	10/10/2006	0	22,33	5,13	1,00	-	33,00	6,24	1,00	-
		5	57,00	11,27	2,55	0,001	47,67	3,79	1,44	-
		10	32,00	3,00	1,43	-	57,00	6,24	1,73	0,04
		20	79,33	5,69	3,55	0,0003	83,00	12,77	2,52	0,0010
	22/10/2006	0	22,33	5,13	1,00	-	33,00	6,24	1,00	-
		5	37,00	7,00	1,66	-	46,33	9,02	1,40	0,04
		10	51,67	6,11	2,31	0,02	40,67	1,15	1,23	-
		20	39,33	14,43	1,76	-	51,33	7,57	1,56	0,0227
	3/11/2006	0	22,33	5,13	1,00	-	33,00	6,24	1,00	-
		5	41,00	4,58	1,84	0,01	55,00	6,56	1,67	-
		10	26,67	2,89	1,19	-	65,67	7,23	1,99	0,03
		20	92,33	8,02	4,13	0,0002	122,67	17,21	3,72	0,0003
	15/11/2006	0	22,33	5,13	1,00	-	33,00	6,24	1,00	-
		5	49,67	10,07	2,22	0,01	41,33	8,50	1,25	-
		10	29,00	8,54	1,30	-	46,00	6,93	1,39	-
		20	44,67	4,16	2,00	0,02	70,33	11,93	2,13	0,01
	27/11/2006	0	15,30	0,60	1	-	23,3	2,1	1	-
		5	16,00	1,70	1,04	-	28,3	3,8	1,21	-
		10	23,70	2,90	1,54	0,05	26,3	2,1	1,13	-
		20	20,00	0,00	1,3	-	26,7	7,5	1,14	-
	9/12/2006	0	15,30	0,60	1	-	23,3	2,1	1	-
		5	19,70	3,50	1,25	-	24,7	5,5	1,06	-
		10	25,00	5,30	1,63	-	29,7	3,1	1,27	-
		20	27,30	3,50	1,78	-	28,3	4,6	1,21	-
	21/12/2006	0	15,30	0,60	1	-	23,3	2,1	1	-
		5	17,70	6,40	1,15	-	27,3	4	1,17	-
		10	25,70	3,50	1,67	0,03	35,3	6,4	1,51	-
		20	29,30	3,10	1,91	0,003	46	3	1,97	0,001
	2/01/2007	0	15,30	0,60	1	-	23,3	2,1	1	-
		5	24,70	4,60	1,61	-	25	2	1,07	-
		10	28,70	3,20	1,87	0,01	31	5,6	1,33	-
		20	19,30	2,10	1,26	-	31,3	4	1,34	-
	14/01/2007	0	15,30	0,60	1	-	23,3	2,1	1	-
		5	18,70	5,40	1,22	-	25,3	3,5	1,09	-
		10	23,70	6,40	1,54	-	27,7	1,5	1,19	-
		20	21,00	1,70	1,37	-	32	8,7	1,37	-
	26/01/2007	0	15,30	0,60	1	-	23,3	2,1	1	-
		5	17,00	2,60	1,11	-	32	6,2	1,37	-
		10	26,30	4,50	1,72	0,03	43	9,6	1,84	-
		20	32,30	0,60	2,11	0,001	43,7	9,1	1,87	-

7/02/2007	0	19,30	3,10	1		30,7	3,1	1	
	5	24,30	2,10	1,26	-	50	6	1,63	-
	10	29,30	2,10	1,52	-	59,7	7,5	1,95	0,02
	20	47,70	6,70	2,47	0,0010	78,7	6,7	2,57	0,0008
19/02/2007	0	19,30	3,10	1		30,7	3,1	1	
	5	31,30	0,60	1,62	-	63,7	0,6	2,08	-
	10	44,00	3,60	2,28	-	88	8,7	2,87	0,0020
	20	78,30	15,30	4,05	0,0009	147,3	14,5	4,8	0,0003
3/03/2007	0	19,30	3,10	1		30,7	3,1	1	
	5	26,70	3,50	1,38	-	49	2	1,6	-
	10	35,30	2,90	1,83	0,02	59,3	9,3	1,93	-
	20	63,30	4,90	3,28	0,0003	92,7	10,6	3,02	0,001
15/03/2007	0	19,30	3,10	1		30,7	3,1	1	
	5	54,70	4,90	2,83	0,001	106,3	13,1	3,47	0,001
	10	103,70	4,00	5,36	0,0003	173	10,5	5,64	0,0003
	20	165,70	5,90	8,57	0,0003	274,3	12,5	8,95	0,0003
27/03/2007									
8/04/2007									
20/04/2007	0	17,3	0,6	1		23,3	1,2	1	
	5	27,7	3,5	1,6	-	29	1,7	1,24	0,04
	10	43,3	6	2,5	0,01	31,3	2,5	1,34	0,008
	20	66	2	3,81	0,0003	48,7	1,5	2,09	0,003
2/05/2007	0	17,3	0,6	1		23,3	1,2	1	
	5	27,7	3,5	1,6	-	27,7	0,6	1,19	-
	10	35	5,6	2,02	-	35,7	4	1,53	0,005
	20	36,3	1,5	2,1	-	41	2,6	1,76	0,001
14/05/2007	0	17,3	0,6	1		23,3	1,2	1	
	5	27	1	1,56	-	27,7	1,5	1,19	-
	10	38,3	10,4	2,21	-	27,7	2,1	1,19	-
	20	39	2,6	2,25	-	36	6	1,54	0,02
26/05/2007	0	46	2,6	1		70	6	1	
	5	46,7	2,1	1,01	-	51,3	5,5	0,73	-
	10	49	1,7	1,07	0,01	54	4,4	0,77	-
	20	49,3	2,9	1,07	0,03	82,7	17	1,18	0,05
7/06/2007	0	46	2,6	1		70	6	1	
	5	51,3	7,5	1,12	-	48	2,6	0,69	-
	10	49,3	6	1,07	-	55,7	4,2	0,8	0,05
	20	52,3	5,9	1,14	-	57,3	8,1	0,82	-
19/06/2007	0	46	2,6	1		70	6	1	
	5	50	1	1,09	-	50	2,6	0,71	-
	10	50,3	4,2	1,09	-	56,7	4,9	0,81	-
	20	83,7	7,4	1,82	0,0003	54,7	4,5	0,78	-
1/07/2007	0	27,33	3,79	1,00		28,00	1,73	1	
	5	28,00	1,73	1,02	-	34,00	11,27	1,21	-
	10	30,33	5,51	1,11	-	29,33	2,08	1,05	-
	20	39,67	15,89	1,45	-	37,00	9,54	1,32	-

13/07/2007	0	27,33	3,79	1,00		28,00	1,73	1	
	5	25,00	3,61	0,91	-	42,67	8,33	1,52	-
	10	26,67	6,43	0,98	-	38,00	7,21	1,36	-
	20	31,67	8,08	1,16	-	48,33	8,08	1,73	-
25/07/2007	0	27,33	3,79	1,00		28,00	1,73	1	
	5	31,67	2,08	1,16	-	36,67	1,53	1,31	-
	10	37,00	2,65	1,35	0,03	37,33	8,74	1,33	-
	20	41,00	4,36	1,50	0,01	50,33	10,41	1,80	-
6/08/2007	0	27,33	3,79	1,00		28,00	1,73	1	
	5	30,00	5,00	1,10	-	44,00	7,21	1,57	-
	10	34,00	8,72	1,24	-	43,00	9,54	1,54	-
	20	51,33	2,52	1,88	0,01	47,33	11,68	1,69	-
18/08/2007									
30/08/2007									
11/09/2007	0	27,33	3,79	1,00		28,00	1,73	1	
	5	27,67	4,04	1,01	-	40,33	9,50	1,44	-
	10	35,00	3,00	1,28	-	28,67	4,16	1,02	-
	20	30,67	2,52	1,12	-	34,00	2,65	1,21	-

Borgerhout		TA98-S9				TA98+S9			
Datum	m3/plaat	gemiddelde	SD	Inductie	ANOVA p waarde	gemiddelde	SD	Inductie	ANOVA p waarde
4/09/2006	0	20,00	5,29	1,00	-	31,00	4,00	1,00	-
	5	25,67	4,73	1,28	-	25,33	1,53	0,82	-
	10	28,67	3,06	1,43	-	27,00	1,00	0,87	-
	20	26,33	4,51	1,32	-	31,67	2,52	1,02	0,04
16/09/2006	0	20,00	5,29	1,00	-	31,00	4,00	1,00	-
	5	26,67	3,21	1,33	-	26,00	1,73	0,84	-
	10	32,00	4,36	1,60	-	25,33	2,89	0,82	-
	20	40,33	5,03	2,02	0,02	31,67	2,52	1,02	-
28/09/2006	0	20,00	5,29	1,00	-	31,00	4,00	1,00	-
	5	26,33	3,06	1,32	-	28,33	5,13	0,91	-
	10	26,00	1,00	1,30	-	26,67	4,51	0,86	-
	20	24,67	1,53	1,23	-	32,33	8,50	1,04	-
10/10/2006	0	22,33	5,13	1,00	-	33,00	6,24	1,00	-
	5	33,25	1,53	1,49	-	69,25	8,50	2,10	0,05
	10	24,25	3,21	1,09	-	100,25	12,06	3,04	0,0004
	20	145,75	9,61	6,53	0,0002	151,00	9,02	4,58	0,0003
22/10/2006	0	22,33	5,13	1,00	-	33,00	6,24	1,00	-
	5	33,67	3,51	1,51	-	47,33	2,31	1,43	-
	10	28,33	1,53	1,27	-	53,67	8,50	1,63	-
	20	45,00	8,54	2,01	0,004	69,33	20,40	2,10	0,03
3/11/2006	0	22,33	5,13	1,00	-	33,00	6,24	1,00	-
	5	43,00	6,08	1,93	-	56,33	10,07	1,71	-
	10	53,00	15,39	2,37	0,02	62,00	6,24	1,88	0,003
	20	74,67	7,02	3,34	0,0008	75,67	5,51	2,29	0,0004
15/11/2006	0	15,30	0,60	1	-	23,3	2,1	1	-
	5	20,70	2,50	1,35	-	31	2,6	1,33	-
	10	26,00	1,00	1,7	-	28,7	1,2	1,23	-
	20	30,00	7,00	1,96	0,02	43	6,2	1,84	0,00
27/11/2006	0	15,30	0,60	1	-	23,3	2,1	1	-
	5	15,70	2,10	1,02	-	29,3	2,1	1,26	-
	10	19,00	3,50	1,24	-	30	5,3	1,29	-
	20	22,30	0,60	1,46	-	24,7	6,5	1,06	-
9/12/2006	0	15,30	0,60	1	-	23,3	2,1	1	-
	5	16,70	2,30	1,09	-	32,7	2,9	1,4	-
	10	24,70	3,80	1,61	-	26	3,5	1,11	-
	20				-	36	19,9	1,54	-
21/12/2006	0	15,30	0,60	1	-	23,3	2,1	1	-
	5	27,3	1,5	1,78	0,01	27,7	6,7	1,19	-
	10	29,7	2,1	1,93	0,003	29,7	4	1,27	-
	20	35	4	2,28	0,0004	50	12,1	2,14	0,01
2/01/2007	0	15,30	0,60	1	-	23,3	2,1	1	-
	5	20,3	0,6	1,33	-	25,3	1,5	1,09	-
	10	26,7	4,7	1,74	0,03	23,3	0,6	1	-
	20	29	2	1,89	0,01	44,7	13,7	1,91	0,03
14/01/2007	0	15,30	0,60	1	-	23,3	2,1	1	-
	5	23	5,2	1,5	-	28,3	6,7	1,21	-
	10	24	3,5	1,57	-	28	3,6	1,2	-
	20	28,3	3,5	1,85	0,03	46,7	11,2	2	0,01
26/01/2007	0	15,30	0,60	1	-	23,3	2,1	1	-
	5	18,7	2,5	1,22	-	24	3,6	1,03	-
	10	25,3	4,9	1,65	-	27,7	4,2	1,19	-
	20	30,3	1,5	1,98	0,01	40,3	2,3	1,73	0,003

7/02/2007	0	19,30	3,10	1		30,7	3,1	1	
	5	37	2,6	1,91	-	68,7	5,8	2,24	0,001
	10	44	4,4	2,28	0,01	84	6,2	2,74	0,0003
	20	84	7,9	4,34	0,0003	130,7	3,1	4,26	0,0003
19/02/2007	0	19,30	3,10	1		30,7	3,1	1	
	5	24	1	1,24	-	41,7	5,8	1,36	-
	10	23,7	4,2	1,22	-	42	2,6	1,37	-
	20	45,3	6	2,34	0,002	69,3	4,5	2,26	0,0004
3/03/2007	0	19,30	3,10	1		30,7	3,1	1	
	5	29	2	1,5	-	48	3,6	1,57	-
	10	39,3	4,2	2,03	-	54,7	8	1,78	-
	20	58,3	11,7	3,02	0,00	92,7	11,8	3,02	0,001
15/03/2007	0	19,30	3,10	1		30,7	3,1	1	
	5	26,3	4,5	1,36	-	49,3	1,2	1,61	-
	10	42	5,3	2,17	0,01	57	3,6	1,86	0,01
	20	99,7	4,9	5,16	0,0003	79	7	2,58	0,0003
27/03/2007									
8/04/2007									
20/04/2007	0	17,3	0,6	1		23,3	1,2	1	
	5	24,7	9,1	1,42	-	27,3	0,6	1,17	-
	10	25,7	2,3	1,48	-	25,7	2,3	1,1	-
	20	36,3	6,7	2,1	-	25	4,4	1,07	-
2/05/2007									
14/05/2007	0	46	2,6	1		70	6	1	
	5	46	4,6	1	-	50,7	3,5	0,72	-
	10	55,7	2,1	1,21	0,03	49,7	4	0,71	-
	20	91,7	5,5	1,99	0,0003	60,7	6,4	0,87	0,03
26/05/2007	0	46	2,6	1		70	6	1	
	5	47,3	2,1	1,03	-	49,3	4	0,7	-
	10	67,7	8,6	1,47	0,01	52,3	5,7	0,75	-
	20	88,3	7	1,92	0,001	64,3	1,5	0,92	0,01
7/06/2007	0	46	2,6	1		70	6	1	
	5	63	2	1,37	0,05	49,7	4	0,71	-
	10	79,7	9,6	1,73	0,004	54	3	0,77	-
	20	71,3	14,5	1,55	0,01	52,7	2,3	0,75	-
19/06/2007	0	46	2,6	1		70	6	1	
	5	50,3	2,1	1,09	-	46,7	5,9	0,67	-
	10	69,3	3,1	1,51	-	47,7	1,2	0,68	-
	20	117	18,5	2,54	0,002	64,3	0,6	0,92	0,01
1/07/2007	0	27,33	3,79	1,00		28,0	1,7	1,00	
	5	37,33	6,66	1,37	-	37,67	5,03	1,35	-
	10	36,67	3,79	1,34	-	26,67	5,86	0,95	-
	20	54,33	1,15	1,99	0,001	53,33	18,15	1,90	-

