

(contract 091478)

Eindrapport

Opmaak van een concreet en praktisch toepasbaar draaiboek voor toepassing van effectgerichte metingen in het lopende en toekomstige milieu- en gezondheidsbeleid met inbegrip van validatie door toepassing op de geselecteerde hot spot Genk-Zuid van het 2de generatie Steunpunt Milieu en Gezondheid.

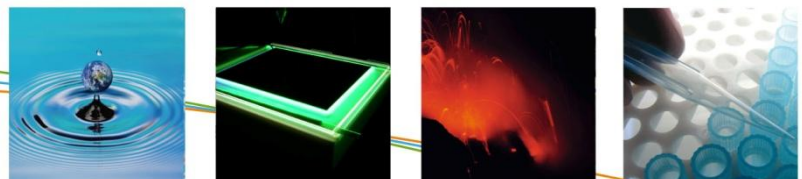
Deelrapport2: Werkpakket 2: Hotspot Genk-Zuid

(Bestek LNE/ OL200800043/9030/M&G)

Van Den Heuvel Rosette, Witters Hilda (VITO)
Nawrot Tim (UH)

Studie uitgevoerd in opdracht van: Vlaamse Overheid, Departement Leefmilieu, Natuur en Energie, Dienst Milieu & Gezondheid

September 2011



INHOUD

Inhoud	I
Lijst van tabellen	IV
Lijst van figuren	VI
Lijst van afkortingen	IX
HOOFDSTUK 1. Inleiding	1
HOOFDSTUK 2. Strategie voor de hotspot Genk-Zuid	3
2.1. <i>Situering</i>	3
2.2. <i>Kadering van de effectgerichte meetcampagne</i>	3
2.2.1. Humane biomonitoring	4
2.2.2. VMM meetprogramma 2010	7
2.3. <i>Effectgerichte meetstrategie</i>	9
2.3.1. Selectie meetplaatsen	9
2.3.2. Bemonstering van PM10	11
2.3.3. Keuze van de <i>in vitro</i> testen	14
HOOFDSTUK 3. Meetcampagne in hotspot Genk-Zuid	18
3.1. <i>Staalname</i>	18
3.1.1. Koksijde	18
3.1.2. Genk-Zuid	20
3.2. <i>Behandeling van de filters</i>	22
3.2.1. Organische extractie	24
3.2.2. Collectie van partikels voor biologische testen	24
3.2.3. Collectie van partikels voor niet-biologische test	25
3.3. <i>Blootstelling van de testsystemen</i>	25
3.3.1. Ames test	26
3.3.2. MELN assay	26
3.3.3. Cytotoxiciteit in BEAS-2B	27
3.3.4. Productie van inflammatoire cytokines	27
3.3.5. Endotoxine bepaling	27
3.3.6. Radicaalgenererend vermogen	27
3.4. <i>Statistische verwerking</i>	28
HOOFDSTUK 4. Effectgerichte metingen	29
4.1. <i>Ames test</i>	29
4.1.1. Resultaten	29
4.1.2. Trend in functie van de tijd	32
4.1.3. Trend in functie van plaats	34
4.1.4. Relatieve toxicologische potentie	35
4.2. <i>MELN assay</i>	36

4.2.1.	Resultaten	36
4.2.2.	Trend in functie van de tijd	40
4.2.3.	Trend in functie van plaats	43
4.2.4.	Relatieve toxicologische potentie	44
4.3.	<i>Cytotoxiciteit in BEAS-2B</i>	46
4.3.1.	Resultaten	46
4.3.2.	Trend in functie van de tijd	49
4.3.3.	Trend in functie van plaats	49
4.3.4.	Relatieve toxicologische potentie	52
4.4.	<i>Productie van inflammatoire cytokines</i>	53
4.4.1.	Resultaten	53
4.4.2.	Trend in functie van de tijd	56
4.4.3.	Trend in functie van plaats	60
4.4.4.	Relatieve toxicologische potentie	63
4.5.	<i>Endotoxine bepaling</i>	63
4.6.	<i>Radicaalgenererend vermogen</i>	64
4.6.1.	Resultaten	64
4.6.2.	Trend in functie van de tijd	66
4.6.3.	Trend in functie van plaats	66
4.7.	<i>Toxicologisch profiel van Genk en Koksijde</i>	67
HOOFDSTUK 5. Relatie effectgericht meten en pollutanten en meteo		69
5.1.	<i>Chemische karakteristieken van fijn stof</i>	69
5.2.	<i>Relatie van de biologische eindpunten tot pollutie</i>	78
5.2.1.	Ames tes	84
5.2.2.	MELN test	84
5.2.3.	Cytotoxiciteit	85
5.2.4.	Productie van inflammatoire cytokines	85
5.2.5.	Radicaalgenererend vermogen	86
5.3.	<i>Invloed van klimatologische omstandigheden</i>	86
5.3.1.	Temperatuur	90
5.3.2.	Neerslag	91
5.3.3.	Windsnelheid	91
5.3.4.	Windrichting	91
HOOFDSTUK 6. Relatie effectgericht meten en humane gezondheid		99
6.1.	<i>Gezondheidsenquête Genk-Zuid</i>	99
6.2.	<i>Overzicht van de effectmarkers in de HBM-studie van de hotspot Genk-Zuid</i>	100
6.3.	<i>Relatie van radicaalgenererend vermogen van PM10 tot biomerkers van recente blootstelling</i>	103
6.4.	<i>Relatie van de effectgerichte metingen tot humane biomerkers van effect</i>	104
HOOFDSTUK 7. Vergelijking met pilootproject (2006-2007)		106
7.1.	<i>Ames test</i>	106
7.2.	<i>Cytotoxiciteit in Beas-2B</i>	108

7.3.	<i>Inflammatie: il-6 en il-8 productie in Beas-2B</i>	109
7.4.	<i>MELN test</i>	111
7.5.	<i>Endotoxine</i>	111
HOOFDSTUK 8.	Besluit _____	113
HOOFDSTUK 9.	Aanbevelingen _____	117
Literatuurlijst	_____	119

LIJST VAN TABELLEN

Tabel 1: Overzicht humane biomerkers	6
Tabel 2: Meetposten 'zware metalen in fijn stof' in Genk	7
Tabel 3: Meetposten 'dioxines en PCB126 depositie' in Genk.	8
Tabel 4: Ligging van de stations in de regio Genk	8
Tabel 5: Achtergrond locaties in VMM meetnetten	11
Tabel 6:HBM: Overzicht van de onderzoeksdagen en aantal deelnemers.	13
Tabel 7: Overzicht van de testsystemen.	14
Tabel 8: Overzicht van de staalnamedagen in Koksijde. N is het aantal bemonsterde dagen per maand.	19
Tabel 9: Overzicht van de staalnamedagen in Genk-Zuid. Het bemonsterde volume wordt weergegeven voor elk van de drie Partisol samplers. N is het aantal bemonsterde dagen per maand.	20
Tabel 10: Overzicht van de staalnamedagen in Genk-Zuid in functie van de HBM-studie. Het bemonsterde volume wordt weergegeven voor elk van de drie Partisol samplers.	22
Tabel 11: PM10 massa (mg) van de gepoolde stalen per maand.	25
Tabel 12: Overzicht van het aantal revertanten (gemiddelde±SD) voor de maandstalen van Koksijde.	30
Tabel 13: Overzicht van het aantal revertanten (gemiddelde±SD) voor de maandstalen van Genk.	31
Tabel 14: Verschillen in mutageniciteit tussen de maandstalen, Significante p-waarden (Factorial ANOVA, Tukey posthoc) zijn in bold weergegeven.	34
Tabel 15: Meetresultaten (gemiddelde en standaard deviatie, n= 3) voor alle stalen van Genk en Koksijde, verdeeld over 2 experimenten, in een opzet met prescreen. Het signaal van de concentratie responscurve , uitgedrukt als % van de SC (= 100%) wordt gegeven voor elk van de verdunningen van het PM10 extract.	38
Tabel 16: Meetresultaten (gemiddelde en standaard deviatie, n= 3) voor alle stalen van Genk en Koksijde, in een herhaalexperiment in een opzet als agonist assay. Het signaal van de concentratie responscurve , uitgedrukt als % van de SC (= 100%) wordt gegeven voor elk van de verdunningen van het PM10 extract.	39
Tabel 17: Verschillen in oestrogene potentie tussen de maandstalen. Significante p-waarden (Factorial ANOVA, Tukey posthoc) zijn in bold weergegeven.	43
Tabel 18: Cytotoxiciteit van PM fractie van beladen filters verzameld in Genk en Koksijde.	47
Tabel 19: Verschillen in cytotoxiciteit tussen de maandstalen, Significante p-waarden (Factorial ANOVA, Tukey post hoc) zijn in bold weergegeven.	49
Tabel 20: Productie van interleukine-6 in functie van PM10 concentratie.	53
Tabel 21: Productie van interleukine-8 in functie van PM concentratie	55
Tabel 22: Verschillen in il-6 inductie tussen de maandstalen (Factorial ANOVA; significante p-waarden (Factorial ANOVA) zijn in bold weergegeven).	58
Tabel 23: Verschillen in il-8 inductie tussen de maandstalen. Significante p-waarden (Factorial ANOVA) zijn in bold weergegeven.	59
Tabel 24: Endotoxine in de partikel fractie.	63
Tabel 25: Radicaalgenererend vermogen van de fijn stof luchtstalen van Genk en Koksijde (/m ³ bemonsterde lucht): ruwe data en na correctie voor filtergrootte.	65
Tabel 26: Associatie tussen radicaalgenererend vermogen (ESR) van PM10 en il-6 en il-8 inductie in Beas-2B. (Spearman's rank correlatiecoëfficiënt, p-waarde en aantal gegevens (n))	66
Tabel 27: Relatieve toxische eenheid (RTE) van de bemonsterd lucht uit Genk en Koksijde.	68
Tabel 28: Overzicht van de karakteristieken van de omgevingslucht en de lokale meetposten.	69
Tabel 29: Associatie tussen de biologische effectparameter en de fysico-chemische karakteristieken van PM10 (Spearman's rank correlatie coefficient, p-waarden en aantal gegevens(n))	83

Tabel 30: Meteo gegevens voor Houtem en Kleine-Brogel voor de periode 1/7/2010-31/7/2010.	87
Tabel 31: Associatie tussen de biologische effectparameter en de meteorologische condities (Spearman's rank correlatie coëfficiënt, p-waarden, aantal gegevens (n))	93
Tabel 32: Windrichting in Vlaanderen tijdens opeenvolgende kalenderjaren (2003-2008).	94
Tabel 33: Resultaten van de gezondheidsenquête Genk-Zuid	99
Tabel 34: Resultaten van de humane biomerkers voor astma&allergie in de hotspot Genk-Zuid: vergelijking met de Vlaamse referentiepopulatie	101
Tabel 35: Resultaten van de humane biomerkers voor hormoonwaarden en puberteitsontwikkeling in de hotspot Genk-Zuid: vergelijking met de Vlaamse referentiepopulatie.	102
Tabel 36: Partiële correlatie coëfficiënten tussen radicaal biomerkers van oxidatieve DNA-schade en radicaal generendevermogen van PM ₁₀	104
Tabel 37: Concentratie range van metalen in de pilootstudie en de hotspot Genk studie.	111

LIJST VAN FIGUREN

Figuur 1: Afbakening van het onderzoeksgebied in Genk-Zuid	4
Figuur 2: Overzicht van de VMM meetposten in Genk.	9
Figuur 3: Verdeling van de filters bemonsterd in Koksijde in functie van de verschillende extracties.	23
Figuur 4: Verdeling van de filters bemonsterd in Genk in functie van de verschillende extracties.	23
Figuur 5: Concentratierreeks B(a)P in Ames test.	32
Figuur 6: Directe (-S9) en indirecte (+S9) mutageniciteit van de luchtstalen afkomstig van Koksijde en Genk in functie van de staalnamemaand (gemiddelde \pm 95%CL).	33
Figuur 7: Vergelijking van de directe (A) en indirecte (B) mutageniciteit van de luchtstalen afkomstig van Koksijde en Genk in functie van de maand van staalname. (gemiddelde \pm 95%CL; **: p<0.01).	35
Figuur 8: Directe en indirecte mutagene potentie van de gepoolde stalen uitgedrukt als μ g B(a)P equivalenten.	36
Figuur 9: Berekende mutagene potentie (B(a)P equivalenten) van de gepoolde maandstalen voor de locatie Koksijde en Genk (Gemiddelde en SD ; **:p<0.01).	36
Figuur 10: Voorbeeld van een testresultaat in de prescreen test, voor respectievelijk Koksijde en Genk, voor het extract van de maand maart. De respons curven zijn gemiddelde waarden \pm SD (n=3)	37
Figuur 11: Concentratierreeks 17 β -oestradiol in MELN-assay (gemiddelde \pm SD).	40
Figuur 12: Concentratie-respons in de MELN assay van de luchtstalen afkomstig van Koksijde en Genk in functie van de staalnamemaand (gemiddelde \pm 95%CL). (1) prescreen experiment (2) agonist experiment	42
Figuur 13: Vergelijking van Luciferase activiteit van de luchtstalen afkomstig van Koksijde en Genk in functie van de maand van staalname. (gemiddelde 95%CL, *:p<0.05, **:p<001) A: prescreen experiment, B: herhaalexperiment in agonist set-up.	44
Figuur 14: Berekende oestrogene potentie voor agonistische activiteit in de prescreen assay en agonist assay, voor gepoolde extracten per maand op locatie Genk en Koksijde (gemiddelde en SD (n=2); \$: geen staal ter beschikking).	46
Figuur 15: Gemiddelde berekende oestrogene potentie (\pm SD) van de lucht stalen uit Genk en Koksijde (*: Gepaarde t-test, p<0.05).	46
Figuur 16: Concentratierreeks CdCl ₂ in cytotox test (gemiddelde \pm SD).	48
Figuur 17: Cytotoxiciteit van PM10 afkomstig van Koksijde (A) en Genk (B) in functie van de maand van staalname (gemiddelde \pm 95%CL).	49
Figuur 18: Vergelijking van de cytotoxiciteit van PM10 afkomstig van Koksijde en Genk in functie van de maand van staalname. (gemiddelde \pm 95%CL; **: p<0.01).	51
Figuur 19: Berekend cytotoxisch karakter (μ g CdCl ₂ equivalenten) van PM10 verzameld in Koksijde en Genk (#: <LOD).	52
Figuur 20: Gemiddelde cytotoxische potentie (μ g CdCl ₂ equivalenten) van PM10 verzameld in Koksijde en Genk.	52
Figuur 21: Concentratierreeks LPS en il-6 productie door Beas-2B cellen. (gemiddelde \pm SD)	54
Figuur 22: Concentratierreeks LPS en il-8 productie door Beas-2B cellen. (gemiddelde \pm SD)	56
Figuur 23: Il-6 productie na blootstelling van Beas-2B aan PM10 afkomstig van Koksijde (A) en Genk (B) in functie van de maand van staalname (gemiddelde \pm 95%CL).	57
Figuur 24: Il-8 productie na blootstelling van Beas-2B aan PM10 afkomstig van Koksijde (A) en Genk (B) in functie van de maand van staalname (gemiddelde \pm 95%CL).	59
Figuur 25: Vergelijking van il-6 productie tussen Koksijde en Genk in functie van de maand van staalname. (gemiddelde \pm 95%CL; **: p<0.01).	61

Figuur 26: Vergelijking van il-8 productie tussen Koksijde en Genk in functie van de maand van staalname. (gemiddelde \pm 95%CL; **: $p < 0.01$).	62
Figuur 27: Berekende inflammatoire potentie (ng LPS equivalenten) van PM10 verzameld in Koksijde en Genk.	63
Figuur 28: Il-6 en il-8 productie door Beas-2B cellen in functie van de endotoxine concentratie.	64
Figuur 29: Radicaalgenererend vermogen (ESR) in relatie tot il-6 en il-8 productie in Beas-2B (Spearman correlatie).	66
Figuur 30: Boxplot met radicaalgenererend vermogen (per m^3 bemonsterde lucht) van de luchtstalen van Genk en Koksijde (mediaan, minimum en maximum, 1 ^e en 3 ^{de} kwartiel)	67
Figuur 31: Grafische voorstelling van het toxicologisch profiel van Genk en Koksijde. (* significante verschillen tussen Genk en Koksijde)	68
Figuur 32: Ligging van de meetposten in Vlaanderen.	70
Figuur 33: Concentratie van PM10, PM2.5 en zwarte rook tijdens de meetcampagne (geometrisch gemiddelde \pm P25/P75).	71
Figuur 34: Jaarverloop van PM10. (— grenswaarde $50 \mu g/m^3/dag$)	72
Figuur 35: Jaarverloop van PM2.5.	72
Figuur 36: Jaarverloop van zwarte rook.	73
Figuur 37: Concentratie van metalen in PM10 tijdens de meetcampagne (geometrisch gemiddelde \pm P25/P75).	73
Figuur 38: Jaarverloop van lood (Pb) in PM10 voor Genk en Koksijde.	74
Figuur 39: Jaarverloop van zink (Zn) in PM10 voor Genk en Koksijde.	74
Figuur 40: Jaarverloop van koper (Cu) in PM10 voor Genk en Koksijde.	75
Figuur 41: Jaarverloop van nikkel (Ni) in PM10 voor Genk en Koksijde.	75
Figuur 42: Jaarverloop van arseen (As) in PM10 voor Genk en Koksijde.	76
Figuur 43: Jaarverloop van mangaan (Mn) in PM10 voor Genk en Koksijde.	76
Figuur 44: Jaarverloop van cadmium (Cd) in PM10 voor Genk en Koksijde.	77
Figuur 45: Jaarverloop van chroom (Cr) in PM10 voor Genk en Koksijde.	77
Figuur 46: Jaarverloop van PAKs (som van alle PAKs, som van niet-carcinogene PAKs, som van carcinogene PAKs) in TSP voor de meetpost Houtem.	78
Figuur 47: Maandgemiddelden van de depositieconcentraties van dioxines, PCB126 en de som van dioxines en DL-PCBs tijdens de meetcampagne.	78
Figuur 48: Maandverloop van de fysische en chemische metingen voor de meetposten regio Genk en Koksijde. (geometrische gemiddelde \pm 95%CL)	81
Figuur 49: Radicaalgenererend vermogen dagelijkse luchtstalen in relatie tot concentraties nikkel en chroom in de omgevingslucht ($r =$ Spearman correlatie)	86
Figuur 50: Jaarverloop van de omgevingstemperatuur in Houtem en Kleine-Brogel.	87
Figuur 51: Jaarverloop van de windsterkte in Houtem en Kleine-Brogel.	88
Figuur 52: Jaarverloop van de neerslag in Houtem en Kleine-Brogel.	88
Figuur 53: Maandverloop van de meteorologische metingen van Kleine-Brogel en Houtem.	89
Figuur 54: Radicaalgenererend vermogen dagelijkse luchtstalen in relatie tot temperatuur ($r^2 = 0.28$ R-square van regressiemodel met temperatuur en kwadratische term)	91
Figuur 55: Windrozen in meetstations Luchtbal en Houtem tijdens de volledige campagneperiode februari 2010-juli 2010.	94
Figuur 56: Windrozen in meetstations Luchtbal en Houtem tijdens het kalenderjaar 2009.	94
Figuur 57: Windrozen in meetstations Luchtbal en Houtem tijdens de maanden van de meetcampagne zowel voor de volledige maand (alle dagen van de maand) en de dagen van de meetcampagne.	98
Figuur 58: Resultaten van de humane biomerkers voor recente ziekten in de hotspot Genk-Zuid: vergelijking met de Vlaamse referentiepopulatie	103
Figuur 59: Resultaten van de humane biomerkers voor oxidatieve komeetttest in de hotspot Genk in functie van tertielen van het radicaal genererend vermogen van fijn stof (PM ₁₀).	103

Figuur 60: Directe (-S9) en indirecte (+S9) mutageniciteit van de luchtstalen (revertanten/plaat) afkomstig van Genk (n=6), Koksijde (n=5), Aarschot (n=13), Borgerhout (n=12) en Zelzate (n=14).(gemiddelde \pm 95% CL)	107
Figuur 61: Directe (-S9) en indirecte (+S9) mutageniciteit van de luchtstalen (IF bij 20 m ³ luchtequivalent) afkomstig van Genk (n=6), Koksijde (n=5), Aarschot (n=6), Borgerhout (n=6) en Zelzate (n=6).	108
Figuur 62: Cytotoxiciteit van de partikels afkomstig van Genk (n=6), Koksijde (n=5), Aarschot (n=12), Borgerhout (n=12) en Zelzate (n=15).(gemiddelde \pm 95% CL)	109
Figuur 63: Interleukine-6 inductie van de partikels afkomstig van Genk (n=6), Koksijde (n=5), Aarschot (n=12), Borgerhout (n=12) en Zelzate (n=15).(geometrisch gemiddelde \pm 95% CL)	110
Figuur 64: Interleukine-8 inductie van de partikels afkomstig van Genk (n=6), Koksijde (n=5), Aarschot (n=13), Borgerhout (n=12) en Zelzate (n=15).(geometrisch gemiddelde \pm 95% CL)	110
Figuur 65: Endotoxine bepaling van de partikels afkomstig van Genk (n=6), Koksijde (n=5), Aarschot (n=13), Borgerhout (n=12) en Zelzate (n=15).(geometrisch gemiddelde \pm 95%CL)	112

LIJST VAN 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)
2-AA: 2-amonoanthraceen
4-NQO: 4-nitroquinoline-N-oxide
8-OH-DG: 8-hydroxy-deguanosine
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
BEAS2B: humane bronchiale epitheel cellijn
BTEX: benzene, toluene, ethylbenzeen, m+p-xyleen, o-xyleen
Ca: calcium
Cd: cadmium
Cl⁻: chloor ion
CL: confidentie limiet, betrouwbaarheidsinterval
cm: centimeter
c-PAKs: carcinogene-aromatische koolwaterstoffen
Cr: chroom
Cu: koper
d.w.z.: dit wil zeggen
Dagequivalent: hoeveelheid ingeademde lucht over 24 uur
DDT: dichloor-diphenyl-trichloorethaan, een organisch chemisch insecticide
DL: detectielimiet
DMSO: dimethylsulfoxide
E2: 17β-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
HBCD: Hexabroomcyclododecaan
HBM: humane biomonitoring
HCB: hexachlorobenzeen
Hg: kwik
HIS: histidine
i.f.v: in functie van
IARC: International Agency for research on Cancer
IF: inductiefactor

- Il-6: interleukine 6
Il-8: interleukine 8
l/min: liter per minuut
LAL: Limulus Amebocyte Lysate
LDH: Lactaat dehydrogenase
LPS: lipopolysaccharide
M&G: milieu en gezondheid
m.b.t.: met betrekking tot
m³/h: m³ per uur
MCF-7: humane borstkanker cellen
MeHg: methyl-kwik
MELN: getransformeerde humane borstkankercellijn
Mg: magnesium
MG: minimal glucose
ml: milliliter
Mn: mangaan
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-PAKs: Dit zijn genitreeerde varianten van de PAKs. Tot op heden de krachtigste kankerverwekkende stoffen in dierproeven. Ook deze zijn voornamelijk bijproducten van verbranding.
NO: noordoosten
NO: stikstofdioxide
NO₂: stikstofdioxide
NR: neutraal rood
NW: noord-west
o.a: onderandere
O₃: ozon
OC: organische koolstof
p,p-DDE: dichlorodiphenyl-dichloroethyleen, metaboliet van DDT
P₇₅: 25^{ste} percentiel, een getal zodanig dat 25% van de data kleiner is of eraan gelijk en 75% groter of eraan gelijk
P₇₅: 75^{ste} percentiel, een getal zodanig dat 75% van de data kleiner is of eraan gelijk en 25% groter of eraan gelijk
PAKs: 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
PBDEs: polygebromeerde diphenylesters
PCBs: polychloorbiphenylen
PDMS: Polydimethylsiloxaan

PM 10: alle deeltjes met een *a.d.* 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
pNA: p-nitro-aniline
POPs: persistente organochloor polluenten
PTFE: teflon
Rev/ m^3 : revertanten per m^3 lucht
S9: homogenaat van rattelever dat metaboliserende leverenzymen bevat
Sb: Antimoon, ook antimonium of stibium
SC: solvent controle
SD: Standaard afwijking
Se: selenium
Si: silicium
SI: stimulatie index
SO₂: zwaveldioxide
t.o.v: ten opzichte van
TA98: bacteriële stam
TBBPA: Tetrabroombisfenol A
TEF: Toxic Equivalency Factor, Toxische EquivalentieFactor of de relatieve carcinogene potentie van de
de
THP-1: humane monocyt cellijn
Ti: titanium
Tl: thallium
TNF- α : Tumor necrosis factor α
TRA: toxisch relevant arseen
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
UH: Universiteit Hasselt
UV: ultraviolet
v.b.: bijvoorbeeld
v/v: volume/volume
VOS: Vluchtige Organische Stoffen
W: westen
Z: zuiden
Zn: zink
ZW: zuidwesten

HOOFDSTUK 1. INLEIDING

In verschillende beleidsdocumenten wordt het belang van onderzoek naar gezondheidseffecten van milieufactoren aangegeven. Fysische en chemische metingen volstaan niet als basis voor de inschatting van gezondheidseffecten, omdat:

- de grote meerderheid van de gezondheidsschadende stoffen is niet geïdentificeerd,
- er bestaat grote onzekerheid betreffende de gezondheidsschadende potentie van individuele stoffen, en mengsels daarvan,
- het aantal gemeten polluenten is beperkt,
- complexe mengsels van scheikundige stoffen, zoals die in het leefmilieu voorkomen, kunnen belangrijke synergistische effecten vertonen m.b.t. gezondheidsschade.