13/07/2007	0	27,33	3,79	1,00		28,00	1,73	1	
	5	28,33	3,79	1,04	-	35,00	2,65	1,25	-
	10	33,00	9,54	1,21	-	27,67	3,06	0,99	-
	20	37,67	13,80	1,38	-	41,33	3,79	1,48	0,02
25/07/2007	0	27,33	3,79	1,00		28,00	1,73	1	
	5	44,67	6,35	1,63	-	36,33	1,15	1,30	-
	10	51,00	18,00	1,87	-	45,00	14,11	1,61	-
	20	65,00	9,54	2,38	0,03	57,00	4,36	2,04	0,03
6/08/2007									
18/08/2007	0	27,33	3,79	1,00		28,00	1,73	1	
	5	37,67	15,04	1,38	-	40,33	4,93	1,44	-
	10	54,33	6,43	1,99	-	55,33	7,23	1,98	0,04
	20	66,67	11,37	2,44	0,02	55,67	11,55	1,99	0,04
30/08/2007	0	27,33	3,79	1,00		28,00	1,73	1	
	5	29,00	4,58	1,06	-	39,67	3,06	1,42	-
	10	39,33	4,51	1,44	0,03	41,33	7,51	1,48	-
	20	43,67	3,51	1,60	0,01	40,00	2,65	1,43	-
11/09/2007	0	27,33	3,79	1,00		28,00	1,73	1	
	5	33,00	6,08	1,21	-	43,33	1,53	1,55	-
	10	34,67	8,02	1,27	-	34,33	8,74	1,23	-
	20	44,00	7,55	1,61	-	48,67	7,51	1,74	-

Zelzate	Datum	m3/plaat	TA98-S9				TA98+S9			
			gemiddelde	SD	Inductie	ANOVA p waarde	gemiddelde	SD	Inductie	ANOVA p waarde
4/09/2006	0		20,00	5,29	1,00	-	31,00	4,00	1,00	-
	5		26,67	1,15	1,33	-	28,00	2,65	0,90	-
	10		25,67	5,03	1,28	-	25,67	1,53	0,83	-
	20		33,67	6,51	1,68	-	28,00	4,58	0,90	-
16/09/2006	0		20,00	5,29	1,00	-	31,00	4,00	1,00	-
	5		25,33	5,77	1,27	-	26,33	3,06	0,85	-
	10		26,00	1,00	1,30	-	25,33	1,53	0,82	-
	20		33,33	2,08	1,67	-	37,00	2,65	1,19	0,01
28/09/2006	0		20,00	5,29	1,00	-	31,00	4,00	1,00	-
	5		26,33	2,08	1,32	-	26,33	4,04	0,85	-
	10		27,00	1,00	1,35	-	29,33	0,58	0,95	-
	20		50,67	6,11	2,53	0,001	53,33	2,08	1,72	0,0003
10/10/2006	0		22,33	5,13	1,00	-	33,00	6,24	1,00	-
	5		32,00	7,55	1,43	-	61,67	6,66	1,87	0,002
	10		24,00	6,08	1,07	-	82,67	2,52	2,51	0,0003
	20		85,67	10,60	3,84	0,0002	74,33	6,81	2,25	0,0004
22/10/2006	0		22,33	5,13	1,00	-	33,00	6,24	1,00	-
	5		34,67	5,86	1,55	-	52,33	3,21	1,59	-
	10		28,33	9,45	1,27	-	83,00	10,39	2,52	0,0004
	20		59,00	3,46	2,64	0,0007	63,33	3,51	1,92	0,0044
3/11/2006	0		22,33	5,13	1,00	-	33,00	6,24	1,00	-
	5		39,00	10,15	1,75	0,05	65,67	14,01	1,99	-
	10		51,00	4,58	2,28	0,002	103,67	13,58	3,14	0,001
	20		74,33	2,31	3,33	0,0002	79,00	8,89	2,39	0,01
15/11/2006	0		22,33	5,13	1,00	-	33,00	6,24	1,00	-
	5		36,25	9,45	1,62	-	58,75	16,07	1,78	0,04
	10		34,75	18,18	1,56	-	83,50	4,58	2,53	0,01
	20		50,75	4,04	2,27	-	65,75	7,51	1,99	0,02
27/11/2006	0		15,30	0,60	1	-	23,3	2,1	1	-
	5		21,30	1,50	1,39	-	24,30	2,30	1,04	-
	10		26,70	2,30	1,74	0,02	25,70	3,50	1,1	-
	20		45,00	4,40	2,93	0,0002	43,70	4,20	1,87	0,001
9/12/2006	0		15,30	0,60	1	-	23,3	2,1	1	-
	5		17,00	3,00	1,11	-	25,30	2,80	1,09	-
	10		21,00	2,60	1,37	-	33,30	3,50	1,43	-
	20		39,70	7,20	2,59	0,001	40,30	6,10	1,73	0,01
21/12/2006	0		15,30	0,60	1	-	23,3	2,1	1	-
	5		21,70	3,50	1,41	-	24,50	2,10	1,05	-
	10		20,70	3,10	1,35	-	31,70	6,80	1,36	-
	20		50,00	15,40	3,26	0,004	43,00	3,50	1,84	0,004
2/01/2007	0		15,30	0,60	1	-	23,3	2,1	1	-
	5		19,30	1,20	1,26	-	22,50	0,70	0,96	-
	10		19,00	2,60	1,24	-	25,00	4,40	1,07	-
	20		20,00	3,00	1,3	-	48,00	1,00	2,06	0,0002
14/01/2007	0		15,30	0,60	1	-	23,3	2,1	1	-
	5		20,30	3,20	1,33	-	27,50	2,10	1,18	-
	10		19,00	1,00	1,24	-	29,70	2,10	1,27	-
	20		28,00	3,60	1,83	0,003	43,00	8,50	1,84	0,007
26/01/2007	0		19,30	3,10	1	-	30,7	3,1	1	-
	5		24,30	4,20	1,26	-	55,30	3,10	1,8	-
	10		27,30	1,20	1,41	-	70,30	9,60	2,29	0,004
	20		45,70	6,70	2,36	0,0026	94,00	7,80	3,07	0,0004

7/02/2007	0	19,30	3,10	1		30,7	3,1	1	
	5	19,30	2,50	1	-	48,30	1,50	1,58	-
	10	33,00	3,50	1,71	-	58,00	6,00	1,89	0,007
	20	53,00	5,30	2,74	0,0004	88,30	6,40	2,88	0,0003
19/02/2007	0	19,30	3,10	1		30,7	3,1	1	
	5	37,70	8,10	1,95	-	89,30	1,20	2,91	0,002
	10	74,30	7,20	3,84	0,005	107,70	7,80	3,51	0,001
	20	91,30	16,50	4,72	0,0010	207,00	15,60	6,75	0,0003
3/03/2007	0	19,30	3,10	1		30,7	3,1	1	
	5	31,70	7,50	1,64	-	53,30	3,10	1,74	-
	10	45,30	2,30	2,34	0,05	69,70	9,30	2,27	0,002
	20	69,70	11,50	3,6	0,001	105,30	5,00	3,43	0,0003
15/03/2007	0	19,30	3,10	1		30,7	3,1	1	
	5	30,30	3,50	1,57	-	102,70	6,40	3,35	0,001
	10	38,00	5,30	1,97	0,05	143,70	13,90	4,68	0,0003
	20	149,00	7,00	7,71	0,0003	302,30	8,00	9,86	0,0003
27/03/2007	0	17,3	0,6	1		23,3	1,2	1	
	5	60,00	9,00	3,46	0,03	50,70	1,50	2,17	0,01
	10	85,30	11,50	4,92	0,002	70,00	5,00	3	0,0005
	20	129,00	11,30	7,44	0,0003	111,00	104,00	4,76	0,0003
8/04/2007	0	17,3	0,6	1		23,3	1,2	1	
	5	29,30	1,50	1,69	-	28,30	1,50	1,21	-
	10	37,30	5,00	2,15	-	31,00	1,70	1,33	-
	20	45,00	5,30	2,6	0,01	38,70	10,80	1,66	-
20/04/2007	0	17,3	0,6	1		23,3	1,2	1	
	5	33,70	2,50	1,94	-	25,70	0,60	1,1	-
	10	34,70	5,70	2	-	31,00	1,70	1,33	-
	20	42,30	4,20	2,44	0,02	36,70	3,20	1,57	0,01
2/05/2007	0	17,3	0,6	1					
	5	27,00	3,00	1,56	-				
	10	24,30	7,60	1,4	-				
	20	38,30	9,20	2,21	-				
14/05/2007	0	46	2,6	1		70	6	1	
	5	49,00	1,00	1,07	-	47,3	6,5	0,68	-
	10	80,70	8,70	1,75	0,001	52	3,5	0,74	-
	20	116,70	5,80	2,54	0,0003	62,3	1,5	0,89	0,02
26/05/2007	0	46	2,6	1		70	6	1	
	5	47,30	4,20	1,03	-	48,3	1,2	0,69	-
	10	55,30	4,90	1,2	0,02	52,3	4,2	0,75	-
	20	103,70	2,50	2,25	0,0002	61,7	1,5	0,88	0,003
7/06/2007	0	46	2,6	1		70	6	1	
	5	46,70	2,90	1,01	-	49	2	0,7	-
	10	71,00	2,60	1,54	0,0003	52,3	4,2	0,75	-
	20	127,70	3,20	2,78	0,0002	54	1,4	0,77	-
19/06/2007	0	27,33	3,79	1,00		28,00	1,73	1	
	5	36,33	2,08	1,33	-	34,67	2,08	1,24	-
	10	37,33	3,79	1,37	-	37,33	4,16	1,33	-
	20	56,33	13,65	2,06	0,01	60,00	8,54	2,14	0,002
1/07/2007	0	27,33	3,79	1,00		28,00	1,73	1	
	5	30,67	3,51	1,12	-	37,00	5,57	1,32	-
	10	34,67	3,79	1,27	-	38,00	12,12	1,36	-
	20	38,33	2,08	1,40	-	31,67	4,51	1,13	-

13/07/2007	0	27,33	3,79	1,00		28,00	1,73	1	
	5	26,67	2,52	0,98	-	40,67	8,33	1,45	-
	10	32,67	7,37	1,20	-	30,67	4,04	1,10	-
	20	31,00	6,24	1,13	-	29,67	3,51	1,06	-
25/07/2007	0	27,33	3,79	1,00		28,00	1,73	1	
	5	26,67	4,16	0,98	-	34,33	4,04	1,23	-
	10	29,67	2,08	1,09	-	41,33	12,06	1,48	-
	20					43,67	4,93	1,56	-
6/08/2007	0	27,33	3,79	1,00		28,00	1,73	1	
	5	27,33	4,16	1,00	-	39,33	5,51	1,40	-
	10	31,67	8,96	1,16	-	35,33	5,13	1,26	-
	20					59,33	6,11	2,12	0,002
18/08/2007	0	27,33	3,79	1,00		28,00	1,73	1	
	5	41,33	5,77	1,51	-	34,67	4,16	1,24	-
	10	51,00	12,49	1,87	-	41,67	3,51	1,49	0,02
	20					51,00	2,00	1,82	0,00
30/08/2007	0	27,33	3,79	1,00		28,00	1,73	1	
	5	42,67	7,51	1,56	-	37,67	3,21	1,35	-
	10	61,00	15,56	2,23	0,05	63,00	12,22	2,25	0,02
	20					37,67	4,73	1,35	-
11/09/2007	0	27,33	3,79	1,00		28,00	1,73	1	-
	5	35,67	1,15	1,30	0,01	42,00	7,55	1,50	-
	10	29,33	6,81	1,07	-	36,67	3,06	1,31	0,02
	20					58,33	10,79	2,08	

Ames resultaten van de positieve controle NQO in afwezigheid van de metaboliserende fractie S9:

NQO 0.2µg/plate (TA98-S9)				
Extractie	kolonies	gemiddelde	SD	Inductie factor
1	230	225,0	5,0	11,3
	225			
	220			
2	135	130,0	5,0	5,8
	130			
	125			
3	222	214,3	8,0	14,0
	206			
	215			
4	193	203,7	14,4	10,5
	220			
	198			
5	220	220,0	10,0	12,7
	210			
	230			
6	270	232,7	32,6	5,1
	210			
	218			
7	222	228,0	10,4	8,3
	222			
	240			
gemiddelde	205,21			9,67
SD	36,94			3,39
n	21			7
95%CL	15,8			2,5

Ames resultaten van de positieve controle 2AA in aanwezigheid van de metaboliserende fractie S9:

2AA 1µg/plate (TA98+S9)				
Extractie	kolonies	gemiddelde	SD	Inductie factor
1	1200	1206,7	40,4	38,9
	1170			
	1250			
2	1400	1533,3	115,5	46,5
	1600			
	1600			
3	1200	1283,3	76,4	55,0
	1300			
	1350			
4	2000	2000	0	65,2
	2000			
	2000			
5	1050	1063,333	32,1455	45,6
	1100			
	1040			
6	1320	1490	149,3318	21,3
	1600			
	1550			
7	1700	1616,667	76,37626	57,7
	1600			
	1550			
gemiddelde	1443,68			47,17
SD	315,58			14,37
n	21			7
95%CL	135,0			10,6

Ames resultaten van de positieve controle B(a)P in aanwezigheid van de metaboliserende fractie S9:

B(a)P 5 µg/plaat (TA98+S9)				
Extractie	kolonies	gemiddelde	SD	Inductie factor
1	210	221,7	10,4	7,2
	230			
	225			
2	320			
	300	290	14,14	8,8
	280			
3	280	260,0	20,0	11,1
	240			
	260			
4	280	276,7	3,1	9,0
	276			
	274			
5	225	225,0	5,0	9,6
	230			
	220			
6	200	193,33	5,77	2,8
	190			
	190			
7	320	316,67	5,77	11,3
	320			
	310,00			
gemiddelde	250,00			8,55
SD	41,30			2,92
n	21			7
95%CL	17,7			2,2

Ames resultaten van de blanco filters:

Blanco filters								
	- S9				+S9			
Extractie	kolonies	gemiddelde	SD	Inductie factor	kolonies	gemiddelde	SD	Inductie factor
1	20	24,0	5,7	1,2	25	26,0	1,4	0,84
	28				27			
2	20	19,5	0,7	1,27	24	25,0	1,4	1,07
	19				26			
3	16	18,0	2,8	1,17	30	27,0	4,2	1,16
	20				24			
4	22	22,5	0,7	1,16	36	36,5	0,7	1,19
	23				37			
5	27	27,5	0,7	1,59	24	22,5	2,1	0,96
	28				21			
6	40	40,0	0,0	0,87	45	45,0	0,0	0,64
	40				45			
7	24	26,0	2,8	0,95	31	30,5	0,7	1,09
	28				30			
gemiddelde	25,36			1,17	30,36			0,99
SD	7,26			0,23	7,71			0,20
n	14			7	14			7