Het betreffende advies van de Vlaamse gezondheidsraad (VGR, 2005, Advies inzake Biomonitoring) stelt dan ook dat er nood is aan biomonitoring op de mens en biomonitoring op milieustalen aan de hand van eenvoudige biologische testsystemen representatief voor specifieke werkingsmechanismen van stoffen. Het voordeel ervan is dat ook gezondheidsbedreigende activiteit verbonden aan niet-geïdentificeerde of niet-als-gevaarlijk-erkende stoffen kan opgespoord worden, en dat deze testen gezondheidseffecten van milieufactoren op een geïntegreerde wijze kunnen inschatten, met inbegrip van de belangrijke synergistische effecten die kunnen optreden bij blootstelling aan de complexe mengsels van scheikundige stoffen, zoals die in het leefmilieu kunnen voorkomen.

Effectgerichte metingen vormen de tussenschakel tussen fysicochemische metingen enerzijds en humane biomonitoringstudies anderzijds en kunnen bijgevolg toegepast worden voor de monitoring van de luchtkwaliteit. 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. Zo kunnen effectgerichte biologische testen bijdragen tot het inschatten van het potentiële gevaar en gezondheidsrisico's als gevolg van de luchtkwaliteit in probleemgebieden of bij acute situaties. Op deze manier kunnen ze een meerwaarde bieden voor een betere inschatting van gezondheidsrisico's. Het gezondheidskundig interpreteren van de resultaten van de effectgerichte metingen is echter nog niet eenduidig vastgelegd.

In de studie "Uitwerken en uitvoeren van een pilootproject voor effectgerichte metingen om de luchtkwaliteit in Vlaanderen te kunnen evalueren" (OL200500031) werd een effectgerichte meetcampagne gedurende 1 jaar uitgevoerd, waarbij het effect van de locatie, tijdstrends, chemische samenstelling en klimatologische omstandigheden werd onderzocht op drie meetplaatsen met verschillende aard van vervuiling (Van Den Heuvel *et al.*, 2008). Het onderzoek toonde aan dat de gebruikte biologische testen een toxicologisch beeld van de verzamelde partikels en geassocieerde polluenten gaven. Het mutageen, inflammatoir en hormoonverstrend karakter van de luchtstalen varieerde in functie van tijd, plaats, seizoen en klimatologische omstandigheden. De toxicologische effecten konden slechts in beperkte mate verklaard worden door de aanwezigheid van afzonderlijk gemeten chemische componenten (o.a. PAKs, metalen). Ook andere studies rapporteren dat de gemeten *in vitro* effecten niet eenduidig kunnen verklaard worden door de gemeten chemische samenstelling (Brits *et al.*, 2004; Claxton *et al.*, 2004).

Een van de initiële verwachtingen van het bovenvermelde project, namelijk om een betere inschatting te kunnen uitvoeren van de gezondheidsrisico's geassocieerd met lokale luchtkwaliteit, kon niet worden ingevuld. De relatie met het absolute gezondheidsrisico voor de mens was

moeilijk te leggen omdat er op dat moment geen dataset van gezondheidseffecten beschikbaar was om met de effectgerichte metingen te kunnen relateren.

De *in vitro* biologische testen geven een goed beeld over de potentiële toxiciteit van de aanwezige pollutanten d.w.z. een gevaarsidentificatie, maar vooraleer we het risico op gezondheidsschade in absolute termen kunnen afleiden moet er een relatie met gezondheidseffecten v.b. gemeten via biomonitoring ook kwantitatief onderbouwd worden.

In dit project wordt getracht een aantal van de kennishiaten verder in te vullen. Het gelijktijdig uitvoeren van effectgerichte metingen en humane biomonitoring van de plaatselijke bevolking in de geselecteerde hot spot Genk-Zuid van het tweede generatie Steunpunt Milieu en Gezondheid en het gelijktijdig gebruik maken van beschikbare fysicochemische metingen, laat toe een betere relatie te leggen en inschatting te maken van de mogelijke gezondheidsrisico's van de luchtkwaliteit.

Huidige studie legt de nadruk op het gezondheidkundig interpreteren van de resultaten van effectgerichte metingen en het uitvoeren van relevante biologische testen.

HOOFDSTUK 2. STRATEGIE VOOR DE HOTSPOT GENK-ZUID

2.1. SITUERING

Het industriegebied Genk-Zuid, één van de grootste in Limburg, kent een veelheid aan industriële activiteiten. Het industrieterrein is omgeven door woongebieden. Een recente gezondheidsenquête toont aan dat er bij buurtbewoners een verhoogde ongerustheid bestaat over de gezondheid in relatie tot de industriële activiteiten. Volgens metingen van de Vlaamse Milieumaatschappij (VMM) in de omgevingslucht (PM10 fractie van zwevend stof) liggen vooral de waarden van nikkel, chroom en mangaan hier hoger dan in de andere Vlaamse meetpunten. Het humane biomonitoring (HBM)-onderzoek van het Steunpunt Milieu en Gezondheid wil bepalen wat de gevolgen zijn van deze verhoogde concentraties en andere vormen van milieuvuiling voor mensen die wonen nabij deze industriezone.

Het industrieterrein wordt volledig omsloten door bewoning. Vooral in het noordelijk en oostelijk deel bevindt de bewoning zich zeer dicht (enkele honderden meters) bij de industrie. De laatste jaren heeft de gezondheidsimpact door dit industriegebied heel wat maatschappelijke aandacht gekregen. Een gevolg hiervan was de grootschalige milieu-gezondheidsenquête die in 2007 gevoerd werd (in totaal 7900 mensen bevroegd, 3600 antwoorden), in de omgeving van het industriegebied en in de rest van de omliggende gemeenten) (Nelen *et al.*, 2007). De bedoeling van deze enquête was uiteraard niet oorzakelijke verbanden te vinden tussen milieukwaliteit en gezondheid van de omwonenden, maar wel om de gezondheid, milieuhinder en perceptie van de mensen in de omgeving van het industriegebied in kaart te brengen, zodat er bij toekomstige beleidsbeslissingen optimaal rekening kan gehouden worden met bijvoorbeeld gevoelige groepen. Uit de enquête zijn een aantal zaken naar voor gekomen die wijzen in de richting van verschillen in gezondheidsparameters tussen de personen die wonen in de omgeving van het industriegebied en die wonen in de referentiegebieden (o.a. luchtwegproblemen, gebruik van slaap- en kalmeermiddelen, ...). Verder blijkt uit de enquête dat het binnenmilieu in de woning van deze mensen niet optimaal is (meer schimmel en kakkerlakken). Er zijn duidelijke verschillen vastgesteld in ervaren milieuhinder. Bovendien zijn er uit de gezondheidsenquête verschillen in gezondheid tussen omwonenden van het industriegebied en inwoners van verder gelegen delen van de gemeenten gebleken (Nelen *et al.*, 2007).

2.2. KADERING VAN DE EFFECTGERICHTE MEETCAMPAGNE

In een eerste fase werd een concreet en optimaal geïntegreerde meetstrategie uitgewerkt op basis van het in werkpakket 1 opgestelde draaiboek. Bij de selectie van meetplaatsen, de frequentie en wijze van bemonstering en de keuze van de testen werd rekening gehouden met de vastgestelde milieuvuiling en de mogelijke gezondheidsimpact daarvan, de praktische en financiële haalbaarheid. Hierbij werd optimaal gebruik gemaakt van de kennis die werd opgebouwd in de studie “Uitwerken en uitvoeren van een pilootproject voor effectgerichte metingen om de luchtkwaliteit in Vlaanderen te kunnen evalueren” (OL200500031).

De meetstrategie werd eveneens afgestemd met de lopende en/of geplande fysicochemische metingen (VMM, OVAM) en de humane biomonitoring in de hotspot Genk-Zuid (Steunpunt Milieu en Gezondheid).

Deze werkwijze laat toe om optimaal gebruik te maken van de beschikbare humane biomerkerresultaten en de fysicochemische data voor de interpretatie van de effectgerichte metingen.

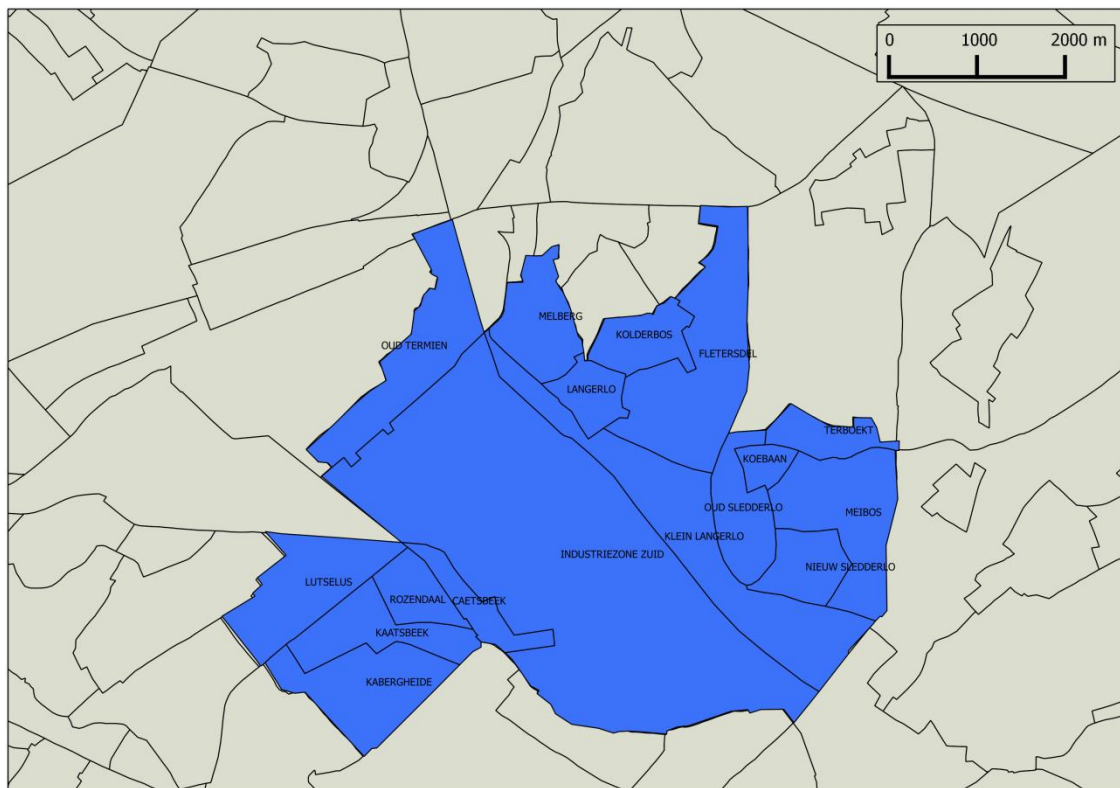
2.2.1. HUMANE BIOMONITORING

→ Afbakening van het onderzoeksgebied

Het doel van de humane biomonitoring (HBM) studie is om de interne blootstelling te meten bij bewoners van het gebied Genk-Zuid waarvan men een verhoogde externe blootstelling verwacht op basis van de milieumetingen.

Voor de afbakening van het gebied werd er vertrokken vanuit het onderzoeksgebied uit de gezondheidsenquête. De precieze afbakening gebeurde op basis van de beschikbare milieumetingen en kennis van verspreiding van polluenten. Het geselecteerde gebied wordt weergegeven in Figuur 1 .

Verder werd er een ellipsvormige uitbreiding voorzien in de overheersende windrichting.



Figuur 1: Afbakening van het onderzoeksgebied in Genk-Zuid

→ **Doelgroep en rekrutering**

Als doelgroep werden adolescenten geselecteerd omdat er voor deze leeftijdsgroep de meeste Vlaamse referentiewaarden voor biomerkers beschikbaar zijn. In het geselecteerde onderzoeksgebied wonen ongeveer 400 jongeren in de leeftijdsklasse 14-15 jaar.

→ **Keuze van biomerkers**

Op basis van de inventarisatie van de industrie en op basis van beschikbare milieumeetgegevens werd een aantal polluenten geselecteerd.

De humane biomerkers van blootstelling werden geselecteerd op basis van literatuurstudie en van de beschikbare metingen in de referentiepopulatie adolescenten van het Steunpunt.

De nadruk lag op de meting van zware metalen, PCBs, dioxines, POPs, vlamvertragers, benzeen en PAKs metaboliëten in de jongeren (Tabel 1). Hiervoor werd een panel van biomerkers voorgesteld dat zowel recente, middellange als levenslange blootstelling meet.

De voorgestelde polluenten hebben mogelijk carcinogene, immune, endocriene, renale en neurologische effecten. Voor deze gezondheidseffecten werden dezelfde biomerkers van effect gemeten als in de referentiepopulatie. Bijkomend werden 2 nierparameters gemeten (Tabel 1). Hiervoor kunnen klinisch referentiewaarden als controlewaarden gebruikt worden.

De resultaten van deze biomerkenanalyses zullen vergeleken worden met de referentiewaarden uit de Vlaamse referentiebiomonitoring (2008-2009). In deze studie werden referentiewaarden bepaald voor biomerkers van blootstelling en biomerkers van effect in de algemene bevolking van Vlaanderen.

Deze referentiewaarden hebben tot doel om:

- tijdstrends in blootstelling op te volgen binnen Vlaanderen: de huidige referentiewaarden worden vergeleken met waarden uit vroegere biomonitoringcampagnes in Vlaanderen, namelijk met de biomonitoring in de pilootstudie Milieu & Gezondheid (1999) en in het 1^e Steunpunt Milieu en Gezondheid (2001-2006);
- blootstelling in Vlaanderen te vergelijken met andere landen;
- te dienen als controlewaarde voor later uit te voeren 'case studies'. Dit zijn studies die worden uitgevoerd in regio's of bevolkingsgroepen met een specifieke milieubelasting of met milieu-gerelateerde gezondheidsproblemen. De referentiewaarden kunnen dienen als controlewaarde voor de case studies.

Tabel 1: Overzicht humane biomerkers

Polluent	Biomerker	Betekenis	Controlegroep
Zware metalen	Pb, Cd, Mn in volbloed	Middellange termijn blootstelling (maanden)	Vlaamse referentiepopulatie
	As, TRA in urine	Korte termijn blootstelling (dagen)	Vlaamse referentiepopulatie
	Hg en MeHg in haar	Middellange termijn blootstelling (maanden)	Vlaamse referentiepopulatie
	Cr, Ni, Sb, Cu, Tl in urine	Korte termijn blootstelling (dagen)	Biobankstalen
	Cd in urine	levenslange blootstelling	Biobankstalen
	Cr in rode bloedcellen	Middellange termijn blootstelling (maanden)	enkel vergelijking met literatuur, mogelijk metingen in toekomst
PCBs	merker PCBs in serum(PCB138, PCB153, PCB180) PCB99, PCB118, PCB187 in serum	Cumulatieve blootstelling	Vlaamse referentiepopulatie
Dioxines	Calux assay	Biologische activiteit van dioxine-achtige stoffen in serum	Vlaamse referentiepopulatie
POPs	p,p-DDE, HCB in serum	Cumulatieve blootstelling	Vlaamse referentiepopulatie
Vlamvertragers	PBDEs, HBCD, TBBPA in serum	Cumulatieve blootstelling	Vlaamse referentiepopulatie
Benzeen	t,t'-muconzuur in urine	Korte termijn blootstelling (dagen)	Vlaamse referentiepopulatie
PAKs	1-hydroxypyreen in urine	Korte termijn blootstelling (dagen)	Vlaamse referentiepopulatie
Gezondheidseffect	Biomerker	Betekenis	Controlegroep
Carcinogene effecten	Komeetttest	DNA-schade	Vlaamse referentiepopulatie
Immunologische effecten	Vragenlijst astma en allergie	Astma/allergie	Vlaamse referentiepopulatie
Hormoonverstoring	Puberteitsstadia, schildklierhormonen, sex hormonen	Puberteitsontwikkeling	Vlaamse referentiepopulatie
Neurotoxische effecten	NES test, ADHD vragenlijst	Neuromotorische en neuropsychische ontwikkeling	Vlaamse referentiepopulatie
Renale effecten	Beta2-microglobuline in urine en cystatine-C in serum	Tubulaire en glomerulaire nierfunctie	Klinische referentiewaarden

2.2.2. VMM MEETPROGRAMMA 2010

Via zijn diverse meetnetten voert Vlaamse Milieumaatschappij (VMM) voortdurend automatische en semiautomatische metingen uit in Vlaanderen. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van verschillende meetnetten. Elk meetnet heeft meetstations verspreid over Vlaanderen die zich op specifieke vervuilers richten: telemetrisch meetnet (fijn stof en luchtgassen), meetnet zware metalen, meetnet dioxines,.... Daarnaast zet VMM specifieke meetprogramma's op in probleemgebieden. De meetstations bevinden zich in gebieden met lokale, potentiële of acute luchtverontreiniging. Genk behoort tot deze groep van probleemgebieden.

Het VMM meetprogramma voor 2010 in Genk omvat metingen die uitgevoerd werden in de verschillende vaste meetnetten (meetnet zware metalen, meetnet dioxines en PCB126). In het kader van het meetnet specifieke studies werden in Genk extra meetstations opgericht. (VMM, Jaarverslag luchtkwaliteit in het Vlaamse gewest-2009, 2010)

De ligging van de VMM meetposten worden weergegeven in Tabel 4, Figuur 2 en Figuur 32.

Telemetrisch meetnet

Meetpost 42N045 : PM10, PM2.5

Telemetrisch meetnet specifieke studies

Meetpost 40GK09: PM10 (fijn stof), SO₂ (zwaveldioxide), NO₂ (stikstofoxide), NO

Meetpost 40GK06: PM10 (fijn stof)

Meetpost 40GK11: start kwikmetingen 18/08/2009

VOS

In februari 2009 werden metingen van benzeen, toluen, ethylbenzeen, m+p-Xyleen, o-Xyleen (BTEX) opgestart. Een BTEX monitor werd geïnstalleerd op het meetstation 40GK09.

Zware metalen in zwevend stof

Zn, Mn, Cr, Pb, Ni, Cd, As, Cu in zwevend stof (PM10) worden gemeten in het VMM meetprogramma 'zware metalen in fijn stof'. Een overzicht van de meetposten, en de looptijd van de metingen worden weergegeven in Tabel 2.

In het voorjaar 2010 werd de meetlocatie Oosterring (00GK04) verplaatst naar de locatie E. Fabrylaan (00GK11).

Tabel 2: Meetposten 'zware metalen in fijn stof' in Genk

Code-locatie	Start	Einde
Vast meetprogramma		
00GK04 (Oosterring)	22-03-2006	1-06-2010
00GK02 (Krelstraat 15)	29-01-2003	Lopende
00GK03 (Henry Fordlaan)	18-02-2006	Lopende
00GK05 (De Koor)	28-03-2006	Lopende
00GK11 (E. Fabrylaan 6, speelplaats)	01-09-2009	Lopende

'De Sleutel')		
Meetcampagnes		
00GK12 (Koebaan 8)	01-09-2009 17-6-2010	7-12-2009 21-9-2010
00GK13 (Wintergroenstraat)	01-09-2009 17-6-2010	7-12-2009 21-9-2010

Dioxines en PCB126-depositie

In 2009-2010 werden er op 6 locaties depositiemetingen van dioxines en PCB126 uitgevoerd in de regio Genk (Tabel 3). In 2010 waren er alleen metingen op locatie 75GK18 en 75GK27. Op 2 locaties (75GK18 en 75GK27) werd er het volledige jaar 2010 gemeten. In totaal gaat het per locatie over 6 meetperiodes van telkens een maand waarbij er afwisselend een maand wel en een maand niet gemeten wordt.

Tabel 3: Meetposten 'dioxines en PCB126 depositie' in Genk.