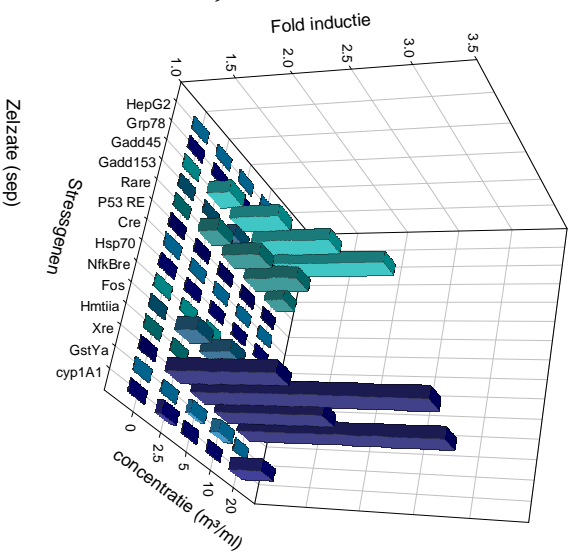
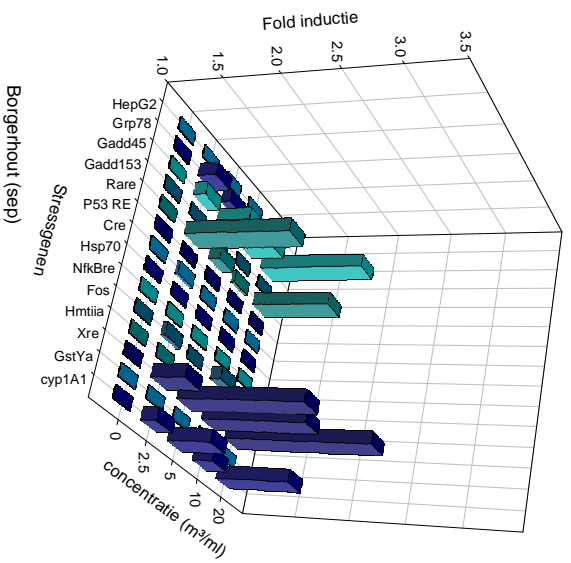
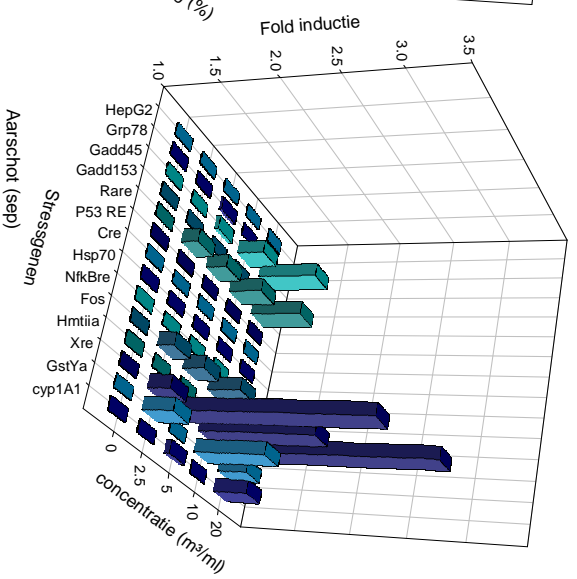
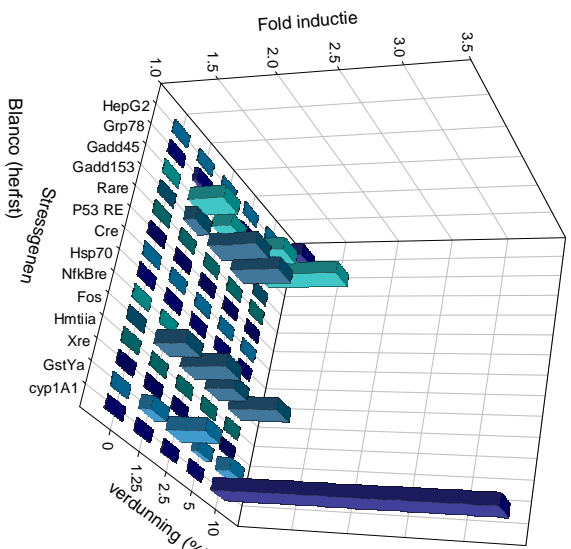
Ames resultaten van de extractie procedure blanco:

Procedure blanco								
	- S9				+S9			
Extractie	kolonies	gemiddelde	SD	Inductie factor	kolonies	gemiddelde	SD	Inductie factor
1	15	16,5	2,1	0,83	34	31,5	3,5	1,02
	18				29			
2	15	16,0	1,4	1,04	30	27	4,24	1,16
	17				24			
3	14	16,0	2,8	1,04	30	27	4,24	1,16
	18				24			
4	19	17,0	2,8	0,88	34	35,0	1,4	1,14
	15				36			
5	22	20,5	2,1	1,18	25	25,0	2,8	1,07
	19				21			
6	44	46,5	3,5	1,01	45	42,5	3,5	0,61
	49				40			
7	25	24,0	1,4	0,88	35	30,5	6,4	1,09
	23				26			
gemiddelde	22,36			0,98	30,93			1,03
SD	10,77			0,13	6,80			0,20
n	14			7	14			7

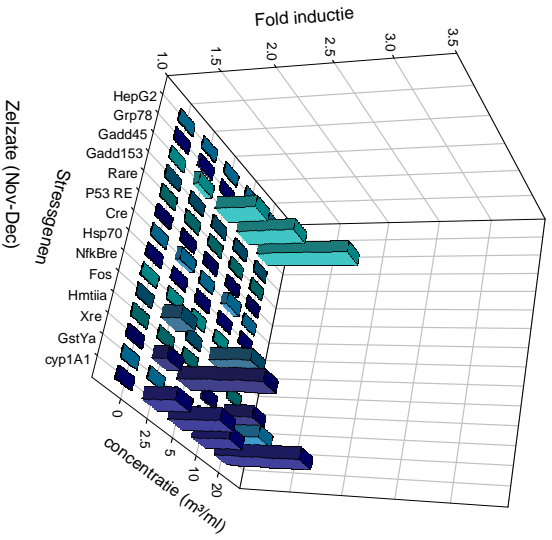
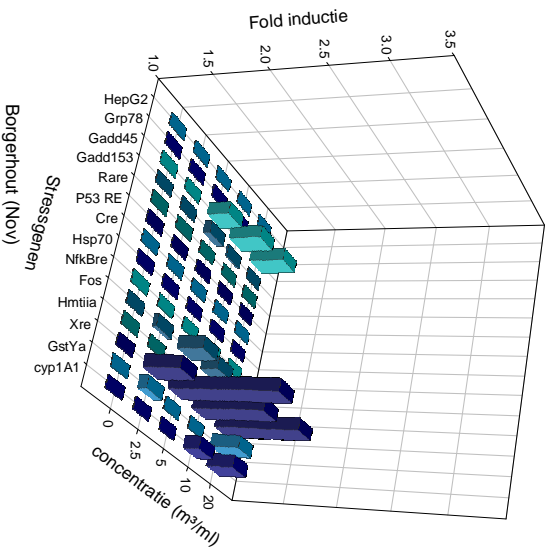
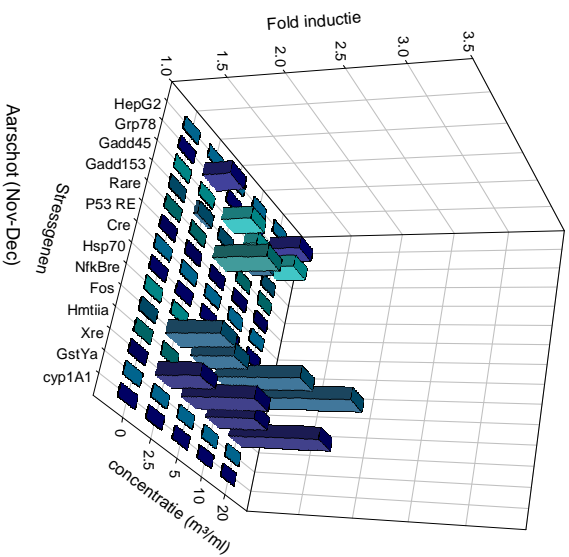
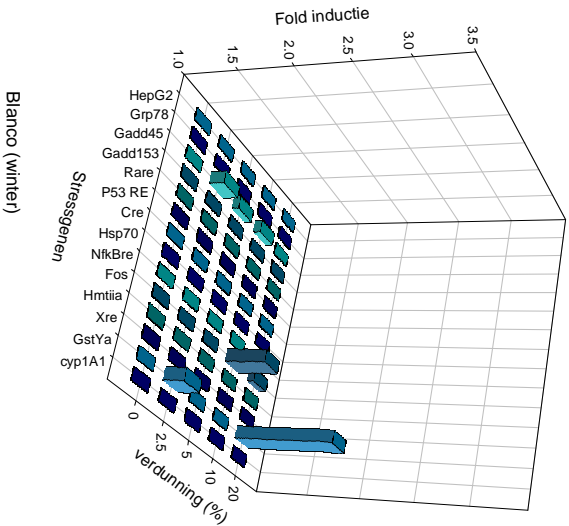
12 Annex II: Cat-tox

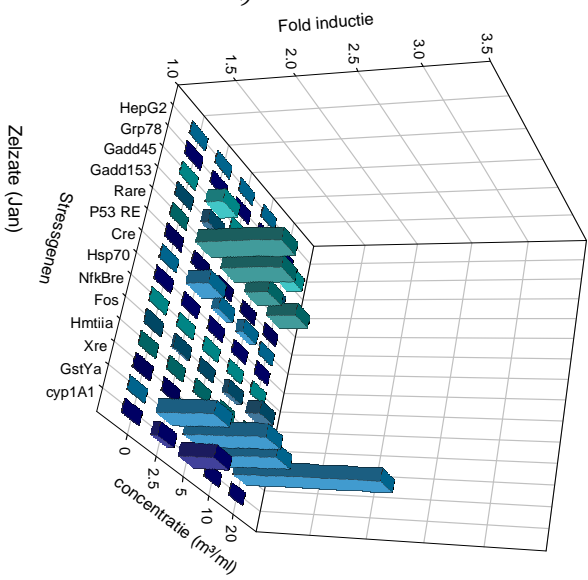
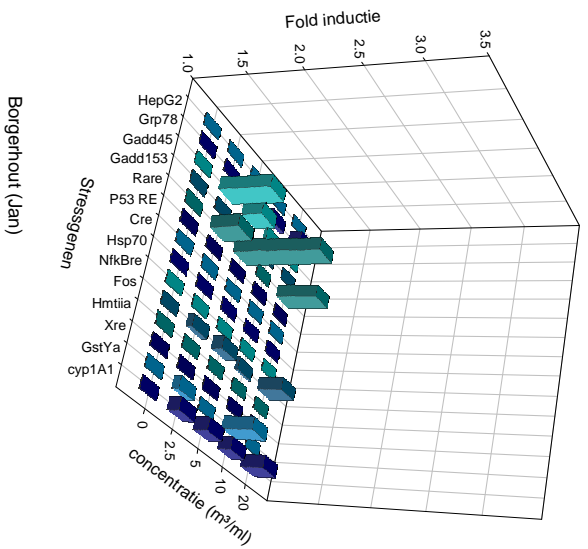
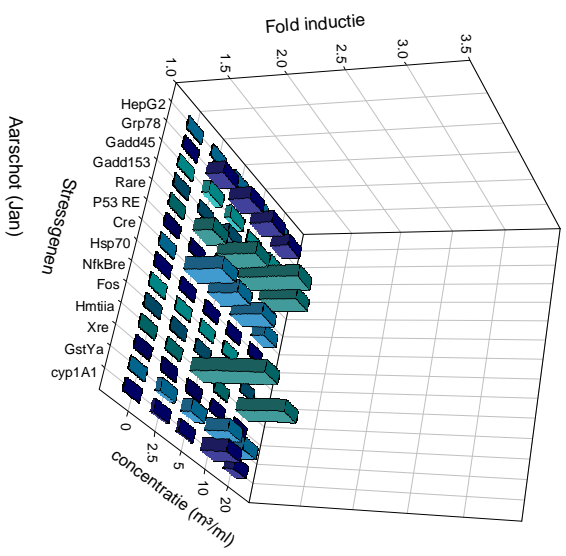
Individuelle genexpressionsprofilen

Herfst

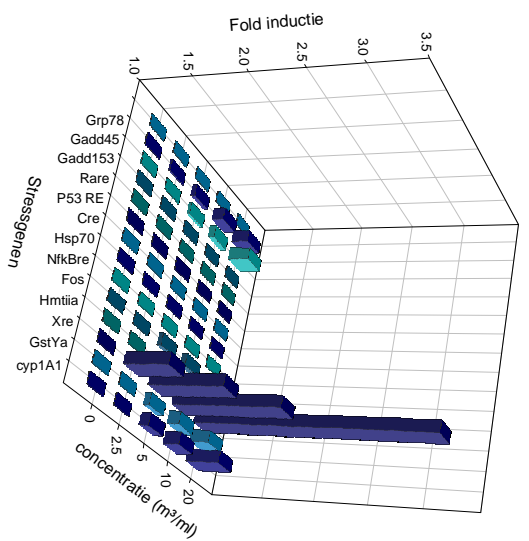
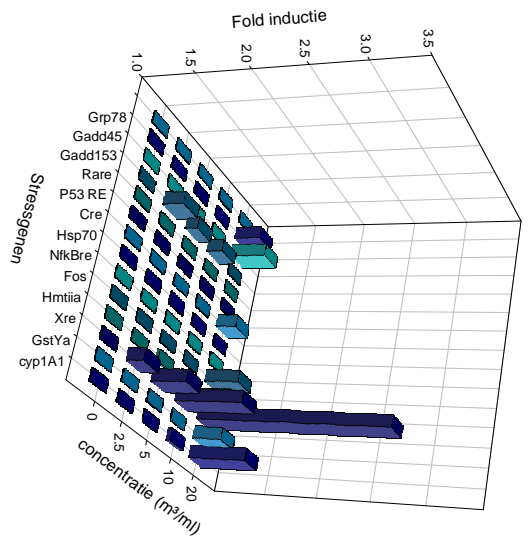
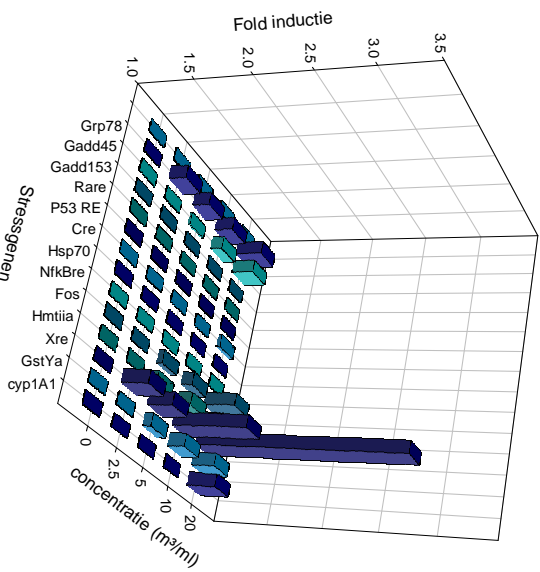
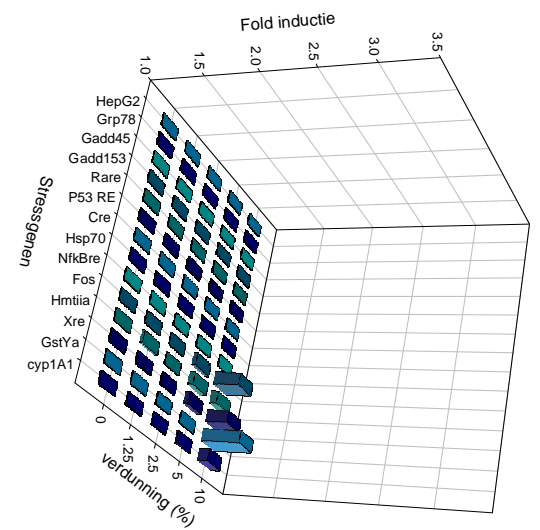