Nieuwe naamgeving	Start	Einde
75GK18	05-05-2003	lopende
75GK26	14-04-2009	03-2010
75GK27	14-04-2009	03-2010
75GK28	14-04-2009	03-2010
75GK29	14-04-2009	lopende
75GK09	14-04-2009	03-2010

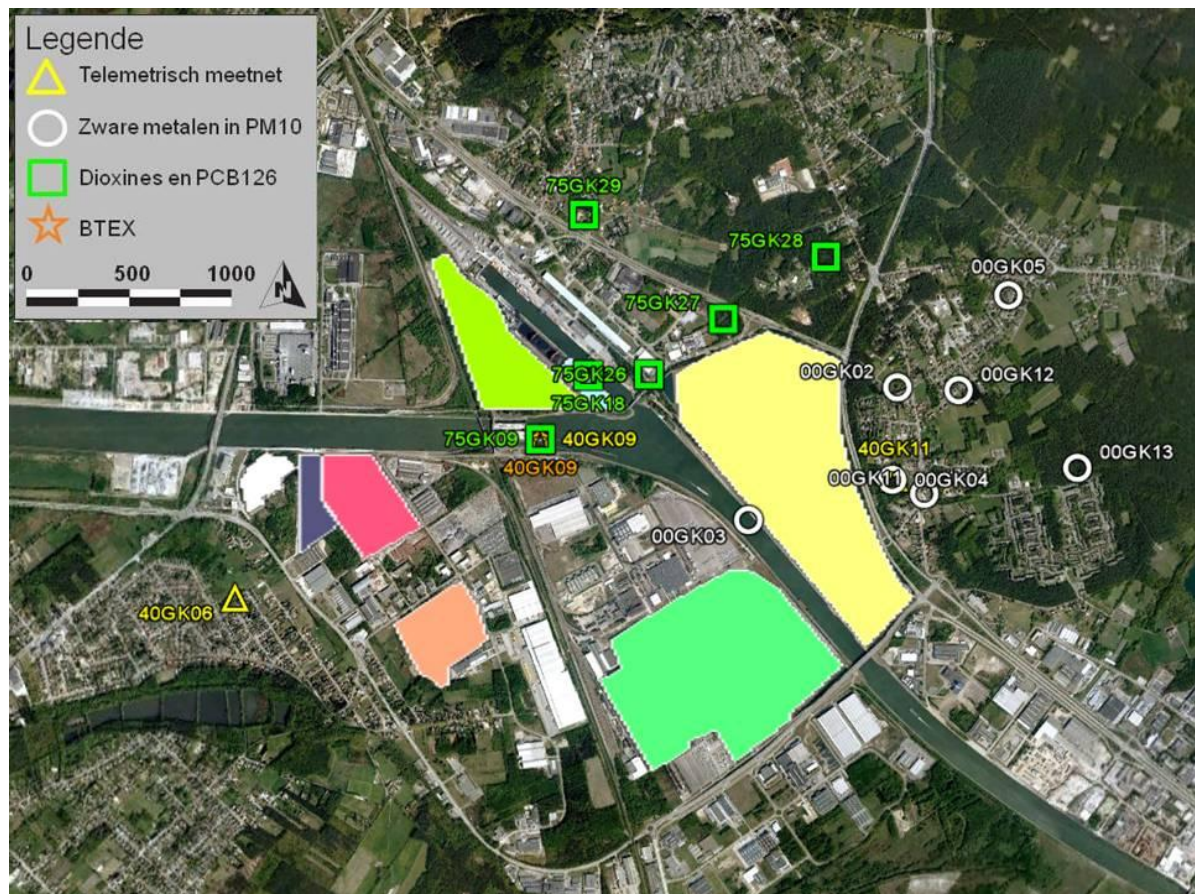
PAK-depositiemetingen

PAK-depositiemetingen worden tweemaal per jaar gedurende een maand uitgevoerd (eenmaal in het voorjaar en eenmaal in het najaar). Dit gebeurt op 1 locatie (meetpost voor dioxines Genk2).

Tabel 4: Ligging van de stations in de regio Genk

Station code	Gemeente	Straat	Lambertcoördinaten		
			X	Y	Z
Telemetrisch meetnet					
40GK06	Diepenbeek	Zinnistraat 6	227468	180302	44
40GK09	Genk	Sluis Langerlo	229017	181078	61
40GK11	Sledderlo	Etienne Fabrylaan	230954	180774	71
42N045	Hasselt	Boksbeemdenstraat	220558	181520	41
Zware metalen in PM10					
00GK02	Genk	Krelstraat 15	230826	181312	83
00GK03	Genk	Henry Fordlaan 8-Ford Genk	230064	180654	58
00GK04	Genk	Oosterring Speelplein	230793	180847	77
00GK05	Genk	De Koor	231393	181768	86
00GK11	Genk	Etienne Fabrylaan 6	230954	180774	71
00GK12	Genk	Koebaan 8	231143	181253	81
00GK13	Genk	Wintergroenstraat	231729	180894	84

Dioxines en PCB126				
75GK18	Genk	Swinnenwijerweg (Aquafarm)	229264	181398
75GK26	Genk	Kolenhavenstraat 6	229572	181397
75GK27	Genk	Swinnen wijerweg 6	229952	181673
75GK09	Genk	Sluis Langerlo	229017	181078
75GK28	Genk	Smeilstraat 74	230476	181980
75GK29	Genk	Loskaaistraat 9	229256	182209
BTEX				
40GK09	Genk	Sluis Langerlo	229017	181078
				61



Figuur 2: Overzicht van de VMM meetposten in Genk.

2.3. EFFECTGERICHTE MEETSTRATEGIE

Bij de selectie van de meetplaatsen, de frequentie en wijze van bemonstering en de keuze van de testen werd rekening gehouden met de vastgestelde milieuvervuiling en de mogelijke gezondheidsimpact daarvan, de praktische en financiële haalbaarheid van de meetstrategie.

2.3.1. SELECTIE MEETPLAATSEN

Voor het opstellen van een meetstrategie in de hotspot Genk-Zuid werd geopteerd om dit te doen naar analogie met de biomonitoringstrategie in de hotspots waarbij de resultaten van de biomerkers zullen worden vergeleken met de referentiewaarden uit de Vlaamse referentiebiomonitoring. De referentiewaarden dienen als controlewaarde voor de case studies.

Concreet betekent dit dat we meetresultaten van Genk-Zuid willen vergelijken met een 'Vlaamse referentiewaarde'. Het probleem stelt zich hier dat we niet over Vlaams referentiewaarden van de luchtkwaliteit beschikken die bekomen werden via effectgerichte metingen. Het voorstel is daarom om de resultaten van Genk-Zuid te vergelijken met de effectgerichte meetresultaten van een 'Vlaams referentiegebied'. Hiervoor werd een meetplaats in Vlaanderen geselecteerd die als achtergrond locatie of landelijk gebied beschouwd wordt in de VMM meetnetten. Dit betekent dat er één meetplaats zal voorzien worden in de regio Genk-Zuid en één meetplaats in een Vlaams referentiegebied.

Bij de keuze van de meetplaatsen werd rekening gehouden met beschikbare oppervlakte voor het plaatsen van bemonsteringstoestellen en de nutsvoorzieningen.

→ Genk

In het kader van het HBM-onderzoek werd er een onderzoeksgebied afgebakend vertrekkende van de gezondheidsenquête, de beschikbare milieumetingen en de kennis van verspreiding van pollutanten. Bij de keuze van de meetplaats wensen we bij voorkeur rekening te houden met de plaatselijke VMM meetposten voor o.a. zware metalen in zwevend stof (PM10), telemetrisch meetnet (fijn stof PM10) en dioxines/PCBs depositie. Op deze manier kunnen we optimaal gebruik maken van de chemische samenstelling van de luchtpartikels.

Het voorstel is om een meettoestel te plaatsen in de buurt van één van de volgende meetposten uit het zware metalen meetnet (volgorde in dalende prioriteit): 00GK04, 00GK11, 00GK02, 00GK03. De locatie van deze meetposten wordt gegeven in Tabel 2 en Figuur 2. De volgorde van prioriteit werd bepaald door de beschikbare meetgegevens van deze meetposten. Hoe hoger de gemeten metaalconcentratie (ng/m^3), hoe hoger de prioriteit. Zowel in 2007, 2008 en 2009 waren de concentraties (jaargemiddelden) van Ni, Cr, Mn, Zn, Cd, Pb, As het hoogst in meetpost 00GK04. (VMM, 2008; VMM, 2009; VMM 2010, zie ook VMM presentaties op http://www.genk.be/upload/15404240/downloads/toelichting_vmm.pdf (meetresultaten 2008); http://www.genk.be/upload/15404240/downloads/webversie_vmm_stuurgroep_genkzuid_21012_010_zware_metalen_alleen-lezen.pdf (meetresultaten 2009); http://www.genk.be/upload/15404240/downloads/presentatie_zware_metalen_genk_zuid_2009_2010.pdf (meetresultaten 2009-2010).

Daar de meetlocatie 00GK04 verplaatst werd naar de locatie E. Fabrylaan (00GK11 - speelplaats van de gesloten school 'De Sleutel') werd deze laatste weerhouden als meest geschikte meetpost voor deze studie.

Het beschikbare budget binnen dit project laat niet toe om op meerdere meetposten de lucht te bemonsteren in Genk (b.v. in functie van afstand tot industrieterrein (ten NO (overheersende windrichting) of ten Z/ZW van het industrieterrein).

→ Referentiegebied

Omdat er geen effectgerichte referentiewaarden beschikbaar zijn in Vlaanderen, werd geopteerd om een meetplaats in Vlaanderen die als achtergrondlocatie of landelijk gebied wordt beschouwd in één van de VMM meetnetten te selecteren als referentiegebied. Tabel 5 geeft een overzicht van de achtergrond locaties en landelijke gebieden in de verschillende VMM meetnetten.

Tabel 5: Achtergrond locaties in VMM meetnetten

Meetnet	Achtergrond/landelijk gebied	Code
Zware metalen in fijn stof	Koksijde	00KK02
	Hechtel-Eksel (tot eind 2007)	00EK03
PAKs	Houtem (vanaf 2009)	60N029
Telemetrisch meetnet (fijn stof)	Dessel	42N016
	Aarschot	42N035
	Moerkerke	44N012
	Houtem(Veurne)	44N029
Dioxines en PCB126	Mol	75MO10
VOS	Aarschot	50N035
BTEX	Houtem	44N029

Bij opmaak van dit projectvoorstel kwamen volgende meetplaatsen in aanmerking als kandidaat voor een referentie gebied:

- Aarschot

- Behoort tot het telemetrisch meetnet, VOS en PAKs meetnet (tot 2009) van VMM
- Wordt beschouwd als achtergrond gebied
- Werd meegenomen in het pilootproject effectgericht meten (2006-2007) en eerste Chemkar studie (2006-2007)
- Gegevens over PM10 concentraties beschikbaar
- Geen gegevens over metalen in PM10
- PAKs meetnet: TSP bemonstering

- Hechtel-Eksel

- Behoorde tot eind 2007 tot het meetnet zware metalen in fijn stof (PM10)
- Wordt beschouwd als achtergrondgebied

- Koksijde

- Behoort tot het meetnet zware metalen in fijn stof (PM10)
- Wordt beschouwd als achtergrondgebied

De locatie Aarschot heeft als voordeel dat er een high-volume Digitaal sampler aanwezig is. Omdat er niet dagelijks bemonsterd wordt, is er de mogelijkheid om beladen filters te verzamelen op de dagen dat er geen PAKs bemonstering is. Deze methode werd ook toegepast in de pilootstudie “Uitwerken en uitvoeren van een pilootproject voor effectgerichte metingen om de luchtkwaliteit in Vlaanderen te kunnen evalueren”. Nadelen van deze locatie zijn de bemonstering van TSP i.p.v. PM10 en het ontbreken van informatie over metaalconcentraties in de lucht. De metingen op de meetpost in Aarschot werden in 2009 stopgezet omdat deze residentiële locatie niet meer als achtergrond kan beschouwd worden. Het meettoestel werd verhuisd naar Houtem (60N029).

Omdat zware metalen een probleempolluent zijn in Genk-Zuid werd de achtergrond locatie ‘Koksijde’ van het VMM meetnet zware metalen weerhouden voor deze studie. Hechtel-Eksel behoorde tot eind 2007 eveneens tot het meetnet zware metalen en werd ook beschouwd als achtergrondlocatie. Vanwege een beter ligging (binnenland) had de locatie Hechtel-Eksel een beter optie geweest in deze studie, maar de zware metaalmetingen werden eind 2007 stopgezet.

2.3.2. BEMONSTERING VAN PM10

Voor de bemonstering van fijn stof (PM10) werd vooreerst nagegaan of er gebruik kon gemaakt worden van de bemonsteringstoestellen voor fijn stof die aanwezig zijn op de gekozen locaties.

In het telemetrisch meetnet worden automatische metingen uitgevoerd met monitoren. Voor de bemonstering van zware metalen wordt een Leckel SEQ47/50 luchtbemonsteringstoestel gebruikt. Het zwevend stof wordt met een pomp aangezogen door een PM-10 inlaat. Het stof wordt gecollecteerd op kwartsfilters met een diameter van 47 mm. Elke filter wordt gedurende 24 uur bemonsterd. Deze metingen gebeuren dagelijks. Dit betekent dat we voor de studie effectgericht meten aparte bemonsteringstoestellen moeten voorzien voor de collectie van luchtstalen.

Bij het opmaken van de meetstrategie hadden VITO en VMM de volgende toestellen ter beschikking:

- VITO

- Een high volume sampler:

Digitel DHA-80 sampler; aanzuigdebiet 30 m³/h; PM2,5 of PM10 kop; filters 150 mm diameter; autonomie 14 filters

- Twee low volume samplers:

Partisol Plus type 2025; aanzuigdebiet 1 m³/h; PM2,5 of PM10 kop (eventueel ook TSP of PM1); filters 47 mm diameter; autonomie 14 filters

- VMM

- Low-volume sampler:

Pourbaix meetstation, PM16, aanzuigdebiet 0.9 m³/h; filters 47mm

Partisol meetstation, PM10, aanzuigdebiet 1 m³/h

Om logistieke redenen (ligging van het meetstation, beschikbare plaats en nutsvoorziening voor het plaatsen van bemonsteringstoestellen en de frequentie van filterwisseling) werd gekozen voor de volgende opstelling:

In Genk werden drie low volume samplers Partisol Plus type 2025 geplaatst met volgende kenmerken:

aanzuigdebiet 1 m³/h

PM10 kop

Teflon filter (PTFE, Teflo, PALL Life Sciences, $\phi=47\text{mm}$)

In Koksijde werd een high volume sampler Digitel DHA-80 sampler geïnstalleerd met volgende kenmerken:

aanzuigdebiet 30 m³/h

PM10 kop

Teflon filter (PTFE, T38, Whatman, $\phi=150\text{mm}$)

Bij beide toestellen worden de partikel- en de semi-vluchtige fase bemonsterd.

De filtermatrix heeft een groot contactoppervlak met de aangezogen luchtstroom waardoor componenten uit de gasfase gemakkelijk kunnen adsorberen op het filteroppervlak. Omgekeerd kunnen de partikelgebonden OC gecollecteerd op de filter verdampen als de concentraties in de gasfase onder het evenwichtsniveau dalen. Tenslotte kunnen PAKs gecollecteerd op de filter chemisch transformeren door reactie met componenten uit de gasfase (O₃ en NO_x); ozon, hydroxyl- en nitraatradicalen zijn zeer reactieve agentia die PAKs kunnen transformeren en/ of degraderen.

Om mogelijke degradatie of transformatie van het gecollecteerde materiaal tegen te gaan worden de bemonsterde filters het best zo snel mogelijk afgeschermd van licht (UV) en lucht (reactieve gassen, zoals ozon, NO_x). Om vervluchtiging te beperken is het eveneens belangrijk de filters koel te transporteren en te bewaren. En dit zo snel mogelijk nadat de bemonstering is beëindigd.

In deze studie is de kans op staalname-artefacten het grootst in Koksijde. Enerzijds door het gebruik van de high-volume sampler. De pomp die met een hoog debiet lucht aanzuigt, geeft warmte af waardoor chemische reacties of verdamping van vluchtige componenten op de filter kunnen optreden. Daarnaast gebeurde de filterwissel minder frequent in Koksijde in vergelijking met Genk.

De filters die gebruikt werden in de high- en low volume samplers tijdens de meetcampagne zijn beiden geschikt voor het weerhouden van PM10. Beide filters zijn van hetzelfde materiaal (Teflon) doch van een andere fabrikant. Beide filtertypes werden in het verleden reeds gebruikt voor bemonstering van fijn stof voor verdere toepassing in *in vitro* testen. Het beschikbare budget en tijdsbestek binnen dit project liet geen verder onderzoek toe van de vergelijkbaarheid van de effectgerichte meetresultaten tussen beide filtertypes en bemonsteringstoestellen.

Om de analyses en dataverwerking binnen het geplande tijdsbestek uit te kunnen voeren, werd de meetcampagne uitgevoerd gedurende 6 maanden met start op 31/01/2010 en einde op 31/07/2010.

De HBM-studie loopt over 2 schooljaren. In het schooljaar (2009-2010) werden 147 adolescenten gezien op de onderzoeksdagen (Tabel 6).

Tabel 6:HBM: Overzicht van de onderzoeksdagen en aantal deelnemers.

	datum	Aantal deelnemers
1	11/01/2010*	11
2	16/01/2010*	17
3	18/01/2010*	23
4	1/02/2010	17
5	8/02/2010	10
6	11/03/2010	11
7	12/04/2010	7
8	15/04/2010	10
9	26/04/2010	15
10	29/04/2010	18
11	1/07/2010	8
		147

*data vallen buiten de meetcampagne voor de bemonstering in functie van maandstalen.

De frequentie van bemonstering gebeurde in functie de gezondheidseindpunten die worden gemeten in de HBM-studie. Hierbij wordt een onderscheid gemaakt tussen enerzijds humane effectbiomerkers die wijzen op een recente blootstelling en anderzijds effectbiomerkers van middellange tot lange termijn blootstelling.

- Humane biomerkers van recente blootstelling omvatten de merkers voor DNA-schade en oxidatieve stress merkers (komeettest; 8-OH-dG)

Om de luchtkwaliteit van recente blootstelling te kunnen evalueren werd in Genk-Zuid de lucht bemonsterd de dag (24u) voor de veldwerkdag (8 veldwerkdagen).

- Gezondheidseindpunten en effectbiomerkers van middellange/lange termijn blootstelling zijn astma en allergie; hormoonverstoring en carcinogene effecten.

Bij de aanbeveling van het Pilootproject 2006-2008 werd gesteld dat wanneer de vraagstelling gericht is op een globale inventarisatie per regio vb om de luchtkwaliteit in een regio te karakteriseren of om een link te kunnen leggen met gezondheid zouden stalen over bepaalde tijdspannen kunnen gepoold worden. In functie van niet-recente blootstelling is het aangewezen om te bemonsteren over een lange periode om de luchtkwaliteit te beoordelen. Daarom werd geopteerd om op verschillende dagen per maand (10 dagen per maand met spreiding in de tijd) luchtstalen te verzamelen en dit gedurende 6 maanden. Nadien worden de luchtstalen per maand gepoold tot één maandstaal.

2.3.3. KEUZE VAN DE *IN VITRO* TESTEN

De keuze van de biotesten die uitgevoerd zullen worden op de luchtstalen werd afgestemd op de biomerkers van effect die worden gemeten in de biomonitoring van de adolescenten en gebeurde op basis van de resultaten van de pilootstudie.

Om een betere inschatting te kunnen maken van de mogelijke gezondheidseffecten van luchtstalen op basis van biologische testen zal in elk testsysteem een gekende toxische stof worden meegenomen (referentiestof). De toxische potentie van de partikels zal uitgedrukt worden als equivalent van de toxische potentie van de gekende toxische stof waarvan het risico voor de mens beter gekend is.

Tabel 7: Overzicht van de testsystemen.

Gezondheidseffect	<i>In vitro</i> test	Betekenis	PM10 fractie	Referentiestof	Luchtstalen
Carcinogene effecten	Ames	Maat voor aanwezigheid van genotoxische stoffen	Extract	B(a)P	Pool per maand/locatie
Immunologische effecten	Beas-2B bronchiale cellijn: il-6/il-8	Inflammatie	Partikels	LPS (endotoxine)	Pool per maand/locatie
	LAL test	Maat voor aanwezigheid van endotoxines	Partikels		Pool per maand/locatie
Hormoonverstoring	MELN test	Maat voor aanwezigheid van hormoonverstorende stoffen	Extract	Oestradiol	Pool per maand/locatie
Oxidatieve stress	Radicaalgenererend vermogen	Vermogen om zuurstofradicalen te genereren	Partikels	EVA-91 (coal fly ash)	Genk: dagstalen voor veldwerkdag Koksijde: alle dagstalen

→ **Genetische toxiciteit**➤ Ames

De Ames test (*Salmonella typhimurium* his⁻ reverse mutatie test) is de meest gevalideerde genotoxiciteitstest.

De Ames-test een mutageniciteitstest gebaseerd op het meten van de reversie van histidine-negatief (His⁻) naar histidine-positief (His⁺) in genetisch gemodificeerde His⁻ *Salmonella typhimurium* bacteriën onder invloed van chemische stoffen. Mutagenen veroorzaken in het histidine-gen van de mutante His⁻ *Salmonella typhimurium* bacterie een basepaarsubstitutie of een frameshift mutatie. De mutante bacteriën kunnen niet overleven in een histidine-arm voedingsmedium. Na terugmutatie kunnen de bacteriën groeien op een histidine-arme voedingsbodem. De mogelijkheid van een chemische stof om te interageren met het DNA van een bacterie is een maat voor het potentieel mutageen en/of carcinogeen karakter van deze stof in zoogdieren.

Wanneer het testitem mutageen is, zullen er significant meer bacteriën naar His⁺ reverteren dan spontaan. Deze gereverteerde bacteriën groeien door en vormen zichtbare kolonies in het medium. Deze worden, na 2 dagen incubatie, geteld en vergeleken met de frequentie van spontane terugmutaties. Is het aantal kolonies verdubbeld t.o.v. wat spontaan wordt aangetroffen, dan spreekt men van een mutageen effect van de teststof.

De in deze test gebruikte bacteriën hebben geen enzymesystemen die bij dieren wel pro-mutagenen naar mutagene metabolieten kunnen omzetten. Om toch mutagene metabolieten in de Ames-test te kunnen opsporen, wordt een exogeen metabolisch activatiesysteem aan de bacteriën toegevoegd. Het betreft hier meestal een rattenlever post-mitochondriële fractie (S9) van meestal met Aroclor 1254 behandelde ratten. (Maron and Ames, 1983). S9-fractie wordt commercieel aangekocht. De bacteriestam worden blootgesteld aan de te testen stof in aan- en afwezigheid van het exogeen metabool activatiesysteem S9 (metaboliserend rattenleverpreparaat).

→ **Endocriene verstoring**➤ MELN assay

Er werd gebruik gemaakt van de MELN-cel lijn, dit zijn MCF-7 cellen (humane borstkanker cellen) die stabiel getransfecteerd werden met het ERE-βGlob-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. In het kader van het 6th FP EU-project Reprotect werd binnen VITO de MELN assay ontwikkeld en geprevalideerd voor opsporen van stoffen met agonistische of antagonistische werking voor de humane oestrogen receptor (hER). Bij screening van stoffen of milieustalen met ongekende oestrogene activiteit wordt een prescreen opgezet (Witters *et al.*, 2010).

De prescreen werd gebruikt om te bepalen of er stoffen in de extracten zitten die een agonistische (oestrogene) of antagonistische (antioestrogene) potentie hebben.

- 1) 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 oestrogenreceptor leidt tot gentranscriptie o.a. van het luciferase reportergen, waardoor het luciferase enzym geproduceerd wordt. Wanneer er Luciferase Assay Reagents 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.

- 2) 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 antioestrogene potentie in het extract. Er treedt immers competitie op voor binding aan de oestrogeen receptor tussen de antagonisten en E2. Binding van E2 leidt tot gentranscriptie, maar binding van antagonisten leidt tot blokkade van de oestrogeen receptor waardoor het resultaat een daling is in functie van stijgende hoeveelheid antagonist.

Bovendien werden de extracten ook steeds getest voor algemene cytotoxiciteit met behulp van een LDH (lactaat dehydrogenase) lekkage test. 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 (Berckmans *et al.*, 2007). In de prescreen wordt eveneens getest voor specifieke toxiciteit, namelijk bij een 1000 EC50-concentratie van E2 wordt ook een verdunningsreeks van het extract getest. Indien het signaal voor luminescentie beduidend daalt is er mogelijk interferentie met het reportersysteem.