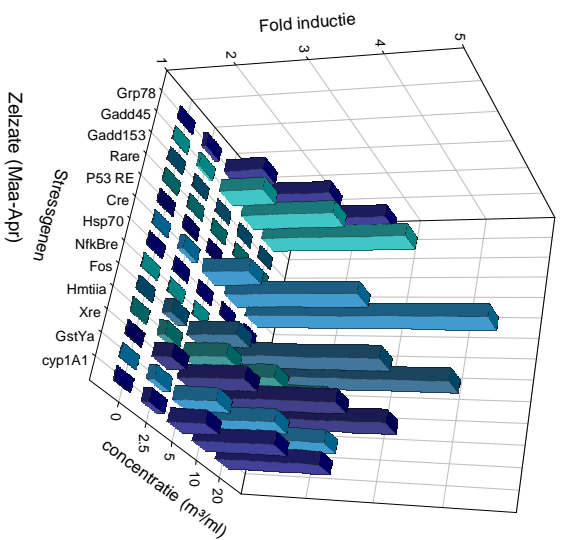
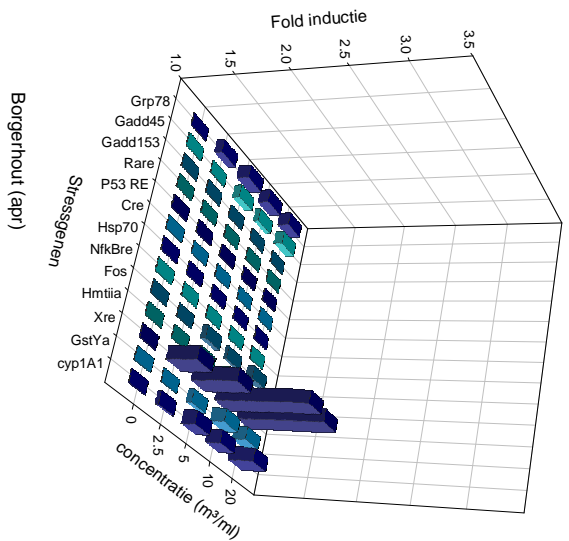
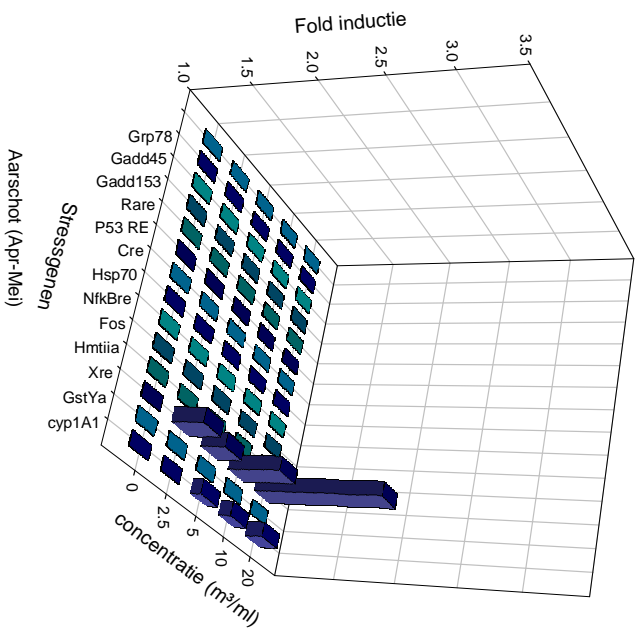
Winter



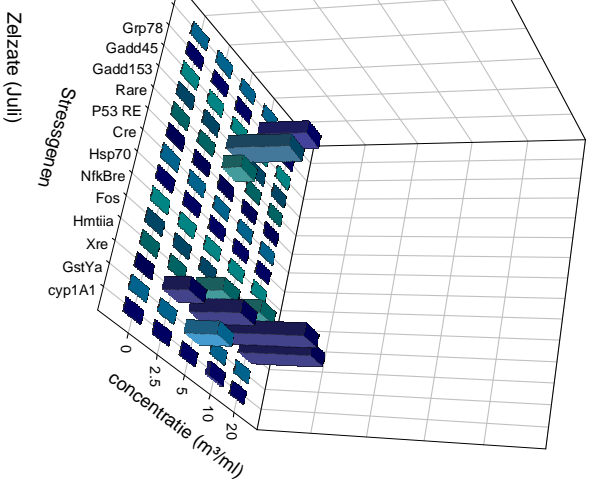
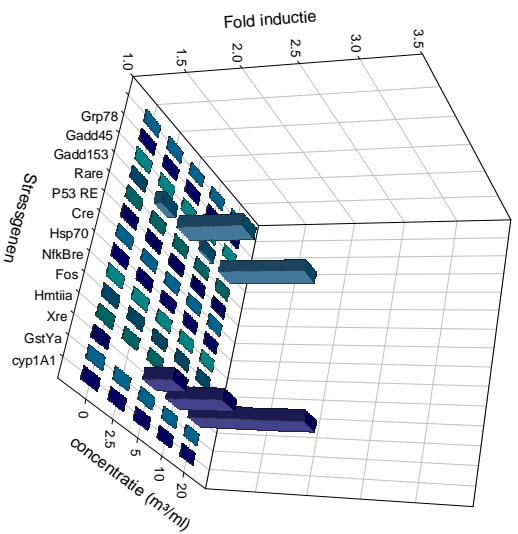
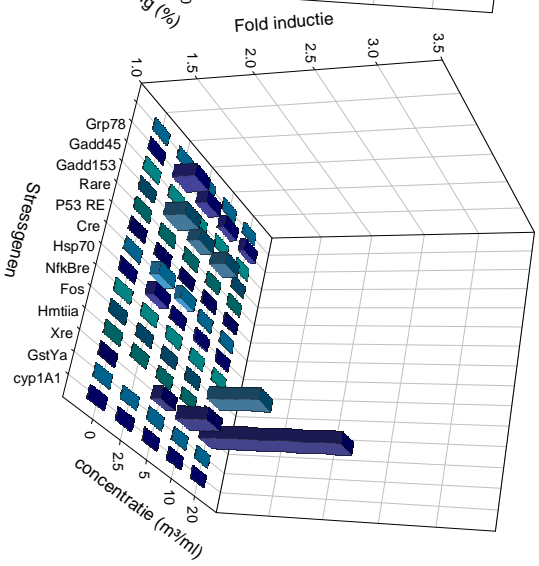
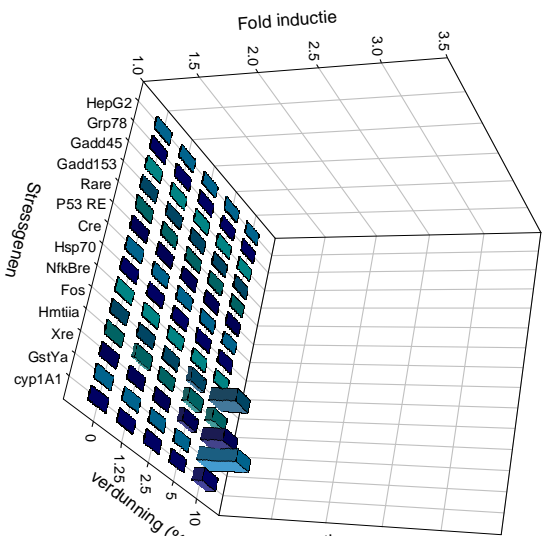


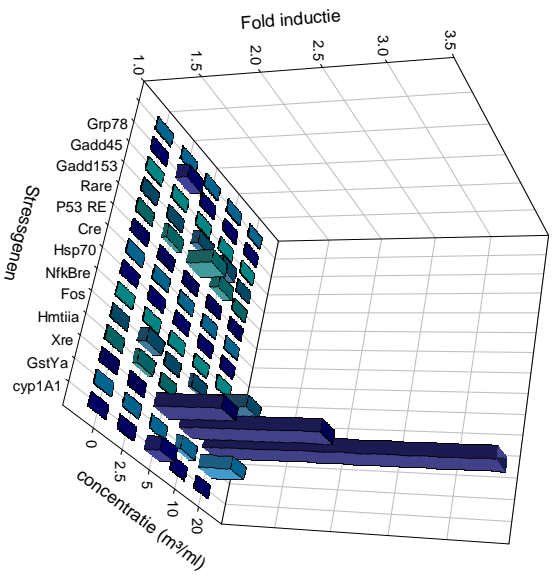
Lente



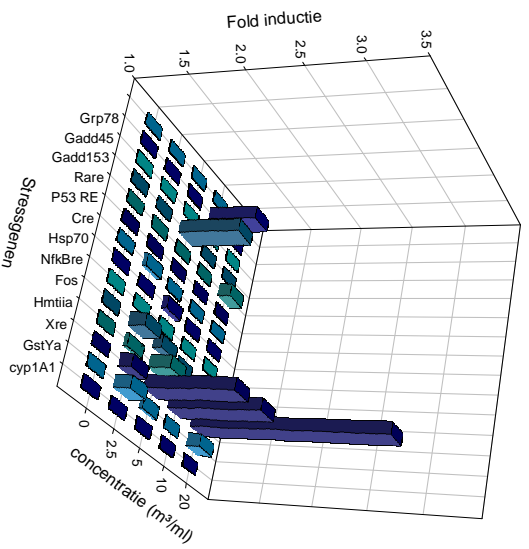


Zomer

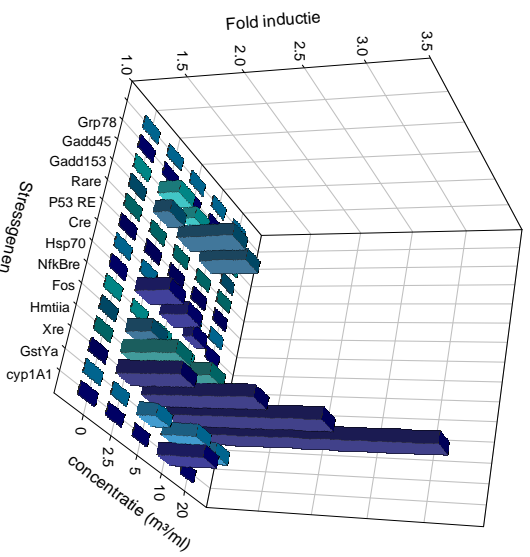




Aarschot (Aug-Sep)



Bongerhout (Aug-Sep)



Zelzate (Aug-Sep)

13 Annex III: MELN-test

Per locatie wordt een lijst van stalen met correctie voor overeenkomstige blanco van de extractiereeks weergegeven.

Zelzate		MELN assay														Achtergrond filter: % inductie tov solvent control (=100%),				
		Agonist mode: % inductie tov solvent control (=100%)							Agonist mode: relatieve oestrogene inductie											
		Verdunning: 1/100 in well							correctie met blank filter: ratio (RIS)											
		Ingekleurd als signif tov SC																		
datum	Extracties	Extract nr.	Exp. Nr MELN	1.21 m3/ml	2.43 m3/ml	4.86 m3/ml	9.72 m3/ml	TOX	test herhaling rest staal	1.21 m3/ml	2.43 m3/ml	4.86 m3/ml	9.72 m3/ml	datum	Blank filters (extrapol)	12.50%	25%	50%	100%	
04/09/2006	26JM068	9	07CV-MELN24-REP01-09		151	182	183	/	x			1.53	1.54	1.38	04/09/2006	26JM068		99	118	133
16/09/2006	26JM068	6	07CV-MELN24-REP01-09		152	170	205	/	x			1.54	1.44	1.54	16/09/2006	26JM068		99	118	133
28/09/2006	26JM068	3	07CV-MELN24-REP01-09		145	171	251	/	x			1.47	1.45	1.89	28/09/2006	26JM068		99	118	133
10/10/2006	27JM001	14	07KS-MELN008-REP01-05	416.9	468.9	643.8		/		3.27	3.30	3.76		10/10/2006	27JM001	127.3	142.0	171.2	229.7	
22/10/2006	27JM001	13	07KS-MELN008-REP01-05	334.0	387.8	518.8		/		2.62	2.73	3.03		22/10/2006						
03/11/2006	27JM001	12	07KS-MELN008-REP01-05	356.3	408.3	520.2		/		2.80	2.88	3.04		03/11/2006						
15/11/2006	27JM001	11	07KS-MELN008-REP01-05	409.9	456.8	609.1		/		3.22	3.22	3.56		15/11/2006						
27/11/2006	27JM005	29	07CV-MELN24-REP01-09		150	183	218	/	x			1.28	1.33	0.97	27/11/2006	27JM005		117.5	138.0	224.5
09/12/2006	27JM005	30	07CV-MELN24-REP01-09		135	152	247	/	x			1.15	1.10	1.10	09/12/2006	27JM005		117.5	138.0	224.5
21/12/2006	27JM005	31	07CV-MELN012-REP05-11(\$)	101.3	138.8	292.1		/						\$	21/12/2006		72.7	81.1	97.8	131.2
02/01/2007	27JM005	32	07CV-MELN24-REP01-09		150	163	237	+	x			1.28	1.18	1.06	02/01/2007	27JM005		117.5	138	224.5
14/01/2007	27JM005	33	07CV-MELN24-REP01-09		156	178	265	/	x			1.33	1.29	1.18	14/01/2007	27JM005		117.5	138	224.5
26/01/2007	27JM012	42	07CV-MELN013-REP05-09		315.3	528.7	658.2	/				1.48	2.06	1.91	26/01/2007	27JM012	190.7	212.6	256.4	344.0
07/02/2007	27JM012	43	07CV-MELN013-REP05-09	197.3	246.9	296.5		/		1.03	1.16	1.16		07/02/2007						
19/02/2007	27JM012	44	07CV-MELN013-REP05-09		242.3	315.0	466.8	/				1.14	1.23	1.36	19/02/2007					
03/03/2007	27JM012	45	07CV-MELN013-REP05-09		210.4	247.0	381.0	/				0.99	0.96	1.11	03/03/2007					
15/03/2007	27JM012	46	07CV-MELN013-REP05-09	266.6	344.2	547.7		/		1.40	1.62	2.14		15/03/2007						
27/03/2007	27JM019	51	07CV-MELN023-REP01-08		168	205	271.00	/				1.65	1.85	2.24	27/03/2007	27JM019		102	111	121.0
08/04/2007	27JM019	52	07CV-MELN023-REP01-08		183			/				1.79			08/04/2007					
20/04/2007	27JM019	53	07CV-MELN023-REP01-08		145	154	182	+				1.42	1.39	1.50	20/04/2007					
02/05/2007	27JM019	54	07CV-MELN023-REP01-08				256	/						2.12	02/05/2007					
14/05/2007	27JM024	62	07CV-MELN023-REP01-08		150	155	197	+				1.25	1.24	1.29	14/05/2007	27JM024		120	125	153.0
26/05/2007	27JM024	63	07CV-MELN023-REP01-08		140	167	197	/				1.17	1.34	1.29	26/05/2007					
07/06/2007	27JM024	64	07CV-MELN023-REP01-08		164	185	222	+++				1.37	1.48	1.45	07/06/2007					
19/06/2007	27JM031	77	08CV-MELN002-REP01-07		116	148	165	+				1.46	1.98	1.95	19/06/2007	27JM031		79	74	85
01/07/2007	27JM031	78	08CV-MELN002-REP01-07		118	148	147	/				1.50	1.98	1.74	01/07/2007					
13/07/2007	27JM031	79	08CV-MELN002-REP01-07		91	94	173	/				1.15	1.26	2.05	13/07/2007					
25/07/2007	27JM031	80	08CV-MELN002-REP01-07		102	120	135	/				1.29	1.61	1.60	25/07/2007					
06/08/2007	27JM031	81	08CV-MELN002-REP01-07		102	98	115	/				1.29	1.31	1.35	06/08/2007					
18/08/2007	27JM031	82	08CV-MELN002-REP01-07		114	130	157	/				1.45	1.75	1.86	18/08/2007					
30/08/2007	27JM031	83	08CV-MELN002-REP01-07		91	118	146	+				1.16	1.58	1.72	30/08/2007					
11/09/2007	27JM031	84	08CV-MELN002-REP01-07		139	157	226	+				1.76	2.10	2.68	11/09/2007					

(\$): SC hoge variabiliteit: test ongeldig, geen reststaal om herhaling op te zetten

Aarschot			MELN assay											Achtergrond filter: % inductie tov solvent control (=100%),					
			Agonist mode: % inductie tov solvent control (=100%), Verdunning: 1/100 in well						Agonist mode: relatieve oestrogene inductie correctie met blank filter: ratio (RIS)										
datum staalname	Extracties	Extractnr.	Exp. Nr MELN	1.21 m3/ml	2.43 m3/ml	4.86 m3/ml	9.72 m3/ml	TOX	Test herhaling rest	1.21 m3/ml	2.43 m3/ml	4.86 m3/ml	9.72 m3/ml	datum staalname	Blank filters (extrapol)	12.50%	25%	50%	100%
04/09/2006	26JM068	17	07CV-MELN024-REP01-09		130	140	160		x		1.32	1.19	1.20	04/09/2006	26JM068		98.5	118	133
16/09/2006	26JM068	14	07KS-MELN005-REP01-05		271.6	315.5	375.4	/			1.83	1.76	1.57	16/09/2006		133.0	148.2	178.8	239.9
28/09/2006	26JM068	11	07CV-MELN024-REP01-09		189	163	176		x		1.92	1.38	1.32	26JM068		98.5	118	133	
10/10/2006	27JM001	4	07KS-MELN008-REP01-05	413.5	423.7	505.8		/		3.25	2.98	2.95	10/10/2006	27JM001	127.3	142.0	171.2	229.7	
22/10/2006	27JM001	3	07KS-MELN008-REP01-05	403.1	469.5	519.0		/		3.17	3.31	3.03	22/10/2006		127.3	142.0	171.2	229.7	
03/11/2006	27JM001	2	07KS-MELN008-REP01-05	387.3	443.6	623.8		/		3.04	3.13	3.64	03/11/2006		127.3	142.0	171.2	229.7	
15/11/2006	27JM001	1	07KS-MELN008-REP01-05	337.1	340.4	409.9		/		2.65	2.40	2.39	15/11/2006		127.3	142.0	171.2	229.7	
27/11/2006	27JM005	16	07CV-MELN024-REP01-09		146	178	210		x		1.24	1.29	0.94	27/11/2006	27JM005	117.5	138.0	224.5	
09/12/2006	27JM005	17	07CV-MELN024-REP01-09		137	149	212		x		1.17	1.08	0.94	09/12/2006	27JM005	117.5	138	224.5	
21/12/2006	27JM005	18	07CV-MELN012-REP05-11(\$)	107.8	140.4	291.4		/					\$	21/12/2006	27JM005				
02/01/2007	27JM005	19	07CV-MELN024-REP01-09		197	239	362		x		1.68	1.73	1.61	02/01/2007	27JM005	117.5	138	224.5	
14/01/2007	27JM005	20	07CV-MELN024-REP01-09		117	153	208		x		1.00	1.11	0.93	14/01/2007	27JM005	117.5	138	224.5	
07/02/2007	27JM012	34	07CV-MELN013-REP05-09		234.8	306.2	434.4	/			1.10	1.19	1.26	07/02/2007	27JM012	190.7	212.6	256.4	344.0
19/02/2007	27JM012	35	07CV-MELN013-REP05-09	190.6	241.5	316.2		/		1.00	1.14	1.23	19/02/2007		190.7	212.6	256.4	344.0	
03/03/2007	27JM012	36	07CV-MELN013-REP05-09		202.5	249.5	412.1	/			0.95	0.97	1.20	03/03/2007		190.7	212.6	256.4	344.0
15/03/2007	27JM012	37	07CV-MELN013-REP05-09	238.1	239.7	404.1		/		1.25	1.13	1.58	15/03/2007		190.7	212.6	256.4	344.0	
20/04/2007	27JM019	47	07CV-MELN023-REP01-08		168.2	188.4	315.2	/			1.65	1.70	2.61	20/04/2007	27JM019		102	111	121.0
02/05/2007	27JM019	48	07CV-MELN023-REP01-08		172	205	249	/			1.69	1.85	2.06	02/05/2007		102	111	121.0	
14/05/2007	27JM019	49	07CV-MELN023-REP01-08		159	218	226	+			1.56	1.96	1.87	14/05/2007		102	111	121.0	
26/05/2007	27JM024	55	07CV-MELN023-REP01-08		158	189	237	+			1.32	1.51	1.55	26/05/2007	27JM024	120	125	153.0	
07/06/2007	27JM024	56	07CV-MELN023-REP01-08		157	181	223	+			1.31	1.45	1.46	07/06/2007		120	125	153.0	
19/06/2007	27JM024	57	07CV-MELN023-REP01-08		153	194	222	/			1.28	1.55	1.45	19/06/2007		120	125	153.0	
01/07/2007	27JM031	65	08CV-MELN002-REP01-07		114	122	136	/			1.45	1.64	1.61	01/07/2007	27JM031	79	74	85	
13/07/2007	27JM031	66	08CV-MELN002-REP01-07		105	122	125	+			1.33	1.64	1.48	13/07/2007		79	74	85	
25/07/2007	27JM031	67	08CV-MELN002-REP01-07		114	144	185	+			1.44	1.94	2.19	25/07/2007		79	74	85	
06/08/2007	27JM031	68	08CV-MELN002-REP01-07		101	99	121	/			1.28	1.32	1.43	06/08/2007		79	74	85	
18/08/2007	27JM031	69	08CV-MELN002-REP01-07					/						18/08/2007		79	74	85	
30/08/2007														30/08/2007		79	74	85	
11/09/2007	27JM031	70	08CV-MELN002-REP01-07		89	98	111	/			1.13	1.31	1.32	11/09/2007		79	74	85	

(\$): SC hoge variabiliteit: resultaten niet gebruikt, test niet geldig

Borgerhout															MELN assay																			
		Agonist mode: % inductie tov solvent control (=100%), Verdunding: 1/100 in well								Ingekleurd als signif tov SC							Agonist mode: relatieve oestrogene inductie correctie met blank filter:ratio (RIS)				Achtergrond filter: % inductie tov solvent control (=100%),													
datum staalname	Extracties	Extractnr.	Exp. Nr MELN	1.21 m3/ml	2.43 m3/ml	4.86 m3/ml	9.72 m3/ml	TOX	Test herhaling reststaal	1.21 m3/ml	2.43 m3/ml	4.86 m3/ml	9.72 m3/ml	datum staalname	Blank filters (extrapol)	12.50%	25%	50%	100%															
04/09/2006	26JM068	23	07CV-MELN024-REP01-09		149	189	205		x		1.51	1.60	1.54	04/09/2006	26JM068		98.5	118.0	133.0															
16/09/2006	26JM068	22	07KS-MELN005-REP01-05		296.3	339.5	326.2	/			2.00	1.90	1.36	16/09/2006			148.2	178.8	239.9															
28/09/2006	26JM068	19	07KS-MELN005-REP01-05		251.1	277.3	273.0	/			1.69	1.55	1.14	28/09/2006			148.2	178.8	239.9															
10/10/2006	27JM001	9	07KS-MELN008-REP01-05	371.3	408.2	530.1		/		2.92	2.88	3.10		10/10/2006	27JM001	127.3	142.0	171.2	229.7															
22/10/2006	27JM001	7	07KS-MELN008-REP01-05	391.7	446.7	468.8		/		3.08	3.15	2.74		22/10/2006		127.3	142.0	171.2	229.7															
03/11/2006	27JM001	6	07KS-MELN008-REP01-05	334.7	367.6	412.4		/		2.63	2.59	2.41		03/11/2006		127.3	142.0	171.2	229.7															
15/11/2006	27JM005	22	07CV-MELN024-REP01-09		134	165	242		x		1.14	1.20	1.08		27JM005		117.5	138.0	224.5															
27/11/2006	27JM005	23	07CV-MELN024-REP01-09		142	159	204		x		1.21	1.15	0.91				117.5	138	224.5															
09/12/2006	27JM005	24	07CV-MELN012-REP05-11(\$)		145.1	156.0	241.4	/					\$	09/12/2006	27JM005																			
21/12/2006	27JM005	25	07CV-MELN012-REP05-11(\$)	104.0	138.4	299.0		/					\$	21/12/2006																				
02/01/2007	27JM005	26	07CV-MELN024-REP01-09		126	166	203		x		1.07	1.20	0.90				117.5	138	224.5															
14/01/2007	27JM005	27	07CV-MELN024-REP01-09		130	146	241		x		1.11	1.06	1.07				117.5	138	224.5															
07/02/2007	27JM012	38	07CV-MELN013-REP05-09	146.1	181.6	217.4		/			0.85	0.85		07/02/2007	27JM012	190.7	212.6	256.4	344.0															
19/02/2007	27JM012	39	07CV-MELN013-REP05-09	144.7	215.1	292.4		/		0.76	1.01	1.14		19/02/2007		190.7	212.6	256.4	344.0															
03/03/2007	27JM012	40	07CV-MELN013-REP05-09		205.5	306.0	455.5	/			0.97	1.19	1.32	03/03/2007		190.7	212.6	256.4	344.0															
15/03/2007	27JM012	41	07CV-MELN013-REP05-09	218.7	298.8	501.5		/		1.15	1.41	1.96		15/03/2007		190.7	212.6	256.4	344.0															
20/04/2007	27JM019	50	07CV-MELN023-REP01-08		106	112	136	/			1.04	1.01	1.12	20/04/2007	27JM019		102	111	121.0															
14/05/2007	27JM024	58	07CV-MELN023-REP01-08		163	167	208	+			1.36	1.34	1.36	14/05/2007	27JM024		120	125	153.0															
26/05/2007	27JM024	59	07CV-MELN023-REP01-08		146	153	186	+			1.22	1.22	1.22	26/05/2007			120	125	153.0															
07/06/2007	27JM024	60	07CV-MELN023-REP01-08		126	144	185	/			1.05	1.15	1.21	07/06/2007			120	125	153.0															
19/06/2007	27JM024	61	07CV-MELN023-REP01-08		167	198	251	+			1.39	1.58	1.64	19/06/2007			120	125	153.0															
01/07/2007	27JM031	71	08CV-MELN002-REP01-07		121	137	151	+			1.53	1.84	1.79	01/07/2007	27JM031		79	74	85															
13/07/2007	27JM031	72	08CV-MELN002-REP01-07		83	82	86	/			1.06	1.10	1.01	13/07/2007			79	74	85															
25/07/2007	27JM031	73	08CV-MELN002-REP01-07		72	76	90	/			0.91	1.02	1.07	25/07/2007			79	74	85															
06/08/2007														06/08/2007			79	74	85															
18/08/2007	27JM031	74	08CV-MELN002-REP01-07		83	115	141	+			1.05	1.54	1.66	18/08/2007			79	74	85															
30/08/2007	27JM031	75	08CV-MELN002-REP01-07		99	104	121	/			1.26	1.40	1.43	30/08/2007			79	74	85															
11/09/2007	27JM031	76	08CV-MELN002-REP01-07		95	104	116	/			1.20	1.40	1.37	11/09/2007			79	74	85															

(\$): SC hoge variabiliteit: test ongeldig, geen reststaal om herhaling op te zetten

14 Annex IV: Cytotoxiciteit

Voor elke cellijn (THP-1, A549 en Beas-2B) worden per locatie de cytotoxiciteitsdata weergegeven. Voor elke monstername dag wordt voor elke blootstellingconcentratie de celviabiliteit weergegeven ten opzichte van de negatieve controle.

Resultaten in de THP-1 cellijn.