→ Immunotoxiciteit

➤ il-6 en il-8 productie door Beas-2B cellen

IL-6 en IL-8 zijn pro-inflammatoire cytokines die vrijgesteld kunnen worden door respiratoire cellen (o.a. Beas-2B).

IL-6 speelt een rol bij de allergische respons doordat 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. De cytokines kunnen gemeten worden in het supernatans via Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Invitrogen hu il-6 CytoSet, BD OptEIA™ hu il-8 Elisa Set).

De Beas-2B cellijn (ATCC: CRL-9609) is een humane bronchiale epitheliale adherente cellijn, afkomstig van normaal humaan bronchiaal epitheel, maar geïnfecteerd met adenovirus 12-SV40 hybride en gekloneerd.

➤ Endotoxine test

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 het interpreteren van cytokine-signalen voor immuuntoxiciteit.

Partikel stalen zullen worden geëvalueerd voor aanwezigheid van endotoxines. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van een kwantitatieve LAL-testkit (QCL-1000 kit, Lonza). Deze is gebaseerd op het lysaat van amoebocyten van de degenkrab (LAL= limulus amoebocyte lysaat). Endotoxines zorgen voor de omzetting van een pro-enzyme in het LAL 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).

→ **Systemische toxiciteit**

➤ Cytotoxiciteit Beas-2B cellijn

De cytotoxiciteit van de teststof, de potentie om cellen te beschadigen, wordt bepaald m.b.v. de neutraal rood test. De test is gebaseerd op de potentie van een chemische stof om op een dosisafhankelijke manier te interfereren met de celgroei. 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.

➤ Radicaalgenererend vermogen

Om het radicaalgenererend vermogen van partikels te bepalen wordt een niet-biologische test meegenomen. Het vermogen van fijn stof om zuurstofradicalen te genereren, reflecteert hoogstwaarschijnlijk de mate waarin het biologische schade kan veroorzaken.

Het radicaalgenererend vermogen wordt bepaald met 'electron spin'-resonantiespectroscopie en uitgedrukt in arbitraire eenheden per m³ bemonsterde lucht en per massa-eenheid fijn stof. Deeltjes worden van de filter gehaald door middel van sonificatie in water. Door toevoeging van waterstofperoxide aan de gesuspendeerde partikels kan de mate waarin oxiderende en reducerende reacties plaatsvinden worden bepaald.

HOOFDSTUK 3. MEETCAMPAGNE IN HOTSPOT GENK-ZUID

3.1. STAALNAME

Een overzicht van de beschikbare filters, staalnamedata en de bemonsteringsvolumes wordt hierna weergegeven.

Er werd vooropgesteld om op dezelfde dagen te bemonsteren in Koksijde en in Genk-Zuid omdat het verloop van de hoeveelheid fijn stof en de samenstelling ervan varieert van dag tot dag. Om praktische en logistieke redenen kon hier niet aan voldaan worden. In Koksijde werd de automatische filterwisseling van het Digitel toestel ingesteld op 3 dagen. Door de extra luchtstaal collectie in Genk-Zuid in functie van de HBM-onderzoeksdagen kon het tijdschema van Koksijde niet aangehouden worden in Genk. Om voldoende luchtstalen te verzamelen voor het gepoolde staal per maand werd in Genk ook op ander dagen lucht bemonsterd. In de verwerking van de meetresultaten in relatie tot de fysico-chemische karakteristieken en de meteorologische gegevens zal verder bekeken worden of de staalnamedagen representatief zijn voor de luchtkwaliteit van een volledige maand (HOOFDSTUK 5).

3.1.1. KOKSIJDE

In Koksijde werd gedurende de maanden februari, maart, april, mei en juni 2010 de lucht bemonsterd. Door een technische fout van het Digitel toestel werden in de tweede helft van mei en in juli geen filters verzameld. Om de 3 dagen had een automatische filterwissel plaats zodat in optimale omstandigheden er 10 beladen filters per maand konden verzameld worden. Voor de bemonsterde dagen werd steeds een bemonsteringstijd van 24h gehaald.

Tabel 8 geeft een overzicht van de staalnamedagen in Koksijde.

Tabel 8: Overzicht van de staalnamedagen in Koksijde. N is het aantal bemonsterde dagen per maand.

Maand	Datum	Filtercode	m ³ /24 uur
Februari (n=10)	1/02/2010	K1	720
	4/02/2010	K2	720
	7/02/2010	K3	720
	10/02/2010	K4	720
	13/02/2010	K5	720
	16/02/2010	K6	720
	19/02/2010	K7	720
	22/02/2010	K8	720
	25/02/2010	K9	720
	28/02/2010	K10	720
Maart (n=10)	3/03/2010	K11	720
	6/03/2010	K12	720
	9/03/2010	K13	720
	12/03/2010	K14	720
	16/03/2010	K15	720
	19/03/2010	K16	720
	22/03/2010	K17	720
	25/03/2010	K18	720
	28/03/2010	K19	720
	31/03/2010	K20	720
April (n=9)	3/04/2010	K21	720
	6/04/2010	K22	720
	9/04/2010	K23	720
	12/04/2010	K24	720
	15/04/2010	K25	720
	18/04/2010	K26	720
	21/04/2010	K27	720
	24/04/2010	K28	720
	29/04/2010	K29	720
Mei (n=6)	2/05/2010	K30	720
	5/05/2010	K31	720
	8/05/2010	K32	720
	11/05/2010	K33	720
	14/05/2010	K34	720
	17/05/2010	K35	720
Juni (n=8)	8/06/2010	K36	720
	11/06/2010	K37	720
	14/06/2010	K38	720
	17/06/2010	K39	720
	20/06/2010	K40	720
	23/06/2010	K41	720
	26/06/2010	K42	720
	29/06/2010	K43	720

3.1.2. GENK-ZUID

In Genk-Zuid werd gedurende de maanden februari, maart, april, mei, juni en juli 2010 de lucht bemonsterd met 3 Partisol samplers.

Er is getracht om minstens 10 dagen per maand de lucht te bemonsteren om tot een gepoold staal te kunnen komen. Voor de bemonsterde dagen werd niet steeds een bemonsteringstijd van 24h gehaald wegens technische problemen of het bereiken van de beladingscapaciteit van de filter. Voor het bekomen van de gepoolde stalen werd steeds bemonsterd op een Teflo filter. Tabel 9 geeft een overzicht van de staalnamedagen in Genk-Zuid .

Buiten deze dagen werd er ook een 24h luchtstaal verzameld de dag die vooraf gaat aan een onderzoeksdag van de HBM-studie om korte termijn blootstelling in te schatten. In totaal werd op 10 dagen de lucht bemonsterd in functie van de HBM-veldwerkdagen. Tabel 10 geeft een overzicht van de staalnamedagen in functie van de onderzoeksdagen van de HBM-studie (zie ook Tabel 6).

Tabel 9: Overzicht van de staalnamedagen in Genk-Zuid. Het bemonsterde volume wordt weergegeven voor elk van de drie Partisol samplers. N is het aantal bemonsterde dagen per maand.

Maand	Datum	Partisol 69801		Partisol 80806		Partisol VMM	
		Filtercode	m ³ /24 uur	Filtercode	m ³ /24 uur	Filtercode	m ³ /24 uur
Februari (n=12)	3/02/2010	GZ18	24	GZ33	24	GZ248	24
	5/02/2010					GZ249	24
	9/02/2010	GZ21	24	GZ36	24	GZ251	24
	11/02/2010	GZ22	24	GZ37	24	GZ252	24
	13/02/2010	GZ23	24	GZ38	24	GZ253	24
	15/02/2010	GZ24	24	GZ39	24	GZ254	24
	17/02/2010	GZ25	24	GZ40	24	GZ255	24
	19/02/2010	GZ26	24	GZ41	24	GZ256	24
	21/02/2010	GZ27	24	GZ42	24	GZ257	24
	23/02/2010	GZ28	24	GZ43	24	GZ258	24
	25/02/2010	GZ29	24	GZ44	24	GZ259	24
	27/02/2010	GZ30	24	GZ45	24	GZ260	24
Maart (n=12)	1/03/2010	GZ31	24	GZ46	24	GZ261	24
	3/03/2010	GZ32	9	GZ47	9	GZ262	9
	4/03/2010	GZ263	24	GZ275	24	GZ288	24
	7/03/2010	GZ264	24	GZ276	24	GZ289	24
	13/03/2010	GZ266	24	GZ278	24	GZ291	24
	16/03/2010	GZ267	24	GZ279	24	GZ292	24
	22/03/2010	GZ269	24	GZ281	24	GZ294	24
	23/03/2010	GZ271	24	GZ283	24	GZ296	24
	25/03/2010	GZ272	24	GZ284	24	GZ297	24
	27/03/2010	GZ273	24	GZ285	24	GZ298	24
	29/03/2010	GZ274	24	GZ286	24	GZ299	24
	31/03/2010	GZN1	24	GZN5	24	GZN9	24
April (n=13)	2/04/2010	GZN2	24	GZN6	24	GZN10	24
	4/04/2010	GZN3	24	GZN7	24	GZN11	24
	6/04/2010	GZN4	24			GZN12	24

	7/04/2010	GZ300	16,6	GZ315	16,6	GZ330	16,6
	9/04/2010	GZ301	24	GZ316	24	GZ331	24
	12/04/2010	GZ304	16,7	GZ319	16,7	GZ334	16,7
	16/04/2010	GZ306	24	GZ321	24	GZ336	24
	18/04/2010	GZ307	24	GZ322	24	GZ337	24
	20/04/2010	GZ308	24	GZ323	24	GZ338	24
	22/04/2010	GZ309	24	GZ324	24	GZ339	24
	23/04/2010	GZ303	15,6	GZ318	15,6	GZ333	15,6
	26/04/2010	GZ312	16,9	GZ327	16,9	GZ342	16,9
	30/04/2010	GZ313	24	GZ328	24	GZ343	24
Mei (n=11)	2/05/2010	GZ314	24	GZ329	24	GZ344	24
	3/05/2010	GZ360	12,6	GZ345	12,6	GZ375	12,6
	6/05/2010	GZ361	24	GZ346	24	GZ376	24
	9/05/2010	GZ362	24	GZ347	24	GZ377	24
	12/05/2010	GZ363	24	GZ348	24	GZ378	24
	15/05/2010	GZ364	24	GZ349	24	GZ379	24
	18/05/2010	GZ365	24	GZ350	24	GZ380	24
	21/05/2010	GZ366	24	GZ351	24	GZ381	24
	24/05/2010	GZ367	24	GZ352	24	GZ382	24
	27/05/2010	GZ368	24	GZ353	24	GZ383	24
	30/05/2010	GZ369	24	GZ354	24	GZ384	24
Juni (n=10)	2/06/2010	GZ370	24	GZ355	24	GZ385	24
	5/06/2010	GZ371	24	GZ356	24	GZ386	24
	8/06/2010	GZ372	24	GZ357	24	GZ387	24
	11/06/2010	GZ373	24	GZ358	24	GZ388	24
	14/06/2010	GZ374	24	GZ359	24	GZ389	24
	17/06/2010	gz420	24	gz390	24	gz405	24
	20/06/2010	gz421	24	gz391	24	gz406	24
	23/06/2010	gz422	24	gz392	24	gz407	24
	26/06/2010	gz423	24	gz393	24	gz408	24
	29/06/2010	gz424	14	gz394	14	gz409	14
Juli (n=10)	3/07/2010	gz426	24	gz396	24	gz411	24
	6/07/2010	gz427	24	gz397	24	gz412	24
	9/07/2010	gz428	24	gz398	24	gz413	24
	12/07/2010	gz429	24	gz399	24	gz414	24
	15/07/2010	gz430	24	gz400	24	gz415	24
	18/07/2010	gz431	24	gz401	24	gz416	24
	21/07/2010	gz432	24	gz402	24	gz417	24
	24/07/2010	gz438	24	gz433	24	gz443	24
	27/07/2010	gz439	24	gz434	24	gz444	24
	30/07/2010	gz440	24	gz435	24	gz445	24

Tabel 10: Overzicht van de staalnamedagen in Genk-Zuid in functie van de HBM-studie. Het bemonsterde volume wordt weergegeven voor elk van de drie Partisol samplers.

	Datum ¹	N ²	Partisol 69801		Partisol 80806		Partisol VMM		Filter ³
			Filtercode	m ³ /24 uur	Filtercode	m ³ /24 uur	Filtercode	m ³ /24 uur	
1	15/01/2010	17	GZ-1	15					Zefluor
2	17/01/2010	23	GZ-3	24					Zefluor
3	31/01/2010	17	GZ8	24	GZ12	24	GZ16	24	Zefluor
4	7/02/2010	10	GZ20	24	GZ35	24	GZ250	24	Teflo
5	10/03/2010	11	GZ265	24	GZ277	24	GZ290	24	Teflo
6	11/04/2010	7	GZ302	24	GZ317	24	GZ332	24	Teflo
7	14/04/2010	10	GZ305	16,7	GZ320	16,7	GZ335	16,7	Teflo
8	25/04/2010	15	GZ310	24	GZ325	24	GZ340	24	Teflo
9	28/04/2010	18	GZ311	24	GZ326	24	GZ341	24	Teflo
10	30/06/2010	8	GZ425	24	GZ395	24	GZ410	24	Teflo

¹ dag van de luchtstaalname

² N: In aanmerking genomen deelnemers

³ De gebruikte filters zijn teflon (PFTE) filters. Er werd gestart met het type Zefluor maar door een vertraging in de productie van de filters werd overgeschakeld naar het type Teflo. Beide filtertypes werden in het verleden gebruikt voor de collectie van PM10. Geen van beiden geeft een matrix effect in de Ames test en de immunotoxiciteitstesten.

3.2. BEHANDELING VAN DE FILTERS

De staalvoorbereiding gebeurde in functie van de biologische testsysteem. Er werden enerzijds partikels verzameld van de beladen filters en anderzijds werd een organische extractie (ASE= Accelerated Solvent Extraction) uitgevoerd van de beladen filters.

Per locatie werden voor elke maand filters gepoold zodat er één organisch extract en één partikel staal werd bekomen per maand en per locatie. Hiervoor werd elke filter verdeeld waarbij een deel gebruikt werd voor het ASE extract, een deel voor PM collectie voor Universiteit Hasselt (UH) (testen van radicaalgenererend vermogen van PM10) en het overige deel voor de verzameling van de partikels.

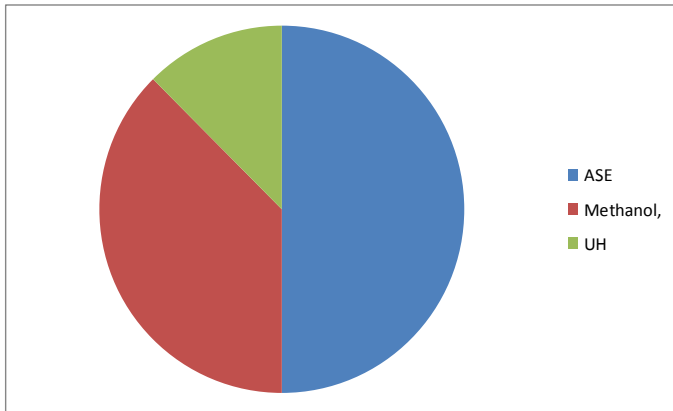
- Verdeling van de filters van Koksijde

Elke filter (Ø=150mm) werd verdeeld zoals weergegeven in Figuur 3 :

½ filter : ASE extractie

3/8 filter : methanol extractie

1/8 filter: PM extractie (Universiteit Hasselt(UH))



Figuur 3: Verdeling van de filters bemonsterd in Koksijde in functie van de verschillende extracties.

➤ Verdeling van de filters van Genk-Zuid

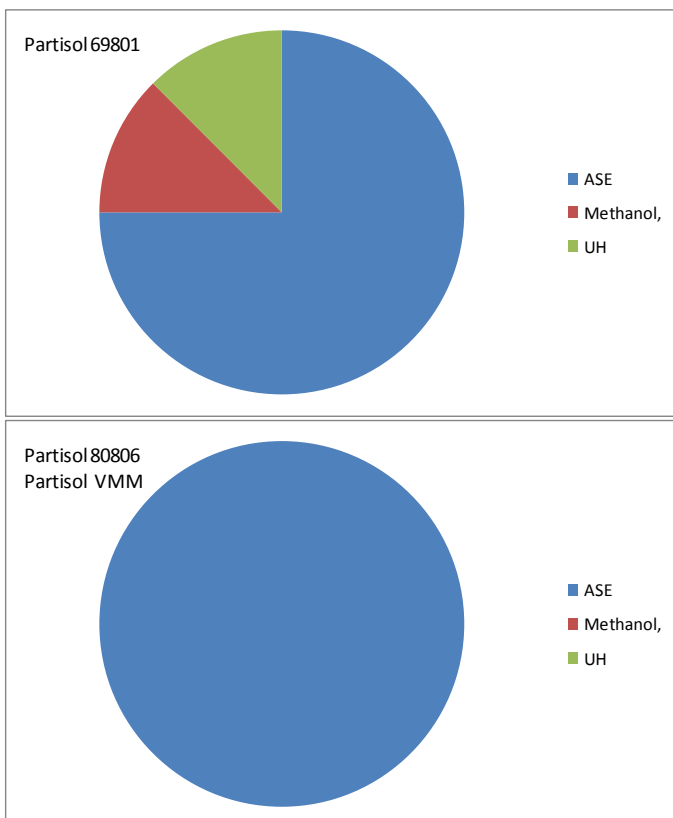
Per staalnamedag werd de filter ($\varnothing=47\text{mm}$) van toestel Partisol 69801 verdeeld zoals weergegeven in Figuur 4 :

$\frac{3}{4}$ filter: ASE extract

$\frac{1}{8}$ filter: methanol extractie

$\frac{1}{8}$ filter: PM extractie (Universiteit Hasselt (UH))

De twee overige filters van dezelfde dag (Partisol 80806 en Partisol VMM) werden volledig gebruikt voor het ASE extract. De biologische testen die uitgevoerd zullen worden op het ASE-extract vragen veel materiaal vandaar de ongelijke verdeling van de filters voor de verschillende extracties.



Figuur 4: Verdeling van de filters bemonsterd in Genk in functie van de verschillende extracties.

De filters van toestel Partisol 69801 van de staalname in functie van de HBM-studie in Genk werden door UHasselt gebruikt voor collectie van PM10 en testen van het radicaalgenererend vermogen.

3.2.1. ORGANISCHE EXTRACTIE

Bij de ASE (accelerated solvent extraction) methode wordt gebruik gemaakt van een 33 ml extractiecel (filters van Koksijde) of een 11 ml extractiecel (filters van Genk-Zuid) die van onder naar boven wordt gevuld met een cellulose glasvezel filter, de te extraheren filters, natriumsulfaat en celite. Celite wordt gebruikt als droogmiddel en hierboven brengt men 2 gram zeezand 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 extract werd vervolgens over een kolom gebracht. Een glazen kolom van Merck LiChrolut werd gevuld met een laagje glaswol met daarboven Na₂SO₄ (overnacht gedroogd op 225 °C). Er werd dan met 5 ml hexaan/acetone (50/50 v/v) geprewashed. Het ASE extract werd opgebracht en vervolgens werd de kolom 3 maal met 2 ml hexaan acetone (50/50 v/v) nagespoeld. Het bekomen extract werd ingedampt tot 1 ml en overgebracht in een conische vial. De tube werd nog 2 keer nagespoeld met hexaan/acetone (50/50 v/v).

Het bekomen extract wordt ingedampt onder N₂ bij 37°C en uiteindelijk gesubstitueerd in 100% DMSO tot een concentratie van 4200m³/ml. Het extract wordt bewaard bij 4°C.

Voor elk type filter (T38 (Digitel) en Teflo (Partisol)) wordt eveneens een extractie uitgevoerd van blanco filters. De volledige procedure wordt ook doorlopen zonder filter in de extractiecel (procedure blanco).

3.2.2. COLLECTIE VAN PARTIKELS VOOR BIOLOGISCHE TESTEN

Voor het verzamelen van de partikelfase van de beladen filters wordt een methanolextractie gebruikt (Steerenberg *et al.*, 2006).

De filterdelen van Genk-Zuid worden in een erlenmeyer van 50 ml gebracht samen met 20 ml methanol. In een erlenmeyer van 50 ml worden de filters afkomstig van Koksijde gebracht samen met 45 ml methanol. Het mengsel wordt 30 minuten gesoniceerd. Het supernatans wordt gedecanteerd in een rondbodempkolf van 250 ml. De bovenstaande stappen worden nog 2 x herhaald (2x20 ml methanol voor filters van Genk en 2x25 ml methanol voor de filters afkomstig van Koksijde). De suspensie wordt ingedampt 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 rondbodempkolf wordt nog 2 x nagespoeld en gesoniceerd. Uiteindelijk plaatst men de tube in de speedvac gedurende 4 uur 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 het gewicht van de partikels kan bepaald worden.

Voor elk type filter (T38 (Digitel) en Teflon (Partisol)) wordt eveneens een extractie uitgevoerd van blanco filters.

De verzamelde PM10 massa per gepoold staal wordt weergegeven in Tabel 11. De bekomen massa's PM10 na extractie zijn hoger voor de stalen uit Koksijde doordat er gestart werd met meer filtermateriaal (inclusief blanco filters) in vergelijking met de stalen uit Genk (zie 3.2).

Tabel 11: PM10 massa (mg) van de gepoolde stalen per maand.

Staal	mg
Koksijde februari 2010	38,14
Koksijde maart 2010	35,77
Koksijde april 2010	37,74
Koksijde mei 2010	11,53
Koksijde juni 2010	19,76
Blanco Koksijde	1,12
Genk februari 2010	3,3
Genk maart 2010	2,17
Genk april 2010	3,99
Genk mei 2010	3,79
Genk juni 2010	4,29
Genk juli 2010	4,79
Blanco Genk	0,06

3.2.3. COLLECTIE VAN PARTIKELS VOOR NIET-BIOLOGISCHE TEST

In falcon buizen werd RNase-vrij water toegevoegd aan de filters (5 ml voor filters met een oppervlakte van 17.43 cm²). Partikels werden geëxtraheerd door de stalen gedurende 30 minuten in een ultrasoon bad te plaatsen. Bij dit sonificatieproces werden er ultrasone trillingen uitgezonden waardoor de partikels gedispergeerd werden in de vloeistof. De vloeistof werd ingevroren op -80°C.

3.3. BLOOTSTELLING VAN DE TESTSYSTEMEN

Naar analogie met de pilootstudie werd de blootstelling van de *in vitro* systemen aan de organische extracten uitgevoerd met 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 lucht/dag. De hoogste blootstellingsconcentratie komt overeen met een dagequivalent van 20m³ lucht. De ASE extracten werden getest voor hun mutageen karakter en oestrogeen-actieve potentie.

De partikels van de filters die werden verzameld via een methanolextractie werden opgelost in PBS tot een concentratie van 10 mg/ml. De partikels werden getest voor cytotoxiciteit met Beas-2B cellen en hun inflammatoir karakter en de aanwezigheid van endotoxines werden geëvalueerd. Het radicaalgenererend vermogen van de partikels werd eveneens onderzocht.

De extracten van de blanco filters werden op dezelfde manier verdund als de extracten van de beladen filter en toegevoegd aan de biologische testsystemen.

3.3.1. AMES TEST

De Ames test wordt uitgevoerd in petriplaten (vogelbonnerplaat) die een MG (minimal glucose) voedingsbodem bevatten. Op deze bodemlaag wordt een top agarlaag aangebracht die de bacteriestam, het test item en de metaboliserende fractie bevat. De Ames test werd uitgevoerd met de stam TA98 in aan- en afwezigheid van de metaboliserende fractie S9.

Elk ASE extract (4200m³/ml DMSO) werd verder verdund en getest in 3 concentraties (20, 10, 5 m³ luchtequivalent/plaat) met 3 replica platen per concentratie.

Volgende controles werden meegenomen:

- negatieve controle (top agar zonder toevoeging) om het aantal spontane revertanten te bepalen
- solvent controle: DMSO (dimethyl sulphoxide)
- positieve controle in afwezigheid van S9: 4- nitroquinoline N-oxide (4-NQO) 0,2µg/plaat
- positieve controle in aanwezigheid van S9: 2- aminoanthracene (2-AA) 2,5µg/plaat

De volgende concentratiereeks B(a)P werd getest: 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 µg/plaat.

Het extract van een blanco filter en een procedureblanco (extractie in afwezigheid van een filter) werden eveneens getest.

De platen worden in de incubator geplaatst op 37 ± 1 °C gedurende 48 ± 4 uren waarna de kolonies worden geteld. Voor de telling van het aantal spontane revertanten (= negatieve (onbehandelde) controleculturen zonder S9) voor stam TA98 worden waarden verwacht tussen 1 (minimum) en 50 (maximum) revertanten/plaat. De tellingen van het aantal revertante kolonies geïnduceerd door de solventcontrole moeten waarden opleveren die liggen binnen de grenzen van de historische gegevens (zonder S9: 9-39 revertanten/plaat; met S9: 15-54 revertanten/plaat) De tellingen van het aantal revertante kolonies geïnduceerd door de positieve referentiestof (positieve controle) moeten waarden opleveren die preferentieel liggen binnen de grenzen van de historische gegevens, en minstens een biologische significantie aangeven. D.w.z. de incidentie aan revertanten bij de stammen TA 98 moet minstens tweemaal hoger zijn t.o.v. de spontane incidentie.

3.3.2. MELN ASSAY

Door toxiciteit van het oplosmiddel (100% DMSO) moeten de extracten verdund worden tot minstens 0.2% DMSO bij toediening aan de MELN cellen. De hoogste concentratie van extract die bij de MELN cellen kon getest worden was 8.4 m³/ml of 1.68 m³-equivalent/well. In een eerste test reeks werden al de extracten opgezet in de prescreen assay (2 experimenten prescreen 1 en prescreen 2), terwijl er steeds in parallel ook filtermateriaal getest werd van de corresponderende locatie om zo nodig een correctie toe te passen. In de prescreen werden 4 verdunningen van het extract getest voor de agonist vanaf 8.4 m³/ml tot 1.05 m³/ml, terwijl in de antagonist assay de hoogste testconcentratie 4.2 m³/ml was (vanwege 0.1 % DMSO) in een verdunningsreeks tot 0.52 m³/ml. In deze condities werd eveneens cytotoxiciteit van de extracten gemeten. Voor agonisme is de positieve controle 17β-oestradiol, en voor antagonisme werd 4OH-Tamoxifen gebruikt.

Nadat bij de prescreen bleek dat er geen cytotoxiciteit aanwezig was in de extracten, en dat er enkel een respons gedetecteerd werd voor agonisme, werd een herhaling van metingen enkel in de agonist assay opgezet. Er werden 6 diluties van een 1:2 verdunning van de extracten aan de MELN cellen blootgesteld, met 8.4 m³/ml als hoogste testconcentratie.

Voor beide testen werden de gemeten signalen van extracten (% luciferase inductie) vergeleken met het signaal voor de positieve controle E2 die in eenzelfde experimentele reeks werd geëvalueerd. Het signaal van de concentratierepons curven van de extracten werd omgezet naar een kwantitatief signaal voor oestrogene potentie, uitgedrukt als pg E2-equivalenten/m³. In sommige gevallen werd voor het geteste extract van de filterblanco een signaal gemeten. Indien dit

een kwantificeerbaar signaal was, namelijk hoger dan detectielimiet, dan werd de berekende waarde voor de overeenkomstige extracten gecorrigeerd.

3.3.3. CYTOTOXICITEIT IN BEAS-2B

De cytotoxiciteit van de partikels werd bepaald gebruikmakend van de bronchiale epitheel cellijn Beas-2B. De cellen werden in cultuur gebracht zoals beschreven in Verstraelen *et al.* (2009).

Van de PM poolstalen werd een stockoplossing van 10mg PM/ml PBS aangemaakt. Deze oplossing werd overnacht geschud en dan verder verdund tot 1 mg PM/ml BEGM medium. Na overnacht schudden werd deze oplossing verder verdund in medium en toegevoegd aan de Beas-2B cellen. De cellen (20000 cellen/96-well/200 μ l) werden gedurende 24 uur blootgesteld aan een concentratiereeks van partikels: 100, 50, 25, 12.5, 0 μ g PM/ml. Na blootstelling werd met de Neutraal Rood Uptake test de leefbaarheid van de cellen bepaald. Elke concentratie werd in zesvoud getest. De methanolextracten van de blanco filters werden op dezelfde manier behandeld en getest.

Als positieve controle werd een concentratiereeks van CdCl₂ (50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.195, 0 μ g/ml) getest.

3.3.4. PRODUCTIE VAN INFLAMMATOIRE CYTOKINES

Na 24 uur blootstelling van Beas-2B cellen aan de partikels werd het supernatans van de cytotoxiciteitsexperimenten verzameld, gepoold per blootstellingconcentratie en hierin werden il-6 en il-8 bepaald via Elisa (Invitrogen hu il-6 CytoSet, BD OptEIA™ hu il-8 Elisa Set). Als positieve controle werd het supernatans gebruikt van Beas-2B cellen na 24 uur blootstelling aan verschillende concentraties (2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0.156, 0.078, 0.039, 0 ng/ml) van het endotoxine LPS (lipopolysacharide S, Sigma, activiteit:1U=0.2ng).

3.3.5. ENDOTOXINE BEPALING

Per staal werd de hoogste concentratie van het partikel extract waaraan de Beas-2B cellen werden blootgesteld (100 μ g/ml) getest voor de aanwezigheid van endotoxine (Cambrex, QCL-1000 Chromogenic LAL Test Kit). Per filter werden twee replica metingen uitgevoerd.

3.3.6. RADICAALGENEREREND VERMOGEN

Het radicaalgenererend vermogen wordt bepaald met 'electron spin'-resonantiespectroscopie en uitgedrukt in arbitraire eenheden per m³ bemonsterde lucht en per massa-eenheid fijn stof. Deeltjes worden van de filter gehaald door middel van sonficatie in water. Door toevoeging van waterstofperoxide aan de gesuspenderde partikels kan de mate waarin oxiderende en reducerende reacties plaatsvinden worden bepaald. Deze methode correleert sterk met biologische methodes in longepitheelcellen waarbij de depletie van antioxidanten zoals ascorbaat en gereduceerd glutathione peroxidase werd gemeten (Shi T *et al.*, 2006). Als positieve controle werd EVA-91 gebruikt en een negatieve controle bestaat uit water en DMPO.

Kwantificatie gebeurde als de som van de totale amplitudes van het DMPO-_{OH} kwartet signaal, en de uitkomst werd uitgedrukt als de totale amplitude in arbitraire eenheden, gerelateerd aan dezelfde instrumentale instellingen. De DMPO/peroxide analyse is vooral gevoelig voor transitie metalen (Shi *et al.*, 2003). Doordat experimenten met nitro-PAKs en pure kinones geen detecteerbare DMPO-OH vorming geven, gebruikten we een positieve controle (EVA-91), een

vlieggas bekomen door verbranding van verpulverde kolen die minder rijk is aan metalen dan ROFAs (residual oil fly-ash) en meer gelijkaardig aan PM in het milieu. Deze positieve controle werd gebruikt in elke set van experimenten om te corrigeren voor een mogelijke afwijking in het signaal. De variatie tussen experimenten was minder dan 5%. Eerdere studies onderzochten het vermogen van verschillende metalen en valenties om hydroxyl-radicalen te genereren in de DMPO/peroxide methode (Shi *et al.*, 2003). De data toonden dat de kinetica van OH vorming verschilde tussen metalen en dat ook het maximaal OH genererend vermogen verschillend was. De hoogste activiteit werd waargenomen voor Cu²⁺, V²⁺ en Fe²⁺. Bovendien toonde werk met partikel houdende metalen ROFAs (die zeer rijk zijn aan transitie metalen) dat sommige partikelgeassocieerde metalen ook Fenton-reactief kunnen zijn. Het uiteindelijke resultaat is daarom een toevoeging van Fenton bio-beschikbare metalen geïnduceerde OH-vorming, en een dichtere benadering van de maat voor oxidatieve stress inductie dan een som van metaalcomponenten. De chemische reproduceerbaarheid van de methode (toegepast op hetzelfde monster) is binnen de 5%. Dit maakt toepasbaarheid van de methode mogelijk voor het vergelijken van PM monsters tussen verschillende dagen of tussen plaatsen op dezelfde dag (Shi *et al.*, 2003).

3.4. STATISTISCHE VERWERKING

In de verschillende biologische testsystemen werd een concentratiereeks van de ASE extracten of van de partikel fractie getest. De concentratie-effect respons werd onderzocht. In de Ames test werd de concentratieafhankelijkheid bepaald via een lineaire regressie analyse ($p=0.05$). Voor de andere assays werd een One-way ANOVA uitgevoerd.

Om na te gaan of er statistisch significante verschillen in respons voorkomen in functie van de tijd (tussen de maanden) en tussen de twee locaties (Genk en Koksijde) en of er een interactie bestaat tussen beiden werd een Factorial ANOVA design gebruikt. Bij een significant hoofdeffect van tijd werd een Tukey post-hoc test uitgevoerd om na te gaan welke maanden van elkaar verschillen.

Significante verschillen in de relatieve toxische potentie tussen Genk en Koksijde werden getest via een gepaarde t-test.

Het significantieniveau voor alle statistische testen is 0.05.

HOOFDSTUK 4. EFFECTGERICHTE METINGEN

Voor elk testsysteem werd de concentratie-respons en de relatieve toxicologische potentie geëvalueerd en werd het effect van de locatie en tijdstrends onderzocht.

4.1. AMES TEST

4.1.1. RESULTATEN

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)pyreen (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.

De ruwe resultaten van de tellingen (aantal revertanten per plaat) worden weergegeven in Tabel 12 voor de gepoolde stalen van Koksijde en in Tabel 13 voor de gepoolde stalen van Genk-Zuid.

In huidige studie werd een extract als positief (mutageen) aanzien als er een significante concentratie-respons is en er een verdubbeling is van het aantal revertanten bij 20 m³ luchtequivalent t.o.v. de solvent controle (Inductiefactor (IF)>2). De concentratieafhankelijkheid werd bepaald via een lineaire regressie analyse (p<0.05) waarbij de concentratie van 0 m³ lucht equivalent gelijk is aan de DMSO controle. Deze criteria werden eerder beschreven in de literatuur (Zhao and Li, 2002; Zhao *et al.*, 2002; Ducatti and Vargas, 2003; Du Four *et al.*, 2004; Buschini *et al.*, 2001; De Martinis *et al.*, 1999; Claxton *et al.*, 2001; Cerna *et al.*, 1999; Cerna *et al.*, 2000).

Noch de extracten van de blanco filters, noch de procedure blanco stalen vertoonden mutagene activiteit (IF<2). Er was geen significant verschil in aantal revertanten tussen de extracten van de blanco filters en de DMSO controle (t-test, p>0.05).

Alle extracten vertoonden een significante concentratierespons relatie (p<0.05) met uitzondering van het extract van de maand mei uit Koksijde (+S9) (p=0.052).

In de afwezigheid van S9 kon voor alle extracten een IF>2 worden aangetoond bij hoogst geteste concentratie van 20 m³ luchtequivalent.

In de aanwezigheid van S9 was er geen verdubbeling van het aantal revertanten t.o.v. de solvent controle voor de extracten van mei en juni uit Koksijde en de extracten van juni en juli uit Genk. Het aantal revertanten bij 20 m³ luchtequivalent was voor deze extracten met IF<2 echter wel significant verhoogd t.o.v. de solvent controle (t-test, p< 0.05).

Alle extracten voldoen aan de twee vooropgestelde criteria om als 'positief' mutageen te worden beschouwd in de Ames test (Tabel 13 en **Error! Reference source not found.**).

De directe mutageniciteit is significant verhoogd t.o.v. de indirecte mutageniciteit voor de extracten van februari en juni uit Genk en voor het extract van februari uit Koksijde (t-test, p<0.05).

Rekening houdend met de vooropgestelde criteria, tonen de resultaten aan dat alle gepoolde stalen van Koksijde en Genk schadelijke stoffen bevatten met een directe (-S9) mutagene werking en dat met uitzondering van de extracten van de maanden mei en juni uit Koksijde en juni en juli uit Genk alle extracten indirect mutageen (+S9) zijn.

Tabel 12: Overzicht van het aantal revertanten (gemiddelde±SD) voor de maandstalen van Koksijde.

	m ³ luchteq. /plaat	Afwezigheid van S9				Aanwezigheid van S9			
		Revertanten				Revertanten			
		Gemiddelde	SD	IF ⁴	p ⁵	Gemiddelde	SD	IF ⁴	p ⁵
SR¹		19	4	-					
4-NQO		133,33	1,53	9,09					
2-AA						2298,67	113,51	99,94	
Blanco²		15,67	2,3	1,07		24,67	3,2	1,07	
PB³		17,3	5,1	1,06		23,7	4,2	1,03	
DMSO		14,67	2,08	1,00		23,00	4,00	1,00	
Februari	20	106,00	3,61	7,23	<0.001	80,67	5,13	3,51	<0.001
	10	70,33	9,61	4,80		51,67	4,73	2,25	
	5	50,33	8,96	3,43		42,00	7,94	1,83	
Maart	20	62,00	1,73	4,23	<0.001	58,67	1,53	2,55	<0.001
	10	51,67	13,05	3,52		44,00	1,73	1,91	
	5	31,67	7,77	2,16		36,00	8,89	1,57	
April	20	52,33	4,04	3,57	<0.001	51,67	4,16	2,25	<0.001
	10	42,00	7,00	2,86		37,67	6,11	1,64	
	5	30,00	5,57	2,05		28,67	8,14	1,25	
Mei	20	36,00	1,00	2,45	<0.001	36,67	6,66	1,59	0.052
	10	27,33	0,58	1,86		30,00	9,54	1,30	
	5	21,00	5,57	1,43		31,67	7,64	1,38	
Juni	20	38,67	6,35	2,64	<0.001	38,33	6,66	1,67	0.013
	10	31,67	4,04	2,16		36,00	9,00	1,57	
	5	19,00	1,00	1,30		30,33	4,73	1,32	

¹SR=spontane revertanten

²: Blanco=ASE extract van blanco filter

³: PB=procedure blanco

⁴:inductie factor=verhouding van het aantal revertanten t.o.v. de DMSO controle; indien IF>2 in bold weergegeven

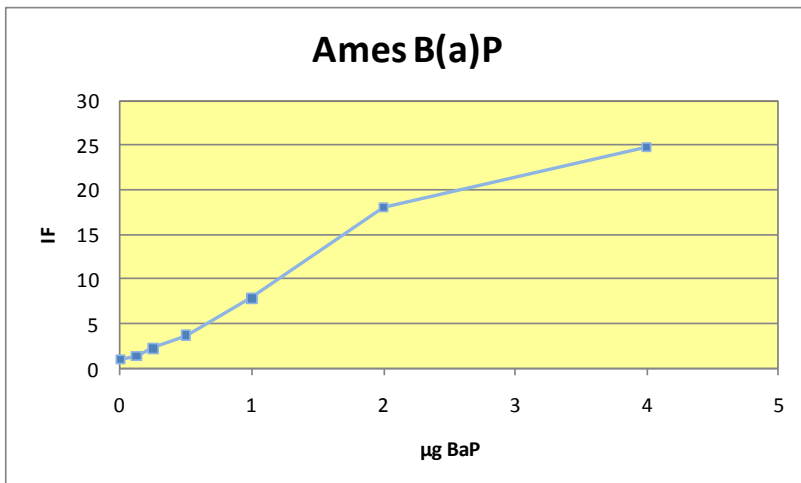
⁵:p-waarde lineaire regressie; indien p<0.05 in bold weergegeven

Tabel 13: Overzicht van het aantal revertanten (gemiddelde±SD) voor de maandstalen van Genk.

	m ³ /plaat	Afwezigheid van S9				Aanwezigheid van S9			
		Revertanten				Revertanten			
		Gemiddelde	SD	IF ⁴	p ⁵	Gemiddelde	SD	IF ⁴	p ⁵
SR¹		19,00	4,00	-					
4-NQO		133,33	1,53	9,09					
2-AA					2298,67	113,51	99,94		
PB²		17,3	5,1	1,06	23,7	4,2	1,03		
Blanco³		16,33	0,58	1,11	23,00	2,00	1,00		
DMSO		14,67	2,08	1,00	23,00	4,00	1,00		
Februari	20	158,67	7,09	10,82	<0.001	139,00	6,08	6,04	<0.001
	10	93,67	2,08	6,39		66,00	5,00	2,87	
	5	66,33	5,86	4,52		53,00	5,20	2,30	
Maart	20	98,67	5,51	6,73	<0.001	85,33	22,03	3,71	<0.001
	10	53,67	7,37	3,66		58,33	12,70	2,54	
	5	39,00	11,53	2,66		36,33	2,89	1,58	
April	20	105,33	5,03	7,18	<0.001	108,00	3,61	4,70	<0.001
	10	71,67	7,37	4,89		65,00	7,94	2,83	
	5	51,00	2,65	3,48		46,67	9,81	2,03	
Mei	20	86,67	11,37	5,91	<0.001	86,33	8,14	3,75	<0.001
	10	55,00	1,73	3,75		57,67	4,73	2,51	
	5	42,00	1,00	2,86		39,00	3,61	1,70	
Juni	20	61,33	5,69	4,18	<0.001	43,33	6,66	1,88	<0.001
	10	43,33	6,03	2,95		31,33	5,03	1,36	
	5	31,00	1,00	2,11		29,33	4,73	1,28	
Juli	20	38,33	4,16	2,61	0.0014	34,00	4,36	1,48	0.01
	10	29,67	7,77	2,02		31,00	5,00	1,35	
	5	28,33	7,51	1,93		28,33	4,62	1,23	

¹SR=spontane revertanten²:PB=procedure blanco³:Blanco=ASE extract van blanco filter⁴:inductie factor; indien IF>2 in bold weergegeven⁵:p-waarde lineaire regressie; indien p<0.05 in bold weergegeven

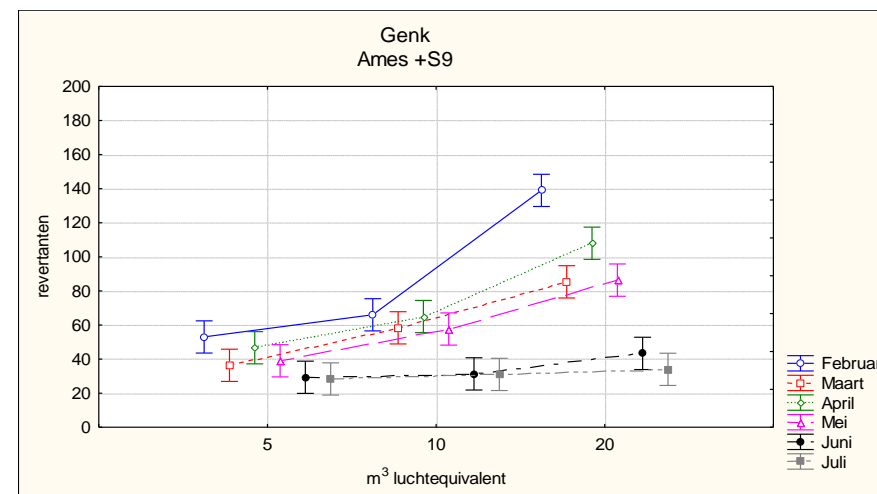
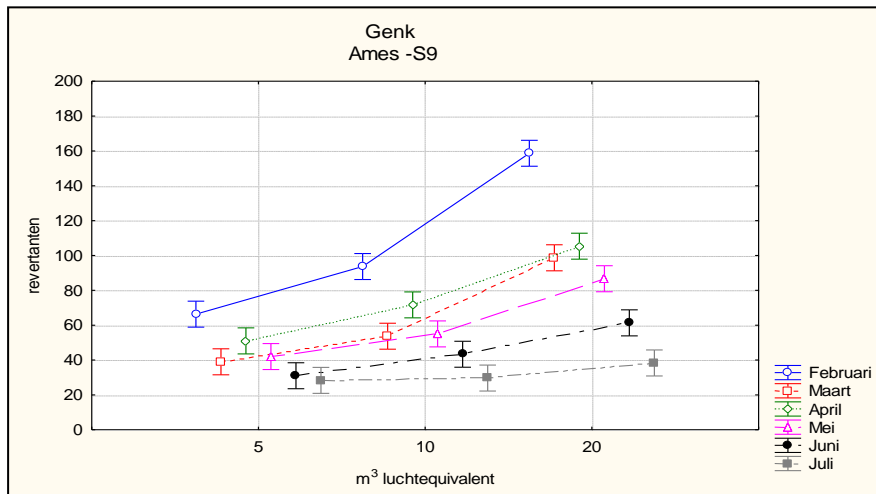
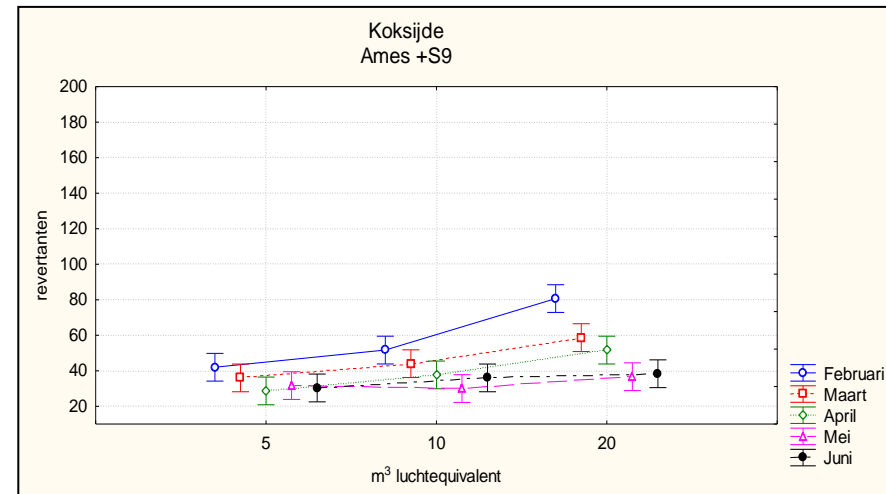
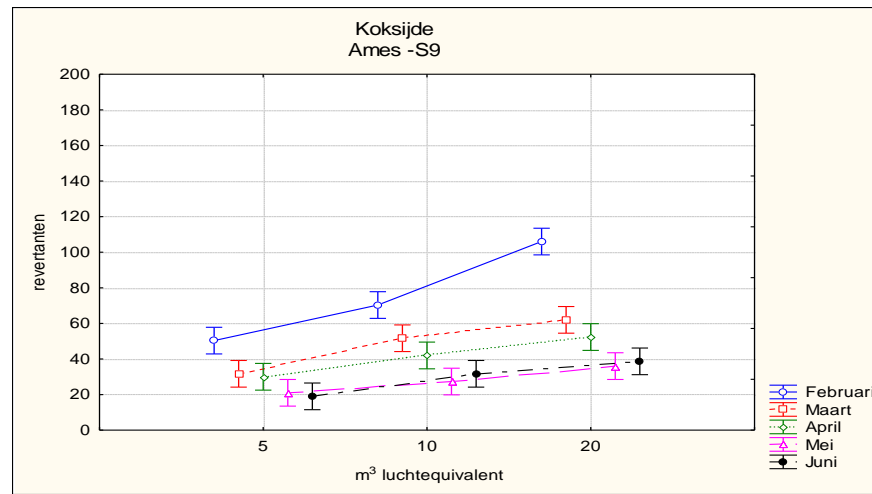
Als interne positieve controle en referentiestof werd een concentratiereeks van B(a)P getest. De IF in functie van de concentratie B(a)P wordt weergegeven in Figuur 5. Er is een significante dosisafhankelijke toename van het aantal revertanten.