Aarschot						Borgerhout						Zelzate								
	0	TSP µg/ml					0	TSP µg/ml					0	TSP µg/ml						
		12,5	25	50	100	200		12,5	25	50	100	200		12,5	25	50	100	200		
4/09/2006	100	85,19	78,86	75,95	63,06	55,89	4/09/2006	100	86,07	82,97	76,74	66,62	46,06	4/09/2006	100	91,95	92,86	84,42	80,32	77,29
16/09/2006	100	83,03	77,86	69,73	60,61	45,11	16/09/2006	100	87,35	83,47	75,22	60,66	50,38	16/09/2006	100	90,29	84,26	78,54	67,51	54,48
28/09/2006	100	98,76	96,59	96,86	94,59	90,97	28/09/2006	100	101,02	102,06	99,34	95,00	93,15	28/09/2006	100	96,48	93,65	92,17	87,38	81,01
10/10/2006	100	81,81	71,64	57,76	56,36	59,17	10/10/2006	100	70,9	68,1	61,7	61,6	62,4	10/10/2006	100	78,61	70,72	65,33	64,45	66,11
22/10/2006	100	65,18	59,47	58,73	55,11	49,93	22/10/2006	100	60,7	60,4	56,9	52,4	60,4	22/10/2006	100	66,16	65,17	58,73	55,33	53,57
3/11/2006	100	96,1	87,8	89,7	79,0	70,8	3/11/2006	100	91,5	87,5	86,8	82,6	72,9	3/11/2006	100	91,4	89,2	83,3	86,2	70,0
15/11/2006	100	104,2	96,5	96,1	97,6	91,6	15/11/2006	100	95,1	94,7	89,5	89,6	82,3	15/11/2006	100	88,6	86,2	86,9	83,4	80,7
27/11/2006	100	97,9	92,1	93,8	91,8	91,6	27/11/2006	100	95,1	92,1	93,4	88,7	84,5	27/11/2006	100	99,1	95,5	97,9	95,9	79,6
9/12/2006	100	97,5	96,2	99,1	98,5	92,3	9/12/2006	100	105,3	104,4	103,5	105,1	103,3	9/12/2006	100	94,6	95,1	92,1	86,9	87,7
21/12/2006	100	94,5	93,1	97,3	99,9	103,4	21/12/2006	100	99,3	92,9	96,8	100,9	98,1	21/12/2006	100	98,9	93,5	94,7	94,0	101,3
2/01/2007	100	96,2	94,2	93,6	94,0	89,1	2/01/2007	100	96,0	99,3	97,9	95,6	92,1	2/01/2007	100	102,3	94,6	100,0	88,7	86,0
14/01/2007	100	96,0	90,9	93,9	85,6	90,6	14/01/2007	100	95,7	95,0	96,0	90,9	95,7	14/01/2007	100	95,4	97,5	96,1	95,2	94,9
26/01/2007	100	97,8	95,8	94,9	86,6	97,4	26/01/2007	100	90,5	93,6	89,5	88,6	93,2	26/01/2007	100	91,1	92,9	93,6	79,0	78,8
7/02/2007	100	97,7	94,0	88,5	70,3	61,1	7/02/2007	100	94,3	88,2	84,9	78,3	79,8	7/02/2007	100	95,6	90,3	90,8	85,7	79,0
19/02/2007	100	94,6	87,2	79,6	71,5	62,1	19/02/2007	100	92,7	88,9	92,8	87,1	85,3	19/02/2007	100	89,7	88,4	85,8	79,7	64,2
3/03/2007	100	96,5	90,1	97,4	98,4	93,3	3/03/2007	100	95,3	94,4	95,2	88,3	85,7	3/03/2007	100	100,0	96,3	97,8	95,3	94,3
15/03/2007	100	98,6	94,1	96,8	91,7	90,0	15/03/2007	100	97,9	93,7	95,2	93,6	91,4	15/03/2007	100	100,0	96,3	97,8	95,3	94,3
27/03/2007							27/03/2007							27/03/2007	100	103,7	103,7	99,5	102,8	91,1
8/04/2007							8/04/2007							8/04/2007						
20/04/2007	100	96,5	93,0	89,5	81,2	77,1	20/04/2007	100	85,1	75,1	67,4	62,2	64,7	20/04/2007	100	96,5	93,0	89,5	81,2	77,1
2/05/2007	100	99,4	104,9	103,8	99,8	97,9	2/05/2007							2/05/2007	100	94,0	87,7	79,6	74,3	65,3
14/05/2007	100	95,1	102,5	96,7	97,1	93,5	14/05/2007	100	101,4	94,6	90,8	87,9	80,9	14/05/2007	100	86,8	84,1	82,6	75,2	68,5
26/05/2007	100	99,5	98,5	101,8	98,0	99,5	26/05/2007	100	86,3	89,8	87,7	85,5	78,0	26/05/2007	100	103,1	104,1	105,3	109,6	105,1
7/06/2007	100	93,0	91,2	89,7	86,3	80,4	7/06/2007	100	91,0	85,0	80,4	76,4	67,8	7/06/2007	100	102,0	96,9	93,1	90,3	86,4
19/06/2007	100	99,9	101,4	97,9	95,9	95,8	19/06/2007	100	93,7	94,2	95,4	93,6	89,1	19/06/2007	100	100,2	94,7	98,1	97,9	88,9
1/07/2007	100	101,5	95,2	89,1	90,7	81,9	1/07/2007	100	102,1	101,4	105,3	106,1	97,4	1/07/2007	100	94,7	95,5	95,5	91,3	87,1
13/07/2007	100	84,9	79,9	80,9	81,9	73,8	13/07/2007	100	96,0	96,0	94,6	93,3	91,1	13/07/2007	100	96,1	95,8	90,1	84,7	81,5
25/07/2007	100	96,2	96,2	92,9	89,8	81,2	25/07/2007	100	98,0	95,0	96,7	92,7	93,9	25/07/2007	100	95,4	91,9	90,0	94,9	86,1
6/08/2007							6/08/2007							6/08/2007	100	98,6	100,6	97,7	96,9	82,4
18/08/2007							18/08/2007	100	99,8	98,6	100,1	90,7	85,2	18/08/2007	100	95,1	96,2	93,9	93,6	94,0
30/08/2007	100	97,8	97,5	96,8	91,1	83,1	30/08/2007	100	98,2	99,4	95,1	97,5	85,2	30/08/2007	100	107,7	110,0	103,4	92,1	102,7
11/09/2007	100	94,4	96,2	94,6	95,7	92,1	11/09/2007	100	110,8	105,2	95,7	90,0	80,4	11/09/2007	100	92,4	85,8	79,8	82,0	86,2
gemiddelde		94,27	91,18	89,76	85,78	81,81	81,92	93,47	91,28	89,30	85,78	81,80		94,73	92,34	90,14	86,74	82,12		
SD		7,84	9,79	11,73	13,75	16,11		9,85	10,24	12,01	13,71	14,47		7,82	8,69	10,23	11,47	12,94		

Resultaten in de A549 cellijn.

Aarschot						Borgerhout						Zelzate								
	0	TSP µg/ml						0	TSP µg/ml						0	TSP µg/ml				
		12,5	25	50	100	200			12,5	25	50	100	200			12,5	25	50	100	200
4/09/2006	100	104,1841	112,6378	110,5398	112,758	109,8291	4/09/2006	100	110,687	113,5719	113,3635	111,6301	101,5326	4/09/2006	100	103,2399	109,2611	108,8678	107,8806	107,0611
16/09/2006	100	102,2299	107,0716	110,5312	113,1561	111,978	16/09/2006	100	105,8331	108,431	111,5106	115,6894	115,477	16/09/2006	100	95,41576	107,109	106,6631	109,2359	94,58847
28/09/2006	100	103,0721	101,6199	103,7214	102,7188	105,6701	28/09/2006	100	101,9448	99,61155	101,6118	100,8439	104,9488	28/09/2006	100	102,2253	101,9165	103,36	103,5871	106,7041
10/10/2006	100	108,1	109,4	111,8	113,1	120,8	10/10/2006	100	108,9	106,1	113,6	110,3	113,9	10/10/2006	100	107,2	108,3	114,3	117,9	125,7
22/10/2006	100	121,0027	114,8393	121,1072	119,586	130,1482	22/10/2006	100	107,4	109,1	107,3	112,6	114,1	22/10/2006	100	106,2508	103,275	104,0256	100,3667	105,7788
3/11/2006	100	100,7	100,1	100,8	101,1	102,3	3/11/2006	100	100,7	101,3	104,2	103,5	101,2	3/11/2006	100	103,8	101,6	105,3	103,2	103,6
15/11/2006	100	106,6	109,4	117,7	105,6	120,9	15/11/2006	100	102,9	99,7	101,7	100,3	104,0	15/11/2006	100	106,6	109,4	117,7	105,6	120,9
27/11/2006	100	99,6	89,6	91,1	95,6	94,1	27/11/2006	100	103,6	102,0	104,6	105,0	107,5	27/11/2006	100	105,9	104,9	101,9	108,1	118,2
9/12/2006	100	100,4	97,8	102,3	99,4	103,8	9/12/2006	100	102,9	99,5	103,8	98,5	104,9	9/12/2006	100	101,5	99,7	101,6	96,7	105,3
21/12/2006	100	93,1	88,7	92,1	98,0	97,3	21/12/2006	100	97,1	101,6	104,4	101,8	110,7	21/12/2006	100	101,3	99,9	102,6	94,1	104,3
2/01/2007	100	105,3	105,2	109,7	113,5	117,7	2/01/2007	100	104,2	101,4	105,9	101,9	109,1	2/01/2007	100	97,0	88,1	98,0	89,7	93,3
14/01/2007	100	105,3	101,7	107,9	103,4	113,6	14/01/2007	100	104,9	98,2	98,8	100,2	95,4	14/01/2007	100	99,2	98,9	103,3	104,4	107,7
26/01/2007	100	94,9	99,9	105,9	104,8	111,8	26/01/2007	100	101,2	99,5	102,8	104,4	102,6	26/01/2007	100	105,7	110,3	107,8	106,4	110,3
7/02/2007	100	98,7	97,1	99,1	99,8	103,9	7/02/2007	100	96,2	97,3	102,1	101,2	94,7	7/02/2007	100	95,0	93,1	103,0	99,5	108,7
19/02/2007	100	98,0	98,0	98,4	98,0	104,6	19/02/2007	100	98,5	99,4	102,2	99,8	108,7	19/02/2007	100	98,7	90,9	101,3	103,0	105,1
3/03/2007	100	100,8	99,4	102,8	107,0	117,3	3/03/2007	100	106,5	99,7	102,6	99,3	93,7	3/03/2007	100	104,1	102,3	107,8	104,9	108,6
15/03/2007	100	102,0	97,5	104,7	102,8	114,5	15/03/2007	100	99,2	93,1	102,7	101,7	103,3	15/03/2007	100	106,6	112,3	107,7	106,6	109,5
27/03/2007							27/03/2007							27/03/2007	100	104,1	100,3	97,9	93,8	88,8
8/04/2007							8/04/2007							8/04/2007						
20/04/2007	100	101,1	98,2	103,1	99,1	100,6	20/04/2007	100	80,3	69,6	55,6	38,4	27,9	20/04/2007	100	104,9	106,5	105,5	104,7	108,0
2/05/2007	100	107,2	106,4	105,5	102,4	99,3	2/05/2007							2/05/2007	100	102,7	93,1	95,0	91,9	84,3
14/05/2007	100	97,4	103,4	99,5	100,9	96,5	14/05/2007	100	102,5	105,2	108,0	102,2	97,8	14/05/2007	100	100,1	93,2	93,5	97,3	91,9
26/05/2007	100	99,6	98,7	93,7	100,9	100,1	26/05/2007	100	95,2	96,9	96,8	98,4	96,8	26/05/2007	100	94,7	93,4	94,8	95,7	98,8
7/06/2007	100	103,2	107,3	111,7	112,3	112,3	7/06/2007	100	102,7	100,8	99,7	98,0	91,8	7/06/2007	100	93,6	95,2	101,2	99,2	84,9
19/06/2007	100	96,6	96,2	97,9	97,2	91,2	19/06/2007	100	97,1	99,6	89,5	91,7	83,3	19/06/2007	100	100,8	106,0	103,8	107,0	106,0
1/07/2007	100	94,0	88,3	91,4	91,1	86,8	1/07/2007	100	97,1	100,1	99,4	99,7	97,3	1/07/2007	100	98,5	98,1	97,8	97,2	99,2
13/07/2007	100	91,3	83,9	98,6	102,1	104,7	13/07/2007	100	100,0	97,8	101,0	101,5	98,8	13/07/2007	100	98,8	99,4	99,2	100,0	98,4
25/07/2007	100	101,8	103,3	104,9	106,9	97,2	25/07/2007	100	103,1	96,2	106,9	101,1	102,1	25/07/2007	100	100,2	100,7	100,1	102,1	101,8
6/08/2007	100	102,3	100,3	103,2	102,9	100,5	6/08/2007							6/08/2007	100	98,6	97,8	102,5	99,6	97,8
18/08/2007							18/08/2007	100	101,6	101,6	101,5	108,2	98,5	18/08/2007	100	97,6	105,3	99,0	101,8	100,2
30/08/2007							30/08/2007	100	99,2	100,1	99,9	101,1	97,2	30/08/2007	100	101,8	107,7	98,6	100,1	94,6
11/09/2007	100	98,6	100,3	98,9	102,8	98,1	11/09/2007	100	100,2	98,2	98,4	95,4	96,3	11/09/2007	100	111,4	112,5	114,2	109,0	111,7
gemiddelde		101,32	100,58	103,53	103,90	105,98			101,13	99,84	101,42	100,15	99,06			101,54	101,62	103,17	101,96	103,28
SD		5,71	7,26	7,43	6,45	10,07			5,58	7,27	10,27	13,17	15,76			4,25	6,53	5,67	5,95	9,54

Resultaten in de Beas-2B cellijn.

Aarschot						Borgerhout						Zelzate								
	0	TSP µg/ml					0	TSP µg/ml					0	TSP µg/ml						
		12,5	25	50	100	200		12,5	25	50	100	200		12,5	25	50	100	200		
4/09/2006	100	98,21	96,99	85,16	66,99	56,29	4/09/2006	100	88,96	78,44	55,89	38,81	52,99	4/09/2006	100	74,4	52,1	57,8	41,6	0,0
16/09/2006	100	53,82	17,18	0,50	5,73	0,00	16/09/2006	100	56,77	31,25	18,15	12,70	15,65	16/09/2006	100	80,9	63,8	29,2	28,8	22,8
28/09/2006	100	91,32	79,71	64,20	51,94	44,22	28/09/2006	100	70,18	67,25	51,43	50,39	28,68	28/09/2006	100	59,8	31,7	23,6	18,2	0,0
10/10/2006	100	95,10	89,32	114,10	92,55	93,90	10/10/2006	100	108,47	106,04	106,11	104,23	100,85	10/10/2006	100	109,4	98,7	93,0	109,4	81,4
22/10/2006	100	97,61	107,68	103,50	99,69	86,08	22/10/2006	100	109,5	114,6	105,6	104,3	90,7	22/10/2006	100	84,4	81,3	59,7	54,8	52,1
3/11/2006	100	80,8	92,5	82,5	84,1	64,5	3/11/2006	100	102,5	120,9	120,7	126,9	125,1	3/11/2006	100	96,0	94,6	96,5	68,7	69,2
15/11/2006	100	85,3	76,8	79,7	66,3	57,0	15/11/2006	100	97,0	98,7	104,2	100,4	98,9	15/11/2006	100	97,2	100,8	105,3	110,3	99,6
27/11/2006	100	102,3	109,1	105,1	114,5	105,0	27/11/2006	100	88,2	88,2	84,8	87,0	81,2	27/11/2006	100	69,4	73,4	63,8	68,6	72,5
9/12/2006	100	92,0	104,6	97,8	89,9	86,1	9/12/2006	100	91,4	96,7	99,1	100,6	99,3	9/12/2006	100	74,3	67,5	87,6	75,1	80,4
21/12/2006	100	82,8	87,1	88,7	81,6	68,0	21/12/2006	100	84,8	83,7	75,1	83,0	82,1	21/12/2006	100	93,3	88,8	91,2	87,0	85,0
2/01/2007	100	68,0	75,2	73,7	68,5	69,1	2/01/2007	100	99,3	86,2	92,0	72,2	72,7	2/01/2007	100	79,5	70,3	72,5	62,0	48,1
14/01/2007	100	106,2	102,6	111,6	106,3	95,0	14/01/2007	100	88,8	95,8	99,2	97,1	88,3	14/01/2007	100	116,2	119,4	115,7	112,2	104,1
26/01/2007	100	99,9	102,7	105,6	103,4	103,3	26/01/2007	100	108,0	113,3	118,5	118,2	122,5	26/01/2007	100	79,2	71,0	48,3	47,0	32,8
7/02/2007	100	99,7	90,9	73,7	58,6	47,1	7/02/2007	100	99,1	103,5	97,5	80,6	49,8	7/02/2007	100	117,7	110,2	114,3	111,9	89,0
19/02/2007	100	100,0	88,5	72,0	58,0	47,8	19/02/2007	100	118,6	114,4	113,0	90,2	69,3	19/02/2007	100	97,0	96,0	76,4	60,8	49,5
3/03/2007	100	86,1	68,3	46,1	27,3	27,5	3/03/2007	100	85,6	69,1	61,9	40,3	28,9	3/03/2007	100	72,6	51,0	33,3	20,8	22,2
15/03/2007	100	84,3	73,3	60,8	35,8	21,5	15/03/2007	100	81,6	75,4	60,0	39,5	23,8	15/03/2007	100	91,7	77,2	55,4	35,8	21,7
27/03/2007							27/03/2007							27/03/2007	100	75,9	62,3	31,4	17,9	16,5
8/04/2007							8/04/2007							8/04/2007	100	91,5	83,4	75,2	63,1	48,3
20/04/2007	100	87,2	75,1	57,8	31,7	10,8	20/04/2007	100	80,3	69,6	55,6	38,4	27,9	20/04/2007	100	60,5	43,1	34,2	28,0	23,2
2/05/2007	100	67,8	59,6	40,7	26,3	19,9	2/05/2007							2/05/2007	100	77,8	64,7	53,6	40,0	22,4
14/05/2007							14/05/2007	100	89,1	64,1	73,3	51,4	31,4	14/05/2007	100	96,1	94,3	79,3	63,6	39,5
26/05/2007	100	95,6	85,7	75,7	74,5	61,7	26/05/2007	100	93,9	91,3	80,3	68,1	47,4	26/05/2007	100	89,8	83,9	87,4	74,0	54,1
7/06/2007	100	87,6	76,0	64,6	54,1	33,2	7/06/2007	100	91,3	83,8	73,5	74,7	60,9	7/06/2007	100	90,1	85,2	76,7	65,0	43,2
19/06/2007	100	80,1	68,6	50,7	36,6	22,0	19/06/2007	100	89,5	70,5	57,0	35,8	25,1	19/06/2007	100	88,5	89,0	69,3	49,1	40,9
1/07/2007	100	95,7	85,0	74,9	59,6	37,7	1/07/2007	100	90,9	101,7	95,3	90,5	77,3	1/07/2007	100	80,1	78,8	56,4	36,5	22,9
13/07/2007	100	96,6	99,7	55,1	44,2	35,1	13/07/2007	100	90,6	94,4	94,9	89,2	78,4	13/07/2007	100	88,9	94,0	69,9	56,9	42,0
25/07/2007	100	97,7	100,8	94,8	71,3	49,3	25/07/2007	100	94,7	89,0	62,5	53,6	44,0	25/07/2007	100	94,0	89,6	69,2	52,9	40,1
6/08/2007	100	91,6	87,2	78,4	63,4	47,1	6/08/2007							6/08/2007	100	87,5	65,5	55,0	34,8	32,5
18/08/2007							18/08/2007	100	93,8	102,2	102,4	90,6	46,0	18/08/2007	100	89,2	74,4	66,4	49,4	33,6
30/08/2007							30/08/2007	100	115,7	105,9	98,4	88,5	71,7	30/08/2007	100	82,8	82,2	73,3	55,2	40,2
11/09/2007	100	93,7	87,7	89,9	66,3	51,6	11/09/2007	100	95,1	94,5	85,5	82,2	69,1	11/09/2007	100	96,5	93,9	81,2	59,1	53,3
gemiddelde		89,52	84,74	75,83	64,42	53,35		92,98	89,65	83,64	75,33	64,64		86,94	79,14	68,80	58,08	46,34		
SD		11,84	18,75	25,04	27,05	28,42		12,83	19,42	24,20	28,33	30,49		13,47	19,13	23,76	26,45	26,97		