Figuur 5: Concentratiereeks B(a)P in Ames test.

4.1.2. TREND IN FUNCTIE VAN DE TIJD

Wanneer de mutagene activiteit van de maandstalen bekeken wordt in functie van de tijd, zijn er significante verschillen tussen de maanden zowel voor de directe (-S9) als de indirecte (+S9) mutageniciteit (Factorial ANOVA, $p < 0.05$). Deze verschillen tussen de maanden worden gezien in beide locaties. Tabel 14: Verschillen in mutageniciteit tussen de maandstalen, Significante p-waarden (Factorial ANOVA, Tukey posthoc) zijn in bold weergegeven. Tabel 14 geeft de p-waarden van de posthoc vergelijking (Tukey HSD tes) van de maandresultaten (directe en indirecte mutageniciteit) per locatie. Het aantal revertanten (met en zonder S9) in functie van de concentratie per m^3 luchtequivalent voor de extracten van de verschillende maanden wordt grafisch weergegeven in Figuur 6. De mutagene activiteit van de extracten is het hoogst in februari, maart en april zowel voor Koksijde als voor de locatie Genk.



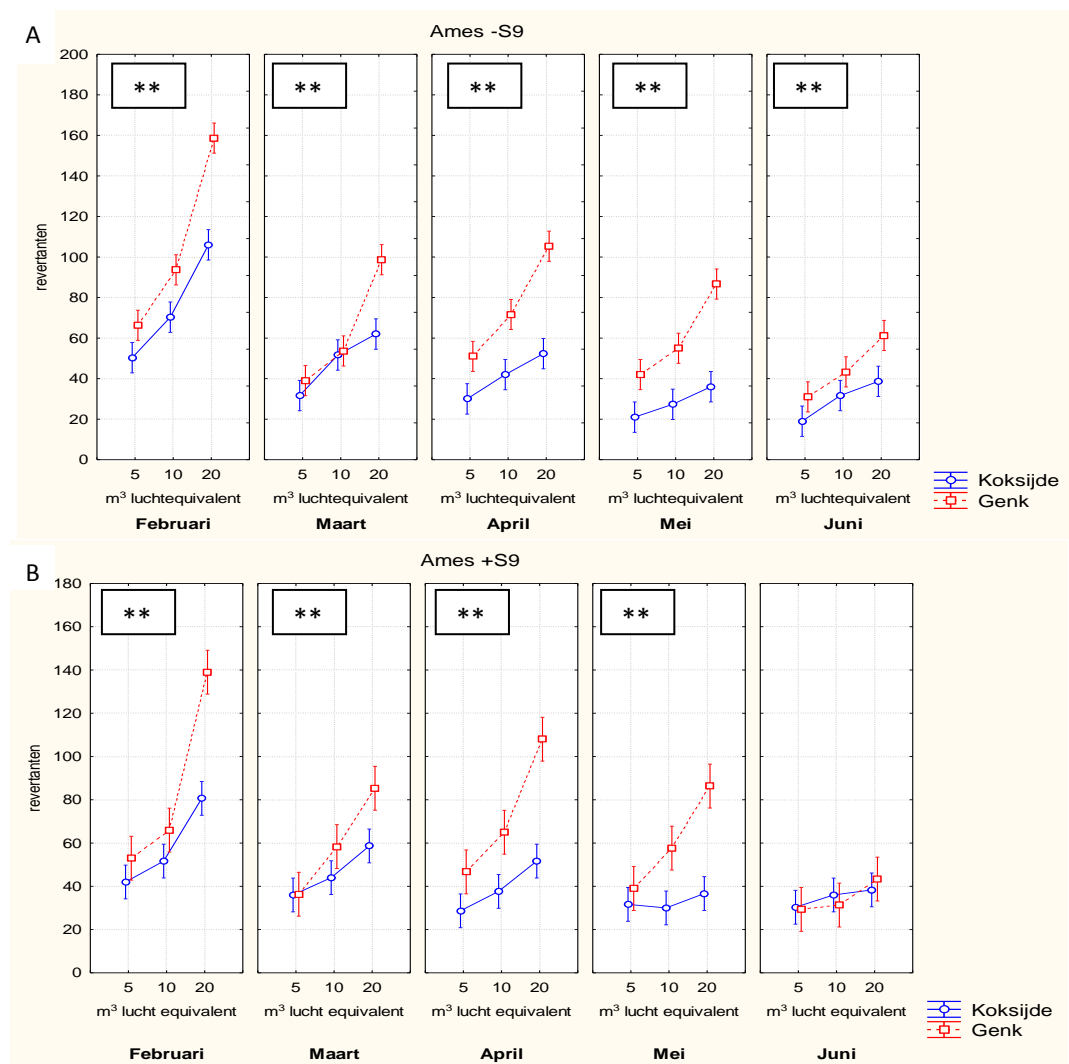
Figuur 6: Directe (-S9) en indirecte (+S9) mutageniciteit van de luchtstalen afkomstig van Koksijde en Genk in functie van de staalnamemaand (gemiddelde ± 95%CL).

Tabel 14: Verschillen in mutageniciteit tussen de maandstalen, Significante p-waarden (Factorial ANOVA, Tukey posthoc) zijn in bold weergegeven.

Koksijde -S9						
	Februari	Maart	April	Mei	Juni	Juli
Februari		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	
Maart	<0.01		0.026	<0.01	<0.01	
April	<0.01	0.026		<0.01	<0.01	
Mei	<0.01	<0.01	<0.01		0.58	
Juni	<0.01	<0.01	<0.01	0.58		
Koksijde +S9						
	Februari	Maart	April	Mei	Juni	Juli
Februari		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	
Maart	<0.01		0.035	<0.01	<0.01	
April	<0.01	0.035		0.044	0.17	
Mei	<0.01	<0.01	0.044		0.50	
Juni	<0.01	<0.01	0.17	0.50		
Genk -S9						
	Februari	Maart	April	Mei	Juni	Juli
Februari		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Maart	<0.01		<0.01	0.4	<0.01	<0.01
April	<0.01	<0.01		<0.01	<0.01	<0.01
Mei	<0.01	0.4	<0.01		<0.01	<0.01
Juni	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01		<0.01
Juli	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	
Genk +S9						
	Februari	Maart	April	Mei	Juni	Juli
Februari		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Maart	<0.01		<0.01	0.79	<0.01	<0.01
April	<0.01	<0.01		<0.01	<0.01	<0.01
Mei	<0.01	0.79	<0.01		<0.01	<0.01
Juni	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01		0.36
Juli	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.36	

4.1.3. TREND IN FUNCTIE VAN PLAATS

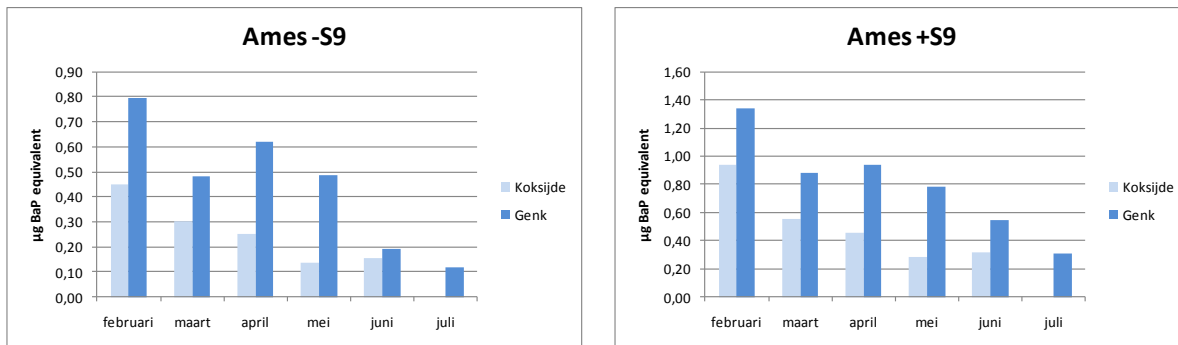
Verwacht wordt dat de extracten van filters bemonsterd in de industriële locatie Genk meer mutagene componenten bevatten dan deze van de achtergrondlocatie Koksijde en daardoor ook meer mutagene activiteit vertonen in de Ames test. De statistische vergelijking van de twee locaties bevestigd dat de directe en de indirecte mutageniciteit verhoogd is in Genk tov Koksijde (Factorial ANOVA, $p < 0.05$). Er kon ook een significante interactie aangetoond worden tussen de locatie en de tijd (maanden). Voor alle maanden met uitzondering van juni (+S9) werden er significante verschillen (Tukey post hoc, $p < 0.01$) in directe (-S9) en indirecte mutageniciteit (+S9) aangetoond tussen de extracten afkomstig van Genk en Koksijde waarbij de extracten van Genk de hoogste mutageniciteit vertoonden. De resultaten worden grafisch weergegeven in Figuur 7.



Figuur 7: Vergelijking van de directe (A) en indirecte (B) mutageniciteit van de luchtstalen afkomstig van Koksijde en Genk in functie van de maand van staalname. (gemiddelde \pm 95%CL; **: $p < 0.01$).

4.1.4. RELATIEVE TOXICOLOGISCHE POTENTIE

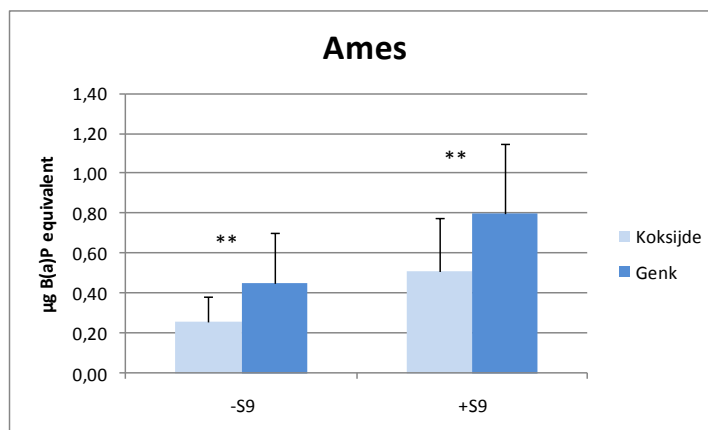
De mutagene potentie van de stalen (IF bij 20 m³ lucht equivalent) werd omgerekend naar B(a)P equivalenten op basis van de standaardreeks B(a)P in de Ames test (Figuur 5). De resultaten per maand worden weergegeven in Figuur 8.



Figuur 8: Directe en indirecte mutagene potentie van de gepoolde stalen uitgedrukt als µg B(a)P equivalenten.

In Genk varieert de berekende directe mutagene potentie tussen 0.12 en 0.80 µg B(a)P equivalenten met een gemiddelde van 0.45 ± 0.26 µg B(a)P eq terwijl de berekende indirecte mutageniciteit varieert tussen 0.31 en 1.34 µg B(a)P eq met een gemiddelde van 0.8 ± 0.35 µg B(a)P eq. Voor Koksijde is zowel de berekende directe als de indirecte mutagene potentie lager met gemiddelde van respectievelijk 0.26 ± 0.13 µg B(a)P eq en 0.51 ± 0.26 µg B(a)P eq.

Globaal genomen kan besloten worden dat de directe en de indirecte mutagene potentie van de omgevingslucht gecollecteerd in Genk significant verhoogd is in vergelijking met de omgevingslucht verzameld in Koksijde (gepaarde t-test; -S9: $p=0.0165$ en +S9: $p=0.0054$) (Figuur 9).



Figuur 9: Berekende mutagene potentie (B(a)P equivalenten) van de gepoolde maandstalen voor de locatie Koksijde en Genk (Gemiddelde en SD ; **: $p < 0.01$).

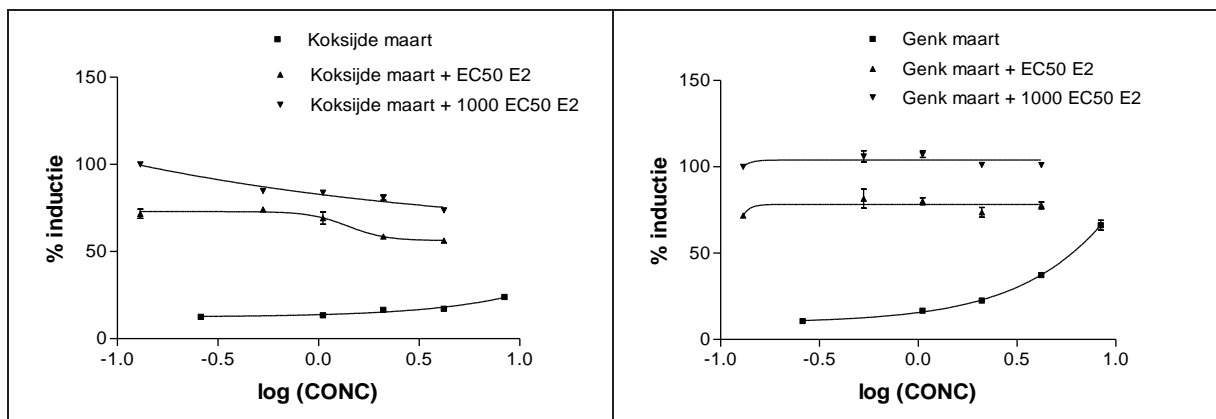
4.2. MELN ASSAY

4.2.1. RESULTATEN

Al de extracten, en filter blanco's werden een 1^{ste} keer in de prescreen assay geëvalueerd. Voorbeelden van respons curven voor een extract van respectievelijk Genk, en van Koksijde worden in Figuur 10 voorgesteld. De prescreen assay bleek geen indicatie te geven voor cytotoxiciteit, noch voor antagonistische activiteit bij geen enkele van de geteste extracten van luchtfilters of overeenkomstige filter blanco's.

De agonistische respons voor elk van de extracten in de prescreen werd per locatie en per experiment samen met de blanco samengevat in Tabel 15. Het signaal voor de blanco filters in

Genk blijft laag (ANOVA, $p > 0.05$), terwijl het extract van de filter blanco voor Koksijde een tendens voor licht agonistisch effect tonen (ANOVA, $p < 0.05$). Bij berekening bleek voor de blanco filters van Genk de activiteit in de prescreen steeds beneden de detectielimiet. De filter blanco van Koksijde in experiment prescreen 2 gaf een kwantificeerbaar signaal, nl. 1.19 pg E2-Equiv./m³. Dit werd in rekening gebracht bij de berekening van de oestrogene potentie in extracten van Koksijde die in dit experiment gemeten werden. Hoewel filters van beide locaties uit teflon (PFTE) werden gemaakt is het niet uitgesloten dat vanwege een verschillende producent van de filters de kwaliteit verschilt en er in het geval van Koksijde oestrogeen-achtige contaminanten aanwezig zijn. Dit matrixeffect werd ook vastgesteld in het Pilotproject effectgericht meten (Van Den Heuvel *et al.*, 2008). Alle extracten vertonen een significant concentratie-respons effect (ANOVA, $p < 0.05$).



Figuur 10: Voorbeeld van een testresultaat in de prescreen test, voor respectievelijk Koksijde en Genk, voor het extract van de maand maart. De respons curven zijn gemiddelde waarden \pm SD (n=3)

In een herhaalexperiment opgezet als een agonist test met MELN-cellen werden alle extracten van Genk en Koksijde en de overeenkomstige filterblanco opnieuw gemeten. De concentratie respons data worden weergegeven in Tabel 16. Voor het extract van Genk, maand juni was er niet meer voldoende materiaal om de hoogste testconcentratie te evalueren, hoewel de andere verdunningen van extract wel gemeten werden. In alle stalen kon een statistisch significant concentratie-effect vastgesteld worden (ANOVA, $p < 0.05$).

Bij de herhaalttest bleek zowel voor Genk als Koksijde de filterblanco een kwantificeerbaar signaal te geven, respectievelijk 0.11 pg E2-Equiv./m³ en 0.26 pg E2-Equiv./m³, hetgeen afgetrokken werd bij berekening voor de potentie in de extracten per locatie. De range van kwantificeerbare gegevens in een dose-respons curve kan lichtjes verschillen tussen experimenten als gevolg van de gevoeligheid van de cellen die wat kan variëren. Daarom wordt er niet met absolute signalen gerekend, maar steeds als maat van E2, nl. E2-equivalenten, hetgeen met inbegrip van biologische variatie tussen experimenten, toch een betere vergelijking tussen experimenten zal toelaten.

Tabel 15: Meetresultaten (gemiddelde en standaard deviatie, n= 3) voor alle stalen van Genk en Koksijde, verdeeld over 2 experimenten, in een opzet met prescreen. Het signaal van de concentratie responscurve , uitgedrukt als % van de SC (= 100%) wordt gegeven voor elk van de verdunningen van het PM10 extract.

Maandstaal	Luciferase activiteit (% inductie)	PM10 m ³ /ml				
		SC	1,05	2,1	4,2	8,40
Experiment prescreen 1						
Genk blanco	Gem	100,0	89,9	82,6	80,3	94,0
	SD	13,4	5,6	8,3	3,9	13,8
Genk februari*	Gem	100,0	142,0	197,7	357,7	535,3
	SD	12,3	14,4	6,1	31,5	48,6
Genk maart*	Gem	100,0	156,3	211,9	351,1	622,3
	SD	10,5	2,4	5,6	2,9	53,1
Genk mei*	Gem	100,0	155,2	183,2	273,8	549,9
	SD	29,0	10,5	17,8	22,4	110,5
Koksijde blanco*	Gem	100,0	104,0	100,6	116,8	130,5
	SD	12,4	7,79	3,08	6,28	4,19
Koksijde februari*	Gem	100,0	134,0	159,8	204,0	361,1
	SD	13,4	7,0	8,2	10,0	31,2
Koksijde maart*	Gem	100,0	106,7	131,7	136,0	189,5
	SD	7,2	9,6	7,5	3,7	6,2
Koksijde mei*	Gem	100,0	124,5	135,3	160,1	180,9
	SD	4,2	10,6	12,0	2,6	5,7
Experiment prescreen 2						
Genk blanco	Gem	100,0	100,7	99,7	105,3	110,0
	SD	4,4	8,0	11,2	4,4	7,9
Genk april*	Gem	100,0	137,1	159,4	197,9	304,9
	SD	3,8	9,4	6,1	22,0	10,0
Genk juni*	Gem	100,0	119,6	146,8	146,1	180,0
	SD	4,2	19,5	11,4	8,5	1,1
Genk juli*	Gem	100,0	133,5	134,0	158,8	172,3
	SD	2,2	13,5	7,9	13,3	3,2

Koksijde blanco*	Gem	100,0	143,9	167,5	163,1	189,4
	SD	6,1	15,75	14,54	15,33	16,14
Koksijde april*	Gem	100,0	169,4	201,4	262,3	304,6
	SD	13,2	6,55	3,36	2,19	14,51
Koksijde juni*	Gem	100,0	157,3	187,4	198,1	229,9
	SD	14,3	16,0	15,4	20,7	4,3

*: One-way ANOVA, $p < 0.05$

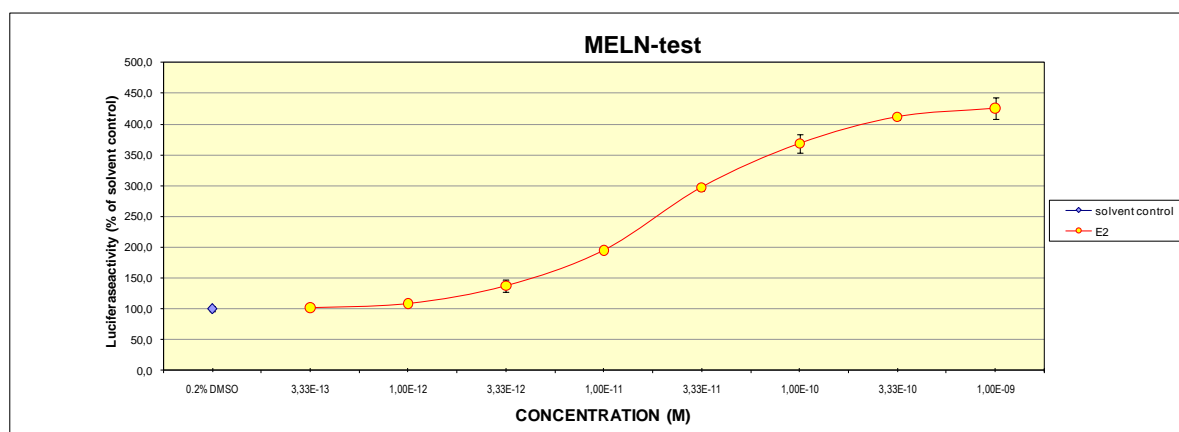
Tabel 16: Meetresultaten (gemiddelde en standaard deviatie, $n = 3$) voor alle stalen van Genk en Koksijde, in een herhaalexperiment in een opzet als agonist assay. Het signaal van de concentratie responscurve, uitgedrukt als % van de SC (= 100%) wordt gegeven voor elk van de verdunningen van het PM10 extract.