15 Annex V: Cytokine productie

Voor elke cytokine wordt per locatie de cytokine inductie weergegeven. Voor elke monstername dag wordt voor elke blootstellingconcentratie de cytokine inductie weergegeven ten opzichte van de negatieve controle.

Resultaten TNF- α inductie in de THP-1 cellijn.

Aarschot						Borgerhout						Zelzate								
TSP ($\mu\text{g}/\text{ml}$)						TSP ($\mu\text{g}/\text{ml}$)						TSP ($\mu\text{g}/\text{ml}$)								
0	12,5	25	50	100	200	0	12,5	25	50	100	200	0	12,5	25	50	100	200			
4/09/2006	1	4,2	8,3	14,5	30,6	41,8	4/09/2006	1	7,7	9,8	43,5	29,6	46,7	4/09/2006	1	0,9	2,0	4,8	8,5	16,1
16/09/2006	1	6,9	12,0	18,9	28,6	29,8	16/09/2006	1	6,4	13,4	24,2	26,4	31,2	16/09/2006	1	7,9	15,6	29,5	49,0	49,2
28/09/2006	1	3,2	4,7	6,6	10,6	11,2	28/09/2006	1	1,7	2,7	4,3	7,6	11,1	28/09/2006	1	7,5	13,1	23,0	36,2	52,6
10/10/2006	1	16,9	20,9	39,0	29,7	22,9	10/10/2006	1	4,3	7,4	14,4	17,8	18,5	10/10/2006	1	5,7	13,2	14,9	23,8	18,7
22/10/2006	1	3,9	8,3	12,4	12,6	17,3	22/10/2006	1	2,5	8,3	13,8	17,7	20,1	22/10/2006	1	10,4	15,6	19,9	22,7	22,2
3/11/2006	1	3,1	5,5	10,1	13,5	18,7	3/11/2006	1	1,9	4,2	6,1	7,6	11,7	3/11/2006	1	5,5	12,8	15,4	18,5	22,8
15/11/2006	1	3,7	5,8	8,7	7,8	6,3	15/11/2006	1	2,5	4,0	6,0	8,5	10,0	15/11/2006	1	5,5	8,5	8,8	11,5	9,3
27/11/2006	1	0,9	2,1	2,9	3,1	4,5	27/11/2006	1	3,0	4,3	6,6	9,6	19,4	27/11/2006	1	2,4	3,4	5,6	8,1	13,8
9/12/2006	1	1,9	2,6	3,0	4,3	5,4	9/12/2006	1	1,5	2,0	2,7	4,6	4,6	9/12/2006	1	1,9	2,3	2,6	3,4	4,4
21/12/2006	1	1,6	1,9	2,2	2,5	4,6	21/12/2006	1	2,0	3,0	3,6	5,0	8,6	21/12/2006	1	1,4	1,9	2,3	2,7	3,8
2/01/2007	1	1,5	2,0	2,8	3,8	6,0	2/01/2007	1	3,1	3,0	5,6	8,7	14,3	2/01/2007	1	3,5	5,0	7,2	9,6	19,9
14/01/2007	1	3,8	4,9	4,9	7,5	7,3	14/01/2007	1	3,5	3,0	3,8	5,4	6,2	14/01/2007	1	3,7	5,9	7,0	10,3	11,6
26/01/2007	1	3,2	5,4	8,2	5,9	9,0	26/01/2007	1	3,0	6,0	8,7	8,9	9,4	26/01/2007	1	13,9	19,8	28,1	37,7	26,9
7/02/2007	1	13,5	19,4	28,2	35,3	43,2	7/02/2007	1	10,4	13,1	14,1	18,3	15,6	7/02/2007	1	3,7	6,3	7,1	9,7	14,5
19/02/2007	1	16,5	22,5	34,0	42,9	33,1	19/02/2007	1	3,6	4,5	6,9	10,5	12,6	19/02/2007	1	4,9	8,3	11,5	15,5	18,4
3/03/2007	1	2,6	4,0	5,7	7,8	10,4	3/03/2007	1	7,1	7,9	12,6	22,5	31,8	3/03/2007	1	5,4	7,2	9,1	14,3	23,4
15/03/2007	1	3,9	6,0	7,7	12,4	19,8	15/03/2007	1	6,1	9,5	13,6	23,2	33,1	15/03/2007	1	6,4	10,6	15,9	23,4	35,4
27/03/2007							27/03/2007							27/03/2007	1	11,3	21,0	42,6	70,6	85,7
8/04/2007							8/04/2007							8/04/2007						
20/04/2007	1						20/04/2007	1	83,6	142,6	137,4	188,6	179,9	20/04/2007	1	25,0	48,6	81,4	121,1	145,6
2/05/2007	1	3,6	5,7	13,6	44,8	65,6	2/05/2007							2/05/2007	1	24,2	53,8	104,8	137,8	161,7
14/05/2007	1						14/05/2007	1	5,8	24,0	43,3	81,6	80,3	14/05/2007	1	10,6	13,5	39,6	69,8	73,2
26/05/2007							26/05/2007	1	5,1	10,9	18,2	42,3	58,9	26/05/2007	1	1,5	8,5	14,4	31,3	52,6
7/06/2007	1	5,9	11,5	39,3	73,6	120,1	7/06/2007	1	66,4	149,3	231,9	260,2	258,0	7/06/2007	1	2,0	6,3	13,3	30,9	46,4
19/06/2007	1	2,1	3,8	14,6	28,5	36,3	19/06/2007	1	13,0	23,5	38,3	64,3	74,8	19/06/2007	1	0,7	2,7	7,8	13,5	25,1
1/07/2007	1	10,1	22,0	37,1	77,7	149,9	1/07/2007	1	1,8	3,8	6,2	13,9	40,3	1/07/2007	1	4,5	11,4	31,1	66,3	100,2
13/07/2007	1	19,0	35,6	60,6	103,5	138,0	13/07/2007	1	3,0	7,5	14,6	27,9	43,0	13/07/2007	1		14,2	31,3	53,8	
25/07/2007	1	7,1	20,6	58,3	84,9	105,2	25/07/2007	1	4,3	15,7	39,1	73,1	106,9	25/07/2007	1	2,5	7,5	25,0	51,4	
6/08/2007	1	2,6	10,8	26,3	46,6	62,8	6/08/2007							6/08/2007	1	2,4	9,3	21,7	41,2	55,8
18/08/2007							18/08/2007	1	0,7	2,7	8,5	21,4	35,3	18/08/2007	1	0,3	1,0	2,7	5,8	18,3
30/08/2007							30/08/2007	1	2,9	9,5	24,3	34,2	49,8	30/08/2007	1	0,5	2,7	6,5	17,3	28,3
11/09/2007							11/09/2007	1	52,9	94,3	120,2	151,5	167,8	11/09/2007	1	0,5	0,3	4,0	12,1	19,5
average		5,9	10,3	19,2	29,9	40,4		11,4	21,0	31,1	42,5	50,0		5,9	11,4	20,6	33,2	40,5		
SD		5,3	8,7	17,3	29,1	44,3		20,9	39,3	50,9	61,0	60,5		6,2	12,0	22,5	32,6	39,3		
min		0,9	1,9	2,2	2,5	4,5		0,7	1,5	2,0	2,7	4,6		0,3	0,3	2,3	2,7	3,8		
max		19,0	35,6	60,6	103,5	149,9		83,6	149,3	231,9	260,2	258,0		25,0	53,8	104,8	137,8	161,7		
mediaan		3,7	5,9	13,0	21,0	21,3		3,6	7,7	13,7	19,9	31,5		4,1	8,5	14,4	22,7	23,4		

Resultaten il-8 inductie in de A549 cellijn.

Aarschot						Borgerhout						Zelzate								
TSP (µg/ml)						TSP (µg/ml)						TSP (µg/ml)								
0	12,5	25	50	100	200	0	12,5	25	50	100	200	0	12,5	25	50	100	200			
4/09/2006	1	1,3	1,2	1,4	1,2	1,9	4/09/2006	1	0,6	0,8	0,9	1,0	1,1	4/09/2006	1	1,1	1,3	1,8	1,7	2,2
16/09/2006	1	1,0	1,0	1,0	1,2	1,3	16/09/2006	1	0,9	0,9	0,9	1,0	1,2	16/09/2006	1	1,0	0,9	1,2	1,2	1,1
28/09/2006	1		1,2	1,1	1,1	1,5	28/09/2006	1	0,9	1,0	1,0	1,1	1,2	28/09/2006	1	1,0	1,6	1,2	1,4	1,7
10/10/2006	1	0,6	0,7	1,1	0,7	0,5	10/10/2006	1	0,9	0,7	1,2	0,6	0,8	10/10/2006	1	0,4	0,8	0,7	1,0	0,5
22/10/2006	1	3,8	1,9	1,7	2,1	2,6	22/10/2006	1	0,8	0,8	1,3	0,7	5,4	22/10/2006	1	0,5	0,4	0,7	0,5	0,7
3/11/2006	1	1,4	3,2	1,1	1,3	1,7	3/11/2006	1	0,7	0,8	0,9	1,1	1,5	3/11/2006	1	1,2	0,0	1,1	1,2	1,5
15/11/2006	1	1,2	3,1	1,2	1,3	1,2	15/11/2006	1	1,1	3,2	1,1	1,1	1,1	15/11/2006	1	1,1	3,1	1,1	1,2	1,5
27/11/2006	1	1,4	1,2	1,7	1,5	2,2	27/11/2006	1	1,0	1,0	1,0	1,1	1,8	27/11/2006	1	0,9	0,9	0,8	0,9	1,5
9/12/2006	1	0,9	1,2	1,4	2,9	3,6	9/12/2006	1	1,0	1,1	1,0	1,1	1,9	9/12/2006	1	0,9	1,0	1,0	1,2	1,2
21/12/2006	1	0,5	0,7	0,8	0,9	1,1	21/12/2006	1	1,2	1,1	1,1	1,2	1,8	21/12/2006	1	1,0	0,9	0,9	1,2	1,5
2/01/2007	1	1,0	1,2	1,1	1,3	2,5	2/01/2007	1	1,5	3,9	1,3	1,5	1,7	2/01/2007	1	0,7	0,8	0,7	1,0	1,4
14/01/2007	1	0,6	0,6	0,6	0,5	0,7	14/01/2007	1	1,2	1,2	1,2	1,3	1,7	14/01/2007	1	1,2	1,3	1,2	1,5	1,6
26/01/2007	1	1,2	1,4	1,2	1,3	1,9	26/01/2007	1	1,2	1,0	1,1	1,4	1,5	26/01/2007	1	1,1	1,2	1,2	1,3	1,6
7/02/2007	1	0,5	1,7	1,2	2,2	1,1	7/02/2007	1	0,2	1,1	0,5	0,8	1,0	7/02/2007	1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
19/02/2007	1	0,2	0,4	0,9	0,3	0,2	19/02/2007	1	0,6	0,6	0,6	0,5	0,7	19/02/2007	1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1
3/03/2007	1	1,0	1,3	1,3	1,5	1,8	3/03/2007	1	0,8	1,0	1,0	1,3	1,7	3/03/2007	1	0,6	0,7	0,7	0,6	0,8
15/03/2007	1	0,9	0,9	1,0	1,3	1,2	15/03/2007	1	0,8	1,0	1,8	1,4	1,8	15/03/2007	1	0,4	0,4	0,5	0,6	0,8
27/03/2007							27/03/2007							27/03/2007	1	0,8	0,8	0,8	1,1	1,0
8/04/2007							8/04/2007							8/04/2007						
20/04/2007	1	0,8	1,0	0,9	1,1	1,5	20/04/2007	1	0,9	1,1	1,0	1,1	1,2	20/04/2007	1	0,8	1,0	0,9	0,9	1,2
2/05/2007	1	1,0	0,8	0,4	0,8	1,2	2/05/2007							2/05/2007	1	0,8	0,9	1,0	1,9	1,8
14/05/2007	1	1,1	1,1	1,0	0,8	1,2	14/05/2007	1	1,0	1,2	1,3	1,4	1,9	14/05/2007		1,1	1,0	1,0	1,3	2,1
26/05/2007	1	1,3	1,3	1,2	1,2	1,5	26/05/2007	1	0,9	1,0	0,9	1,1	1,6	26/05/2007		1,0	1,0	1,0	1,0	1,9
7/06/2007	1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,7	7/06/2007	1	0,8	0,8	1,8	1,1	0,7	7/06/2007	1	1,1	1,0	1,3	1,6	1,7
19/06/2007	1	1,2	1,2	1,2	1,4	1,8	19/06/2007	1	0,9	0,9	1,0	1,6	1,2	19/06/2007	1	0,8	0,9	0,9	1,2	1,4
1/07/2007	1	1,5		2,4	1,6	1,6	1/07/2007	1	0,9	0,9	1,0	0,9	1,2	1/07/2007	1	1,2	2,8	1,5	1,8	2,2
13/07/2007	1	1,1	4,2	3,9	2,4	2,6	13/07/2007	1	0,9	0,9	1,0	1,0	1,4	13/07/2007	1	0,9	1,0	1,0	1,1	1,5
25/07/2007	1	1,0	1,0	1,1	1,3	1,7	25/07/2007	1	1,3	1,1	1,3	2,1	2,6	25/07/2007	1	1,1	1,1	1,3	1,4	1,6
6/08/2007	1	1,0	1,1	1,1	1,3	1,4	6/08/2007							6/08/2007	1	0,9	0,9	1,0	1,2	1,3
18/08/2007							18/08/2007	1	1,3	1,2	1,3	1,4	1,7	18/08/2007	1	1,0	0,9	1,2	1,4	2,5
30/08/2007							30/08/2007	1	1,0	1,2	1,2	1,4	1,2	30/08/2007	1	0,9	0,8	0,9	1,2	1,4
11/09/2007	1	0,8	0,8	0,7	0,8	0,8	11/09/2007	1	1,4	1,7	1,1	1,0	1,3	11/09/2007	1	0,6	0,6	0,7	1,2	1,7
gemiddelde		1,1	1,3	1,2	1,3	1,5		1,0	1,2	1,1	1,2	1,6			0,8	1,0	1,0	1,1	1,4	
SD		0,6	0,8	0,6	0,6	0,7		0,3	0,7	0,3	0,3	0,9			0,3	0,6	0,3	0,4	0,6	
min		0,2	0,4	0,4	0,3	0,2		0,2	0,6	0,5	0,5	0,7			0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	
max		3,8	4,2	3,9	2,9	3,6		1,5	3,9	1,8	2,1	5,4			1,2	3,1	1,8	1,9	2,5	
mediaan		1,0	1,2	1,1	1,3	1,5		0,9	1,0	1,1	1,1	1,4			0,9	0,9	1,0	1,2	1,5	

Resultaten il-6 inductie in de Beas-2B cellijn.