Maandstaal	Luciferas eactiviteit (% inductie)	PM10 m ³ /ml						
		SC	0,2625	0,525	1,05	2,10	4,20	8,40
Genk blanco*	Gem	100,0	99,33	97,60	110,05	114,38	127,00	137,55
	SD	6,5	8,20	9,08	5,67	8,31	3,16	9,96
Genk februari*	Gem	100,0	94,23	99,65	97,53	121,61	187,34	248,57
	SD	3,0	1,21	3,72	3,54	10,66	2,36	13,78
Genk maart*	Gem	100,0	111,33	110,36	114,16	124,17	179,40	280,03
	SD	5,5	7,11	12,21	7,14	6,92	8,60	10,76
Genk april*	Gem	100,0	110,06	116,31	138,99	152,60	194,14	258,63
	SD	1,6	5,45	3,83	4,38	10,03	8,02	9,07
Genk mei*	Gem	100,0	110,01	115,83	121,37	136,98	173,62	272,50
	SD	9,0	2,13	7,27	2,21	4,71	2,37	4,94
Genk juni*	Gem	100,0	90,31	106,54	114,84	124,85	130,75	
	SD	5,5	7,11	12,21	7,14	6,92	8,60	
Genk juli*	Gem	100,0	96,64	104,85	121,97	146,08	158,19	178,42
	SD	1,9	8,86	2,63	1,96	2,49	2,38	2,59
Koksijde blanco*	Gem	100,0	102,97	107,90	114,08	123,78	144,27	152,10
	SD	3,5	2,81	4,23	7,47	7,12	5,49	18,69

Koksijde februari*	Gem	100,0	135,39	129,48	135,00	139,50	153,11	192,39
	SD	4,6	2,78	3,20	4,20	5,76	8,22	17,98
Koksijde maart*	Gem	100,0	122,22	128,53	134,72	140,64	146,37	165,17
	SD	11,1	4,13	10,33	3,84	1,80	1,11	6,34
Koksijde april*	Gem	100,0	111,94	132,60	144,49	154,56	163,68	184,40
	SD	7,3	9,50	9,34	8,84	1,67	5,38	4,09
Koksijde mei*	Gem	100,0	120,10	123,42	134,53	147,44	161,34	173,81
	SD	9,0	2,13	7,27	2,21	4,71	2,37	4,94
Koksijde juni	Gem	100,0	113,65	121,09	141,62	150,42	158,84	180,26
	SD	2,3	11,03	4,04	7,74	6,33	6,92	23,01

*: One-way ANOVA, $p < 0.05$

Als interne positieve controle en referentiestof werd 17 β -oestradiol getest. De luciferase-inductie (% van solvent controle) in functie van de concentratie 17 β -oestradiol wordt weergegeven in Figuur 11. De luciferase-activiteit neemt toe met stijgende concentratie 17 β -oestradiol.



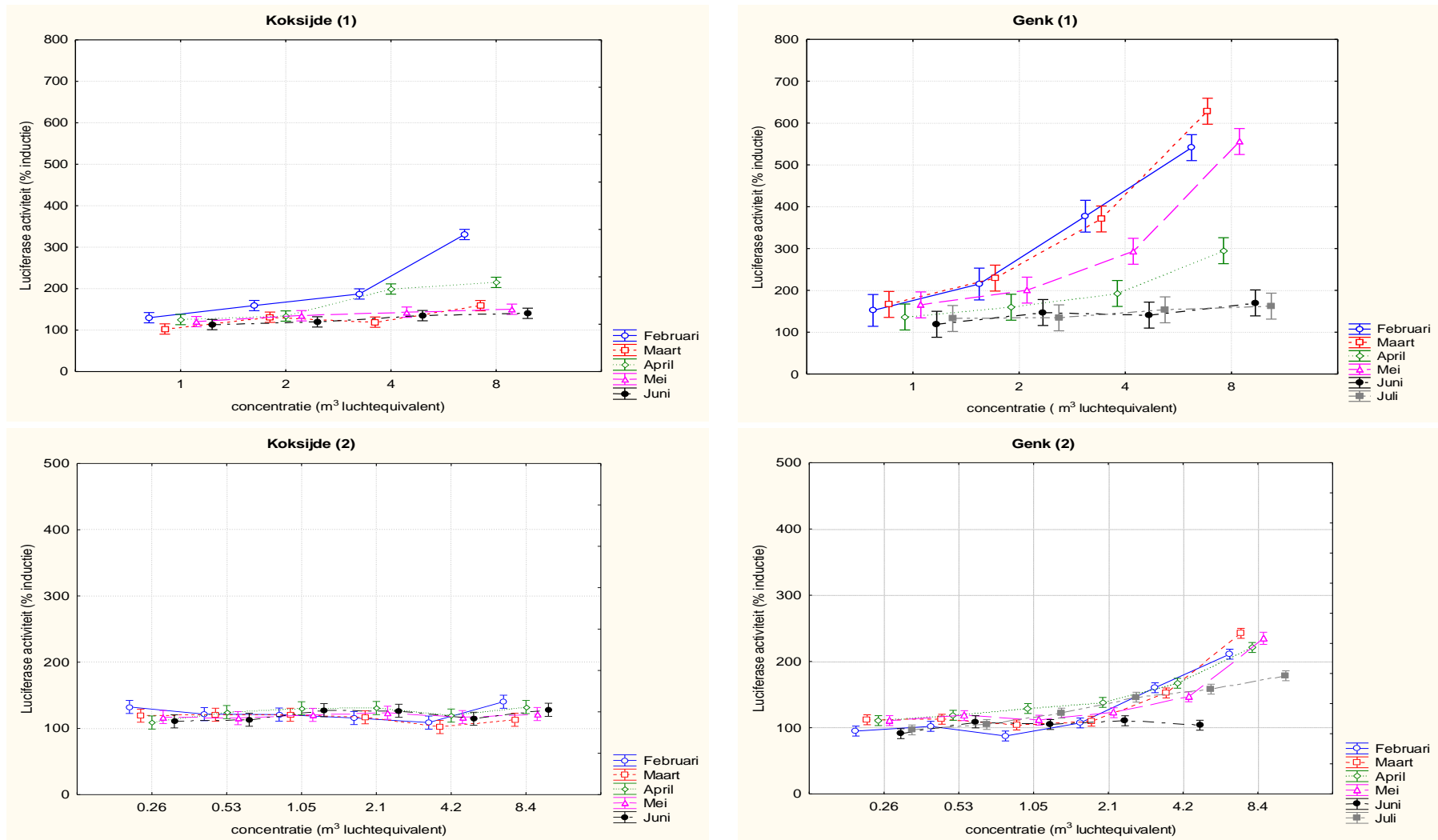
Figuur 11: ConcentratierEEKS 17 β -oestradiol in MELN-assay (gemiddelde \pm SD).

4.2.2. TREND IN FUNCTIE VAN DE TIJD

Figuur 12 toont de concentratie-respons curven van de twee uitgevoerde experimenten per maand voor elke locatie na correctie voor de respons van de blanco filter. In het prescreen experiment werd zowel in Koksijde als in Genk een significant tijdseffect vastgesteld waarbij er verschillen gevonden werden in de oestrogene potentie tussen de maanden (Factorial ANOVA, Tukey posthoc, $p < 0.05$).

In het herhaalexperiment waarin alleen de agonistische werking werd getest, werd er eveneens een significant tijdseffect vastgesteld. Voor de maandstalen afkomstig van Koksijde werd alleen een significant verschil in oestrogene respons gevonden tussen het extract van april en maart. Voor

Genk daarentegen konden meerdere significante verschillen aangetoond worden tussen de maanden. Tabel 17 geeft de p-waarden van de statistische vergelijking van de resultaten per maand.



Figuur 12: Concentratie-respons in de MELN assay van de luchtstalen afkomstig van Koksijde en Genk in functie van de stalnamemaand (gemiddelde ± 95%CL). (1) prescreen experiment (2) agonist experiment

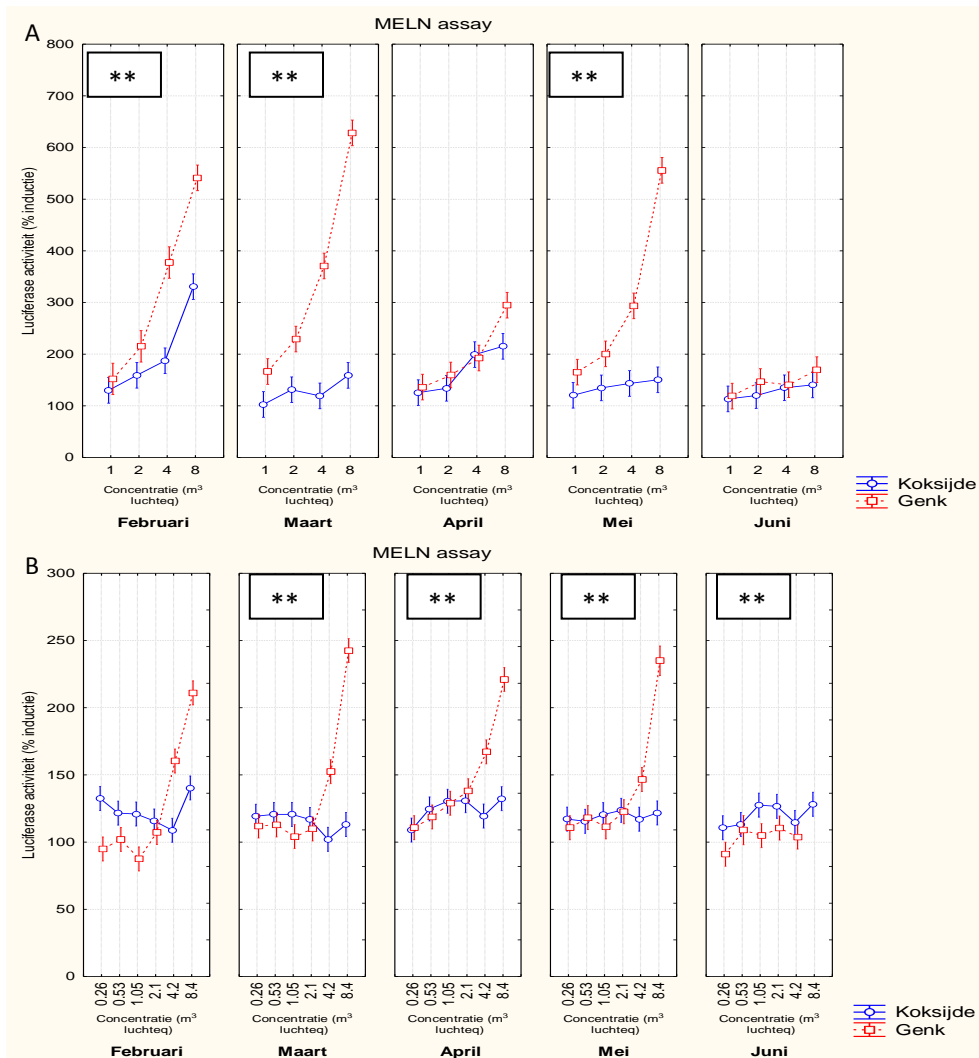
Tabel 17: Verschillen in oestrogene potentie tussen de maandstalen. Significante p-waarden (Factorial ANOVA, Tukey posthoc) zijn in bold weergegeven.

Koksijde (1)						
	Februari	Maart	April	Mei	Juni	Juli
<0.001 Februari		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	
Maart	<0.001		<0.001	0,231	0,999	
April	<0.001	<0.001		<0.001	<0.001	
Mei	<0.001	0,2312	<0.001		0,163	
Juni	<0.001	0,999	<0.001	0,163		
Genk (1)						
	Februari	Maart	April	Mei	Juni	Juli
Februari		0,999	<0.001	0,010	<0.001	<0.001
Maart	0,999		<0.001	0,002	<0.001	<0.001
April	<0.001	<0.001		<0.001	<0.001	<0.001
Mei	0,010	0,002	<0.001		<0.001	<0.001
Juni	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		0,999
Juli	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0,999	
Koksijde (2)						
	Februari	Maart	April	Mei	Juni	Juli
Februari		0,057	0,995	0,621	0,801	
Maart	0,057		0,021	0,666	0,474	
April	0,995	0,021		0,377	0,564	
Mei	0,621	0,667	0,377		0,998	
Juni	0,801	0,474	0,564	0,998		
Juli						
Genk (2)						
	Februari	Maart	April	Mei	Juni	Juli
Februari		<0.001	<0.001	0,007	<0.001	0,018
Maart	<0.001		0,003	0,538	<0.001	0,296
April	<0.001	0,003		<0.001	<0.001	<0.001
Mei	0,007	0,538	<0.001		<0.001	0,999
Juni	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		<0.001
Juli	0,018	0,296	<0.001	0,999	<0.001	

(1) prescreen experiment (2) agonist herhaalingsexperiment

4.2.3. TREND IN FUNCTIE VAN PLAATS

De respons in de MELN test werd vergeleken tussen de luchtstalen afkomstig van Genk en Koksijde zowel voor het prescreen experiment als het herhaalingsexperiment in de agonist set-up. Alleen in het prescreen experiment kon een significant hoofdeffect van plaats aangetoond worden. In beide experimenten is er een significante interactie tussen plaats en tijd (Factorial ANOVA, $p < 0.05$). Per maand konden statistisch significante verschillen aangetoond worden tussen Genk en Koksijde in beide experimenten waarbij de respons hoger was bij blootstelling aan de extracten afkomstig van luchtstalen uit Genk (Tukey posthoc, $p < 0.05$) (Figuur 13).



Figuur 13: Vergelijking van Luciferase activiteit van de luchtstalen afkomstig van Koksijde en Genk in functie van de maand van stalname. (gemiddelde 95%CL, *:p<0.05, **:p<001) A: prescreen experiment, B:herhaalexperiment in agonist set-up.

4.2.4. RELATIEVE TOXICOLOGISCHE POTENTIE

Voor beide testen (prescreen assay en agonist assay) werd voor elk van de extracten het signaal voor oestrogene potentie gekwantificeerd (pg E2-Equiv./m³). In enkele gevallen was het berekende signaal een waarde tussen de detectielimiet en kwantificatielimiet, bijv. Koksijde maart en mei in de prescreen, en Genk juni extract in agonist assay. Voor de berekening van gemiddelde potentie per gemeten extract werd in deze laatste stalen het signaal gelijkgesteld aan de kwantificatielimiet van het overeenkomstige experiment.

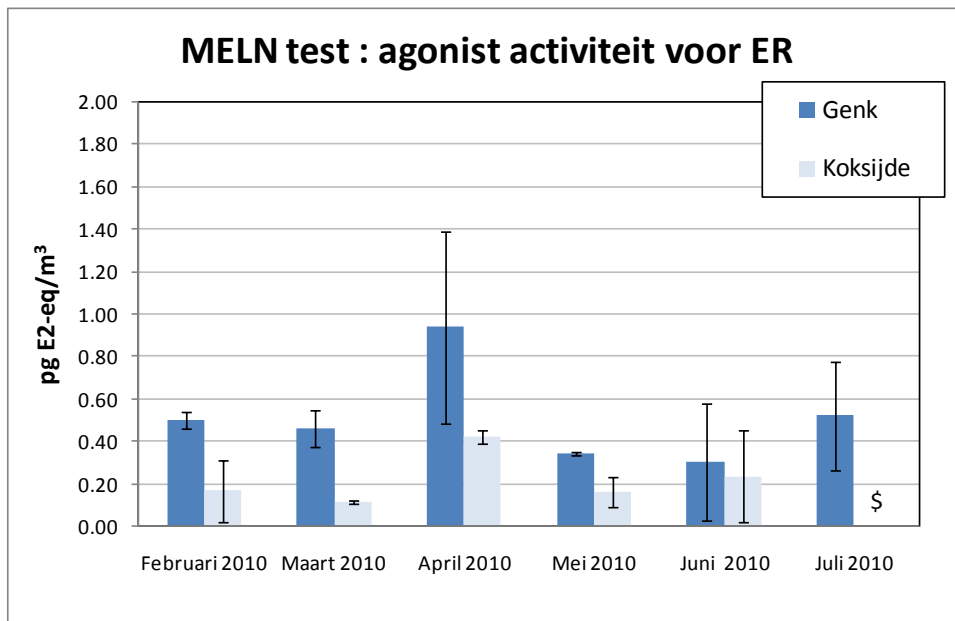
Bij de herhaalttest bleek zowel voor Genk als Koksijde de filterblanco een kwantificeerbaar signaal te geven, respectievelijk 0.11 pg E2-Equiv./m³ en 0.26 pg E2-Equiv./m³, hetgeen afgetrokken werd bij berekening voor de potentie in de extracten per locatie.

In Figuur 14 worden de gemiddelde oestrogene potentie en standaarddeviatie (n=2) voor elk van de maandstalen per locatie en per maand voorgesteld. Zowel uit de responscurven (Figuur 12), als bij berekening van de oestrogene potentie blijkt dat het signaal in Genk, voor elk van de maanden afzonderlijk steeds hoger is dan het gemeten signaal in Koksijde. Op beide locaties blijkt april het hoogste signaal qua oestrogene potentie op te leveren. Voor deze berekende gemiddelde waarden met in sommige gevallen vrij hoge SD werd geen verdere statistische analyse toegepast voor het vergelijken van E2-Equiv./m³ per maand, vanwege enerzijds het beperkt aantal datapunten, en het semi-kwantitatieve karakter van de berekende oestrogene potentie. Over de volledige meetcampagne is de gemiddelde berekende oestrogene potentie significant verhoogd in Genk tov Koksijde (Figuur 15) (Gepaarde t-test, p<0.05).

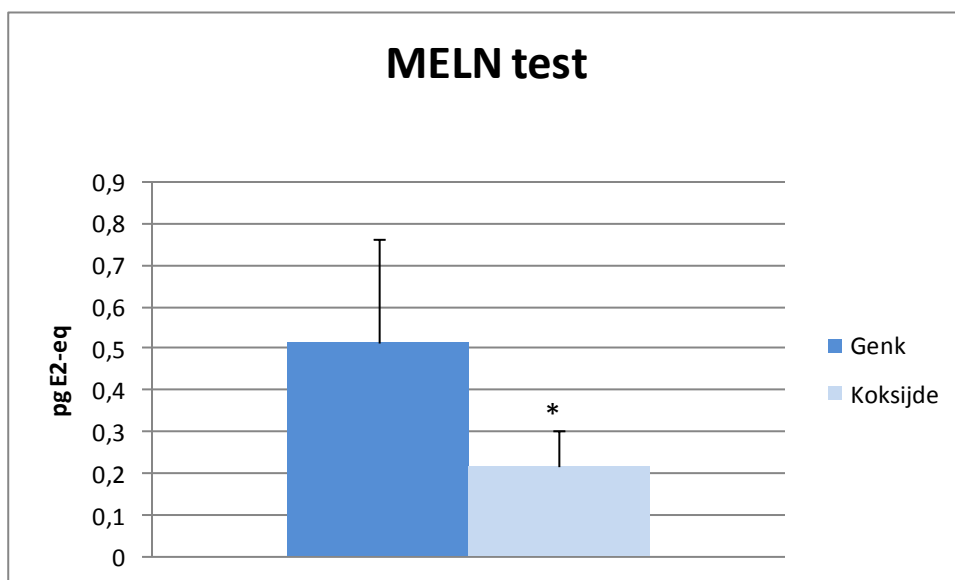
In Genk varieerde de gemiddelde oestrogene potentie tussen 0.31 en 0.94 pg E2-Equiv./m³, terwijl voor Koksijde dit lag tussen 0.11 en 0.42 pg E2-Equiv./m³. Deze resultaten zijn van dezelfde grootte orde als metingen door Wenger *et al.* (2009) die met de Er-Calux, een vergelijkbare hER-transactivatie assay, een oestrogene potentie tussen 0.07 en 1.25 pg E2-Equiv./m³ vermelden voor extracten van luchtstalen, hetgeen overeenkomt met oestrogene potentie van 2-23 ng E2-Equiv. per hoeveelheid van particulier materiaal, namelijk g PM₁. In de studie van Wenger (2009) werd de oestrogene potentie toegeschreven aan ondermeer gehydroyleerde polykoolwaterstoffen, hoewel andere potentieel oestrogene stoffen in extracten van lucht niet geïdentificeerd konden worden. De Castro *et al.* (2006) meten met de E-screen (een cel proliferatietest) dat de hoge oestrogene potentie in lucht stalen te wijten is aan meerdere PCB-congeneren. Ook kan Bisfenol A, een gekende oestrogene stof bijdragen tot de oestrogene potentie na blootstelling via de lucht (Von Goetz *et al.*, 2010). Dezelfde bevindingen werden eerder ook gevonden door Matsumoto *et al.* (2005). PM werd verzameld op glasvezelfilters en getest voor oestrogene activiteit. Het organische extract veroorzaakte proliferatie van MCF-7 cellen (humane borstkankercellijn). De aanwezigheid van Bisfenol A (range: 0.02-1.92 ng/m³) werd aangetoond in een organisch extract van de de PM fractie. dat aanwezig De studie van Kennedy *et al.* (2009) waar zowel binnenhuis als buitenhuis luchtstalen worden bemonsterd voor metingen van oestrogene en dioxine-achtige activiteit toont dat de buitenhuis oestrogene activiteit relatief minder belangrijk is t.o.v. de gemeten dioxine-achtige activiteit. Bovendien bleek de oestrogene potentie buitenhuis niet van betekenis ten opzichte van de gemeten potentie binnenhuis die varieerde tussen < 0.22 tot 185 pg E2-Equiv./m³.

We besluiten dat oestrogene activiteit aanwezig is in het organisch materiaal verzameld op de filters van zowel Genk als Koksijde. Er wordt wel nog een achtergrondsignaal gedetecteerd vanwege het gebruikte filtermateriaal, steeds Teflon voor Genk en Koksijde, maar filters afkomstig van een verschillende producent kunnen oorzaak zijn van deze verschillen per locatie. Dit matrix effect in de MELN test van de PTFE filters (ø= 150mm) voor high volume samplers werd ook vastgesteld in de pilootstudie (Van Den Heuvel *et al.*, 2008).

Ondanks deze filterachtergrond waarvoor gecorrigeerd werd, kon er supplementaire oestrogene activiteit in extracten van luchtfilters gemeten worden. Er zijn geen uitgesproken seizoensverschillen opgemerkt, hoewel er significante verschillen soms tussen verschillende maanden bleek. Globaal is het signaal in Genk consistent hoger dan in Koksijde. Welke stoffen bijdragen tot het gemeten oestrogene signaal kan slechts bepaald worden na toxiciteitsgestuurde identificatie van organische stoffen in de extracten.



Figuur 14: Berekende oestrogene potentie voor agonistische activiteit in de prescreen assay en agonist assay, voor gepoolde extracten per maand op locatie Genk en Koksijde (gemiddelde en SD (n=2); \$: geen staal ter beschikking).



Figuur 15: Gemiddelde berekende oestrogene potentie (\pm SD) van de lucht stalen uit Genk en Koksijde (*: Gepaarde t-test, $p < 0.05$).

4.3. CYTOTOXICITEIT IN BEAS-2B

4.3.1. RESULTATEN

Humane bronchiale epitheelcellen werden blootgesteld aan PM afkomstig van de gepoolde filters per maand. Met behulp van de Neutraal Rood assay wordt bepaald in hoeverre de partikels het vermogen van de cellen om zich te vermenigvuldigen beschadigen. De leefbaarheid (% van

negatieve controle) van de Beas-2B cellen in functie van de concentratie partikels wordt weergegeven in Tabel 18.

Noch de methanolextracten van de blanco filters type Teflon filter (PTFE, T38, Schleicher-Schull, $\varnothing=150\text{mm}$) (Koksijde), noch de blanco filters type Teflon filter (PTFE, Teflo, PALL Life Sciences, $\varnothing=47\text{mm}$) (Genk) vertoonden cytotoxiciteit. Er werd eerder een lichte toename van de viabiliteit waargenomen tov de negatieve controle (Tukey HSD test, $p<0.05$).

Significante veranderingen in de viabiliteit van de cellen (One-Way ANOVA, $p<0.05$) werden waargenomen voor alle stalen met uitzondering van poolstalen van april en juni uit Genk (Tabel 18). Bij de hoogst geteste PM10-concentraties ($100\ \mu\text{gPM}_{10}/\text{ml}$) werden significante cytotoxische effecten waargenomen in alle stalen met uitzondering van de poolstalen van april, juni en juli uit Genk. De gemiddelde vermindering in leefbaarheid bedraagt $24\pm 9\%$. Algemeen kan gesteld worden dat de waargenomen cytotoxiciteit vrij laag is. In de literatuur worden *in vitro* blootstellingen aan concentraties van chemische stoffen die resulteren in een celviabiliteit van $>70\%$ of $> 80\%$ beschreven als een niet-cytotoxische concentraties (Ball *et al.*, 2011; Aeby *et al.*, 2010; Carfi *et al.*, 2007).