Aarschot						Borgerhout						Zelzate								
TSP (µg/ml)						TSP (µg/ml)						TSP (µg/ml)								
0	12,5	25	50	100	200	0	12,5	25	50	100	200	0	12,5	25	50	100	200			
4/09/2006	1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	4/09/2006	1	1,0	1,0	1,1	1,4	1,3		
16/09/2006	1	1,0	1,0	1,0	1,1	1,6	16/09/2006	1	1,0	1,0	1,3	1,0	16/09/2006	1	1,0	1,0	1,1	1,1		
28/09/2006	1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	28/09/2006	1	1,0	1,1	1,1	1,1	28/09/2006	1	1,0	1,0	1,0	1,2	1,1	
10/10/2006	1	0,9	0,9	1,3	0,9	1,0	10/10/2006	1	0,9	1,0	1,1	1,1	10/10/2006	1	1,0	1,1	0,8	1,0	0,9	
22/10/2006	1	1,2	1,5	1,3	1,2	1,2	22/10/2006	1	3,0	1,1	1,0	1,0	1,8	22/10/2006	1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
3/11/2006	1	1,0	1,1	1,2	1,3	1,3	3/11/2006	1	1,0	1,1	1,2	1,2	1,3	3/11/2006	1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
15/11/2006	1	0,9	1,3	0,8	1,6	0,9	15/11/2006	1	1,1	0,8	0,8	0,9	0,7	15/11/2006	1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
27/11/2006	1						27/11/2006	1						27/11/2006	1	0,7	0,5	0,9	1,0	1,0
9/12/2006	1						9/12/2006	1	1,8	1,8	2,5	1,7	1,5	9/12/2006	1	0,8	0,9	0,8	0,9	1,0
21/12/2006	1						21/12/2006	1	0,7	0,9	0,7	0,9	0,5	21/12/2006	1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2/01/2007	1						2/01/2007	1	0,8	1,1	1,0	0,9	1,6	2/01/2007	1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
14/01/2007	1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	14/01/2007	1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	14/01/2007	1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
26/01/2007	1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	26/01/2007	1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	26/01/2007	1	1,6	1,5	2,3	3,6	7,5
7/02/2007	1	1,2	1,0	1,1	1,3	3,0	7/02/2007	1	0,8	1,0	1,9	1,1	1,0	7/02/2007	1	0,9	0,9	1,0	1,6	1,4
19/02/2007	1	1,5	1,4	2,3	2,8	5,0	19/02/2007	1	1,0	1,4	2,0	2,0	2,4	19/02/2007	1	1,0	1,4	1,3	1,5	2,5
3/03/2007	1	0,9	1,4	1,3	3,2	4,6	3/03/2007	1	1,3	1,3	1,5	2,0	3,0	3/03/2007	1	1,1	1,4	1,3	2,4	2,9
15/03/2007	1	1,4	1,5	1,9	3,1	4,7	15/03/2007	1	1,5	2,0	2,1	2,7	3,4	15/03/2007	1	1,7	2,0	2,2	2,3	3,6
27/03/2007							27/03/2007							27/03/2007	1	0,6	1,6	2,3	6,3	4,5
8/04/2007							8/04/2007							8/04/2007	1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
20/04/2007	1	3,7	5,8	7,1	9,9	15,3	20/04/2007	1	9,6	9,6	9,6	9,3	1,5	20/04/2007	1	2,2	2,2	2,2	2,2	1,2
2/05/2007	1	2,1	2,4	2,2	3,4	5,5	2/05/2007							2/05/2007	1	31,2	40,1	41,6	51,9	95,6
14/05/2007					0,5	2,9	14/05/2007		3,5	6,4	4,4	3,3	1,2	14/05/2007		1,7	2,0	2,7	3,1	4,8
26/05/2007		1,6	2,5	3,6	3,8	4,5	26/05/2007		2,6	4,2	4,7	6,3	10,4	26/05/2007		1,0	1,1	1,3	1,1	1,0
7/06/2007	1	1,5	2,3	3,4	2,7	3,7	7/06/2007	1	14,5	21,1	24,9	31,9	34,9	7/06/2007	1	2,0	2,7	3,4	3,5	4,2
19/06/2007	1	3,5	3,8	4,7	4,8	7,5	19/06/2007	1	2,2	2,7	2,6	3,6	4,9	19/06/2007	1	0,8	0,8	0,8	0,9	0,7
1/07/2007	1	4,0	4,0	5,9	6,1	5,3	1/07/2007	1	1,2	1,4	2,7	3,6	2,1	1/07/2007	1	1,9	2,1	3,5	6,3	12,2
13/07/2007	1	1,5	2,0	2,1	1,4	1,1	13/07/2007	1	1,3	1,4	1,7	2,0	2,1	13/07/2007	1	2,7	4,4	4,8	5,6	
25/07/2007	1	3,4	4,6	6,2	7,8	5,7	25/07/2007	1	1,9	2,2	2,2	3,0	2,6	25/07/2007	1	2,5	6,4	4,3	6,3	4,9
6/08/2007	1	2,4	2,5	2,9	3,7	3,5	6/08/2007							6/08/2007	1	1,9	2,3	2,3	2,6	3,2
18/08/2007							18/08/2007	1	6,8	16,7	28,2	47,9	42,9	18/08/2007	1	1,3	1,6	1,8	1,7	1,9
30/08/2007							30/08/2007	1	2,7	3,9	4,3	4,9	4,0	30/08/2007	1	1,7	2,5	3,0	3,2	4,0
11/09/2007		1,7	3,0	4,1	5,3	4,5	11/09/2007	1	107,8	149,6	140,3	165,2	107,0	11/09/2007	1	1,5	1,8	3,6	2,6	2,5
gemiddelde		1,7	2,1	2,5	2,9	3,6			6,4	8,8	9,1	11,2	8,8			2,2	2,8	3,1	3,8	5,6
SD		1,0	1,3	1,9	2,4	3,2			20,5	28,6	27,1	32,5	22,1			5,3	6,9	7,1	8,9	16,9
min		0,9	0,9	0,8	0,5	0,9			0,7	0,8	0,7	0,9	0,5			0,6	0,5	0,8	0,9	0,7
max		4,0	5,8	7,1	9,9	15,3			107,8	149,6	140,3	165,2	107,0			31,2	40,1	41,6	51,9	95,6
mediaan		1,4	1,5	1,9	2,2	3,3			1,3	1,4	1,9	2,0	1,6			1,0	1,2	1,3	1,5	1,3

Resultaten il-8 inductie in de Beas-2B cellijn.

Aarschot						Borgerhout						Zelzate								
TSP (µg/ml)						TSP (µg/ml)						TSP (µg/ml)								
0	12,5	25	50	100	200	0	12,5	25	50	100	200	0	12,5	25	50	100	200			
4/09/2006	1	1,2	1,3	1,4	1,4	1,5	4/09/2006	1	1,4	1,4	1,6	1,8	1,6	4/09/2006	1	1,4	2,0	2,4	3,3	1,0
16/09/2006	1	0,9	1,0	0,9	0,9	0,5	16/09/2006	1	1,1	1,1	1,1	0,7	0,5	16/09/2006	1	1,0	1,2	1,3	1,4	0,8
28/09/2006	1	1,1	1,1	1,0	1,1	1,2	28/09/2006	1	1,2	1,2	1,4	1,4	1,0	28/09/2006	1	1,2	1,3	1,4	1,2	0,5
10/10/2006	1	0,8	0,9	1,0	0,8	0,6	10/10/2006	1	1,3	1,1	1,1	1,1	0,7	10/10/2006	1	0,7	1,3	0,8	0,8	0,7
22/10/2006	1	1,2	1,6	1,2	1,2	1,6	22/10/2006	1	0,9	1,2	1,0	1,0	1,2	22/10/2006	1	1,0	1,2	1,0	1,5	1,9
3/11/2006	1	0,9	1,5	1,9	2,4	2,6	3/11/2006	1	0,9	1,1	1,3	1,0	1,1	3/11/2006	1	0,7	0,6	0,8	0,5	0,9
15/11/2006	1	0,6	0,7	0,5	0,7	0,5	15/11/2006	1	1,0	0,9	0,9	0,8	0,6	15/11/2006	1	0,9	1,1	1,0	1,1	1,1
27/11/2006	1	1,0	1,0	1,1	1,1	1,1	27/11/2006	1	0,8	1,8	1,0	1,0	0,9	27/11/2006	1	0,8	0,9	0,9	1,0	0,9
9/12/2006	1	1,0	1,2	1,1	1,0	1,0	9/12/2006	1	1,1	1,1	1,4	1,4	1,0	9/12/2006	1	0,8	0,8	0,8	0,7	1,0
21/12/2006	1	0,9	1,0	1,0	0,9	0,8	21/12/2006	1	0,9	1,0	1,0	0,9	0,9	21/12/2006	1	0,9	0,9	0,9	0,7	0,7
2/01/2007	1	0,9	0,9	0,9	0,8	1,0	2/01/2007	1	0,9	1,0	1,3	1,1	1,5	2/01/2007	1	0,9	0,9	1,2	1,1	1,2
14/01/2007	1	0,9	0,9	1,0	1,0	1,1	14/01/2007	1	1,0	1,1	1,1	1,1	1,2	14/01/2007	1	0,9	0,8	0,8	0,9	1,0
26/01/2007	1	0,9	0,9	0,9	0,8	0,8	26/01/2007	1	0,9	1,0	0,9	1,0	1,1	26/01/2007	1	1,1	1,1	1,4	1,1	0,4
7/02/2007	1	1,1	1,0	1,1	1,0	1,3	7/02/2007	1	0,9	0,9	1,1	1,2	1,2	7/02/2007	1	0,9	0,9	0,8	0,9	1,0
19/02/2007	1	0,9	1,1	1,2	1,4	1,4	19/02/2007	1	1,0	1,0	1,2	1,4	1,3	19/02/2007	1	0,8	1,0	1,1	1,2	1,2
3/03/2007	1	1,0	0,9	0,8	0,5	0,3	3/03/2007	1	0,9	1,3	0,2	1,7	1,2	3/03/2007	1	0,7	0,9	0,8	0,6	0,4
15/03/2007	1	1,0	1,1	1,2	1,5	0,7	15/03/2007	1	1,0	1,5	1,5	1,7	1,2	15/03/2007	1	1,2	1,4	1,5	1,5	1,3
27/03/2007							27/03/2007							27/03/2007	1	1,1	1,2	1,3	1,0	0,4
8/04/2007							8/04/2007							8/04/2007	1	0,9	1,0	1,3	1,3	1,3
20/04/2007	1	1,9	2,7	3,6	4,4	4,9	20/04/2007	1	1,5	2,0	2,2	3,6	2,1	20/04/2007	1	1,8	2,6	3,4	4,1	4,3
2/05/2007	1	2,0	2,8	3,2	4,2	2,1	2/05/2007							2/05/2007	1	10,5	11,4	9,8	10,2	9,8
14/05/2007	1	0,9	1,0	1,0	0,9	0,7	14/05/2007	1	1,1	1,0	1,4	1,5	0,5	14/05/2007	1	1,5	1,9	2,3	2,9	3,2
26/05/2007	1	1,0	1,0	1,1	1,2	1,3	26/05/2007	1	1,0	1,2	1,5	1,6	1,8	26/05/2007	1	0,9	1,0	1,2	1,0	1,2
7/06/2007	1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	7/06/2007	1	5,9	7,5	8,5	9,1	7,8	7/06/2007	1	1,4	1,7	2,2	2,6	2,7
19/06/2007	1	1,2	1,3	1,6	1,4	1,0	19/06/2007	1	1,5	2,0	2,1	2,4	1,6	19/06/2007	1	0,9	1,0	1,2	1,4	1,8
1/07/2007	1	2,5	3,2	4,9	6,4	6,6	1/07/2007	1	1,1	1,4	1,6	1,9	2,2	1/07/2007	1	1,5	1,7	2,6	4,2	4,9
13/07/2007	1	1,3	1,8	2,3	1,9	1,0	13/07/2007	1	1,2	1,6	1,8	2,3	2,5	13/07/2007	1	1,8	2,7	3,4	4,7	2,8
25/07/2007	1	2,5	3,7	4,9	7,4	7,7	25/07/2007	1	1,6	1,8	2,3	3,8	3,3	25/07/2007	1	1,8	2,9	2,5	4,4	4,5
6/08/2007	1	2,3	2,5	3,4	4,6	4,8	6/08/2007							6/08/2007	1	2,0	2,4	2,8	3,5	3,1
18/08/2007							18/08/2007	1	7,9	23,5	37,5	58,2	52,3	18/08/2007	1	1,3	1,7	2,0	2,3	2,4
30/08/2007							30/08/2007	1	2,4	3,2	3,9	4,9	5,1	30/08/2007	1	1,6	2,3	3,3	4,1	4,3
11/09/2007	1	1,6	1,8	3,1	5,1	4,7	11/09/2007	1	48,8	66,4	64,7	64,7	57,2	11/09/2007	1	1,3	1,6	3,2	2,8	2,9
gemiddelde		1,2	1,5	1,7	2,0	1,9			3,3	4,7	5,2	6,2	5,5			1,4	1,7	1,9	2,2	2,1
SD		0,5	0,8	1,2	1,9	1,9			9,0	12,8	13,6	15,7	14,0			1,7	1,9	1,7	2,0	1,9
min		0,6	0,7	0,5	0,5	0,3			0,8	0,9	0,2	0,7	0,5			0,7	0,6	0,8	0,5	0,4
max		2,5	3,7	4,9	7,4	7,7			48,8	66,4	64,7	64,7	57,2			10,5	11,4	9,8	10,2	9,8
mediaan		1,0	1,1	1,1	1,1	1,1			1,1	1,2	1,4	1,4	1,2			1,1	1,2	1,3	1,3	1,2