Tabel 18: Cytotoxiciteit van PM fractie van beladen filters verzameld in Genk en Koksijde.

Maandstaal	Viabiliteit (%)	PM10 $\mu\text{g}/\text{ml}$						p-waarde ^b
		0	6,25	12,5	25	50	100	
Genk blanco	Gem ^a	100,00	113,82	106,69	115,19	107,89	121,85*	
	SD	16,13	15,17	7,79	14,84	11,34	13,89	
Genk februari	Gem	100,00	98,20	101,49	94,63	99,45	80,42*	<0.001
	SD	5,02	7,98	2,80	7,04	11,86	7,89	
Genk maart	Gem	100,00	79,96*	88,92	81,19*	83,91*	61,05*	<0.001
	SD	11,78	5,74	8,90	11,95	5,25	5,00	
Genk april	Gem	100,00	96,76	97,60	96,53	106,01	101,24	0.887
	SD	12,83	24,97	16,12	6,94	11,64	13,23	
Genk mei	Gem	100,00	102,37	101,30	103,11	98,72	94,53*	<0.001
	SD	4,12	2,23	2,60	3,26	2,62	2,06	
Genk juni	Gem	100,00	104,08	105,28	103,14	100,30	99,56	0.123
	SD	3,45	5,16	3,55	5,99	1,57	4,56	
Genk juli	Gem	100,00	106,65	114,6*0	108,22	110,62*	105,14	<0.001
	SD	6,15	8,84	4,14	3,07	8,19	2,80	
Koksijde blanco	Gem	100,00	110,56	129,82*	119,91*	119,72*	114,27*	
	SD	13,06	9,09	11,55	12,02	1,95	4,84	

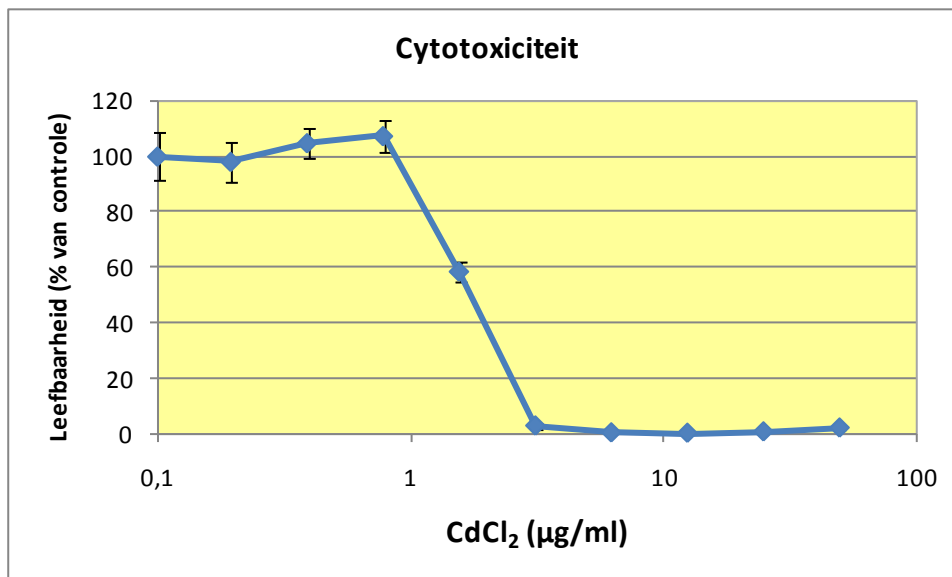
Koksijde februari	Gem	100,00	108,30	103,10	92,80	98,41	72,85*	<0.001
	SD	9,91	14,04	11,02	7,03	12,14	9,18	
Koksijde maart	Gem	100,00	98,63	82,24	103,26	89,64	74,28*	0.016
	SD	19,69	13,68	14,71	14,48	18,14	7,23	
Koksijde april	Gem	100,00	98,95	93,80	86,69	91,23	77,90*	0.024
	SD	18,88	8,93	11,42	12,13	7,10	6,53	
Koksijde mei	Gem	100,00	90,78	86,95	86,69	86,15	71,87*	0.01
	SD	14,13	12,14	11,64	7,50	11,83	11,06	
Koksijde juni	Gem	100,00	103,80	85,58*	101,42	85,52*	73,17*	<0.001
	SD	8,31	9,85	5,64	8,44	3,20	13,86	

*: significant verschillend van negatieve controle (Tukey HSD test, $p < 0.05$)

^a: gemiddelde

^b: One-Way ANOVA

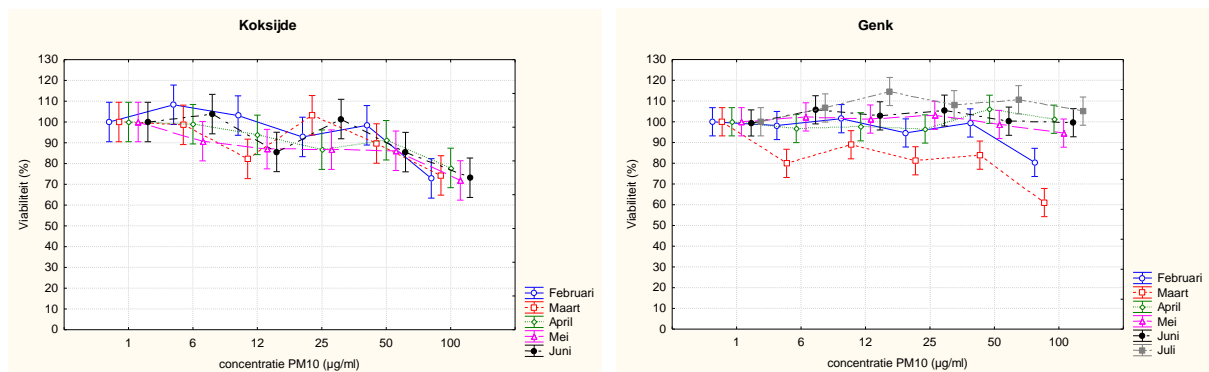
De cytotoxiciteit van CdCl_2 als referentiestof werd getest. De concentratie-effect curve wordt weergegeven in Figuur 16. Een concentratieafhankelijke daling van de leefbaarheid van de bronchiale epitheelcellen kon worden vastgesteld.



Figuur 16: Concentratierieks CdCl_2 in cytotox test (gemiddelde \pm SD).

4.3.2. TREND IN FUNCTIE VAN DE TIJD

Voor beide locaties kon een significant tijdseffect van het cytotoxisch potentieel van PM10 aangetoond worden (Factorial ANOVA, $p < 0.05$). In Koksijde is er alleen een significant verschil tussen februari en mei (Tukey test, $p < 0.05$). Voor de locatie Genk konden er meerdere significante verschillen in cytotoxiciteit aangetoond worden tussen de maanden waarbij o.a. de cytotoxiciteit van PM10 geïncubeerd in februari en maart verhoogd was. De vergelijking van de cytotoxiciteit tussen de maanden wordt grafisch weergegeven in Figuur 17. Tabel 19 geeft een overzicht van de statistisch verkregen p-waarden wanneer de verschillende maanden met elkaar worden vergeleken (Factorial ANOVA, Tukey post hoc).



Figuur 17: Cytotoxiciteit van PM10 afkomstig van Koksijde (A) en Genk (B) in functie van de maand van staalname (gemiddelde \pm 95%CL).

Tabel 19: Verschillen in cytotoxiciteit tussen de maandstalen, Significante p-waarden (Factorial ANOVA, Tukey post hoc) zijn in bold weergegeven.

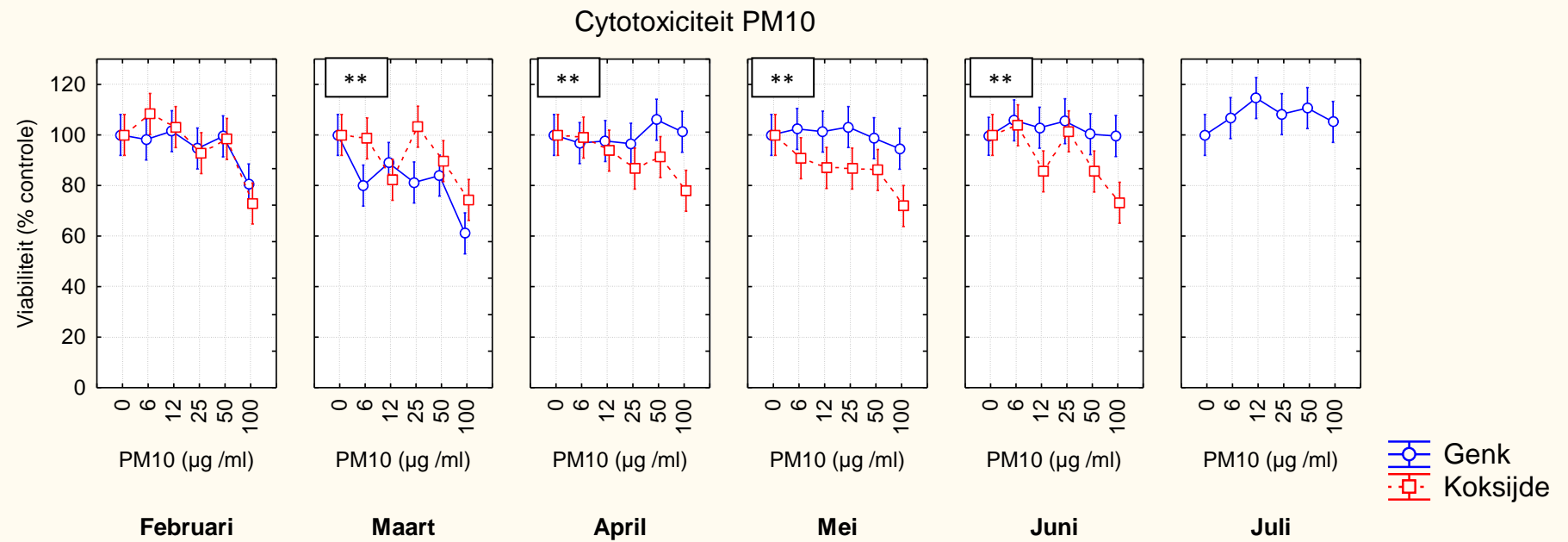
Koksijde						
	Februari	Maart	April	Mei	Juni	Juli
Februari		0.10	0.11	0.0012	0.12	
Maart	0.10		0.97	0.13	0.93	
April	0.10	0.97		0.12	0.95	
Mei	0.0012	0.12	0.11		0.10	
Juni	0.12	0.93	0.95	0.11		
Genk						
	Februari	Maart	April	Mei	Juni	Juli
Februari		<0.001	0.046	0.032	0.002	<0.001
Maart	<0.001		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
April	0.046	<0.001		0.87	0.24	<0.001
Mei	0.032	<0.001	0.87		0.30	<0.001
Juni	0.002	<0.001	0.24	0.30		0.006
Juli	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.006	

4.3.3. TREND IN FUNCTIE VAN PLAATS

Er werd nagegaan of er verschillen konden vastgesteld worden in cytotoxiciteit van PM10 verzameld in Koksijde en Genk. De statistische analyse toont een significant verschil tussen Genk en Koksijde waarbij werd het schadelijk karakter van de partikels verhoogd was in Koksijde ten opzichte van Genk (Factorial ANOVA, $p < 0.05$). Er kon eveneens een significante interactie tussen

plaats en tijd vastgesteld worden. Voor de maanden maart, april, mei en juni werden significante verschillen ($p < 0.01$) gevonden tussen Genk en Koksijde. De resultaten worden grafisch voorgesteld in Figuur 18.

Naast een verschil in pollutiebelasting van de PM₁₀ fractie zou het licht verhoogde signaal in Koksijde te wijten kunnen zijn aan een andere ionensamenstelling van de zeelucht in vergelijking met de lucht in het binnenland. De resultaten van het Chemkar PM₁₀ project (VMM, 2009) bevestigen deze hypothese. Tijdens het Chemkar PM₁₀ project werd op 6 meetplaatsen van VMM in Vlaanderen een chemische karakterisatie van fijn stof (PM₁₀) uitgevoerd. Qua geografische ligging kan de meetpost Houtem vergeleken worden met Koksijde in de huidige studie. In het Chemkar project vertoonde Houtem voor zeezout (Na⁺, Cl⁻ en Mg²⁺) de hoogste concentratie. Ook de lage concentratie van bodemstof (Al, Si, Ti, Ca, Fe, Mn en K) was eveneens opmerkelijk. In het pilootproject effectgerichte metingen (Van Den Heuvel *et al.*, 2008) werd aangetoond dat cytotoxiciteit gecorreleerd was met de aanwezigheid van bodemelementen in de bemonsterde lucht.

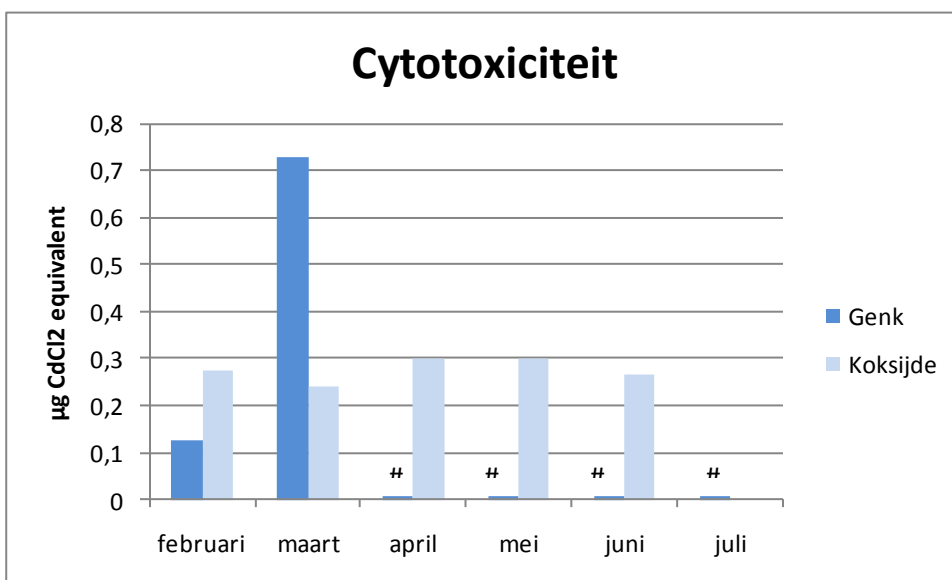


Figuur 18: Vergelijking van de cytotoxiciteit van PM10 afkomstig van Koksijde en Genk in functie van de maand van stalname. (gemiddelde \pm 95%CL; **: $p < 0.01$).

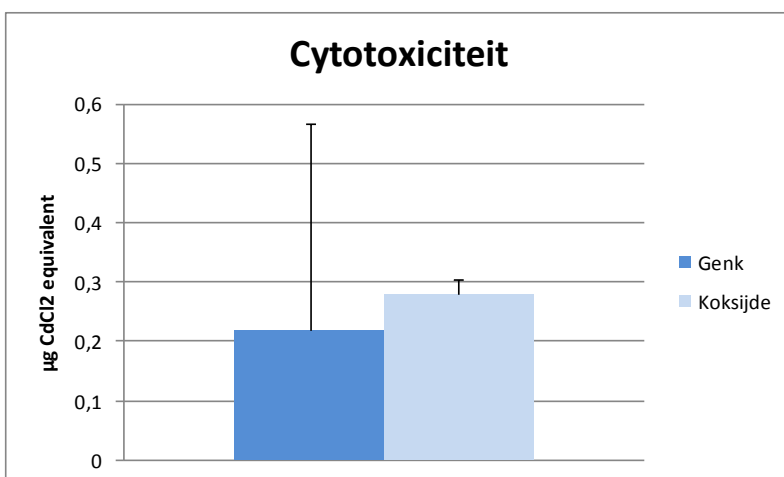
4.3.4. RELATIEVE TOXICOLOGISCHE POTENTIE

Het schadelijk karakter van de partikels bij blootstelling van Beas-2B cellen aan 100 µg PM10 werd berekend als µg CdCl₂ equivalenten (Figuur 19). Voor Koksijde was er weinig variatie tussen de maanden (0.24-0.30 µg CdCl₂ equivalenten). In Genk daarentegen werd alleen in de maanden februari en maart een hogere cytotoxische potentie (respectievelijk 0.13 en 0.73 µg CdCl₂ equivalenten) gemeten.

Globaal genomen kan gesteld worden dat de gebruikte concentraties PM10 weinig algemene toxiciteit vertonen en er geen statistisch verschil is tussen Genk en Koksijde (gepaarde t-test, $p=0.39$) (Figuur 20).



Figuur 19: Berekend cytotoxisch karakter (µg CdCl₂ equivalenten) van PM10 verzameld in Koksijde en Genk (#: <LOD).



Figuur 20: Gemiddelde cytotoxische potentie (µg CdCl₂ equivalenten) van PM10 verzameld in Koksijde en Genk.

4.4. PRODUCTIE VAN INFLAMMATOIRE CYTOKINES

4.4.1. RESULTATEN

Na 24h blootstelling van de Beas-2B cellen aan een concentratiereeks van PM10 werden in het supernatans de inflammatoire cytokines il-6 en il-8 gemeten.

Er werd een significant positieve correlatie aangetoond tussen de productie van il-6 en il-8 door Beas-2B na blootstelling aan PM10 (Spearman correlatiecoëfficiënt $r = 0.92$, $p < 0.001$, $n = 11$).

→ Interleukine-6

Tabel 20 geeft voor elk maandstaal uit Genk en Koksijde de productie van il-6 weer in functie van de PM10-blootstellingsconcentratie.

Noch de methanol-extracten van de blanco filters type Teflon filter $\varnothing = 150$ mm (PTFE, T38, Schleicher-Schull) (Koksijde), noch de blanco filters type Teflon filter $\varnothing = 47$ mm (PTFE, PALL Life Sciences) (Genk) gaven na blootstelling van Beas-2B cellen een verandering in il-6 productie t.o.v. negatieve controle (One-way-ANOVA, $p > 0.05$).

Een significante concentratie-effect relatie werd vastgesteld voor de maandstalen van Genk waarbij de productie van il-6 toeneemt bij stijgende concentratie PM10 (One-way ANOVA, $p < 0.05$). Na blootstelling van Beas-2B cellen aan PM10 afkomstig van Koksijde kon alleen voor het maandstaal van juni een significante verhoging van de il-6 inductie worden aangetoond (One-way ANOVA, $p = 0.025$).

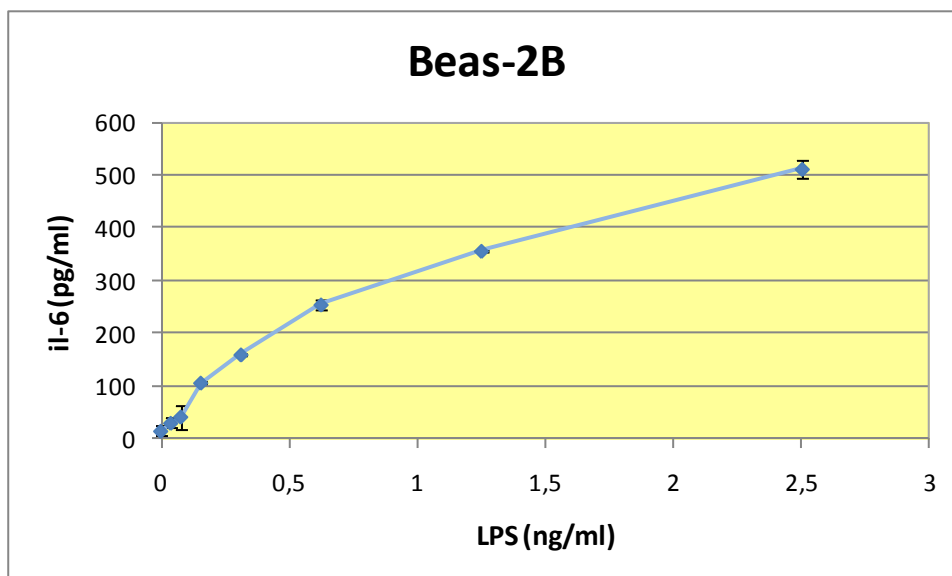
Tabel 20: Productie van interleukine-6 in functie van PM10 concentratie.

IL-6		PM $\mu\text{g/ml}$					
pg/ml		0	6,25	12,5	25	50	100
Genk	gemiddelde	9,56	8,21	10,75	9,56	9,23	8,21
Blanco	SD	0,24	0,24	2,87	1,67	0,24	0,24
Genk	gemiddelde	7,88	8,05	9,56	14,48	16,36	18,59
Februari*	SD	0,24	0,48	0,24	1,93	0,73	0,00
Genk	gemiddelde	9,39	7,37	8,05	9,56	18,24	21,69
Maart*	SD	0,95	1,43	0,48	0,72	0,49	0,49
Genk	gemiddelde	11,42	12,27	15,85	24,98	33,58	49,23
April*	SD	0,96	0,24	0,48	0,74	1,50	0,26
Genk	gemiddelde	11,25	9,39	12,27	17,39	27,95	35,53
Mei*	SD	0,24	0,48	1,20	0,73	0,00	1,76
Genk	gemiddelde	7,64	9,53	23,91	32,88	74,99	77,92
Juni*	SD	0,80	0,27	3,29	0,00	2,96	1,19
Genk	gemiddelde	6,32	17,74	20,43	33,27	57,66	77,71
Juli*	SD	0,00	3,80	2,18	1,67	2,88	0,30
Koksijde	gemiddelde	8,40	6,13	7,45	5,94	6,32	5,94
Blanco	SD	1,34	1,34	1,07	0,53	0,00	0,53
Koksijde	gemiddelde	8,40	4,62	4,05	4,05	4,81	5,94

Februari	SD	1,34	1,87	0,00	0,53	0,53	0,53
Koksijde	gemiddelde	12,58	5,75	5,94	3,68	3,68	5,18
Maart	SD	0,81	0,80	0,53	0,53	0,53	1,60
Koksijde	gemiddelde	9,69	5,88	6,74	6,92	7,44	6,40
April	SD	2,21	0,24	0,49	0,24	0,49	0,00
Koksijde	gemiddelde	7,78	6,92	4,67	5,71	5,71	4,33
Mei	SD	0,98	0,73	0,00	0,00	0,98	0,00
Koksijde	gemiddelde	8,48	6,05	5,71	6,05	12,48	13,00
Juni*	SD	1,96	0,98	0,49	0,00	4,20	0,00

*One-way ANOVA, $p < 0.05$

Het endotoxine LPS werd meegenomen als referentiestof in de inflammatie-test. De il-6 productie na blootstelling van Beas-2B aan een concentratiereeks LPS wordt weergegeven in Figuur 21. De il-6 productie neemt toe met stijgende concentratie LPS.



Figuur 21: Concentratiereeks LPS en il-6 productie door Beas-2B cellen. (gemiddelde \pm SD)

→ Interleukine-8

Tabel 21 geeft voor elk maandstaal uit Genk en Koksijde de productie van il-8 weer in functie van de PM10 blootstellingsconcentratie.

De methanol-extracten van de blanco filters gaven na blootstelling van Beas-2B cellen geen verandering in il-8 productie t.o.v. negatieve controle (One-way-ANOVA, $p > 0.05$).

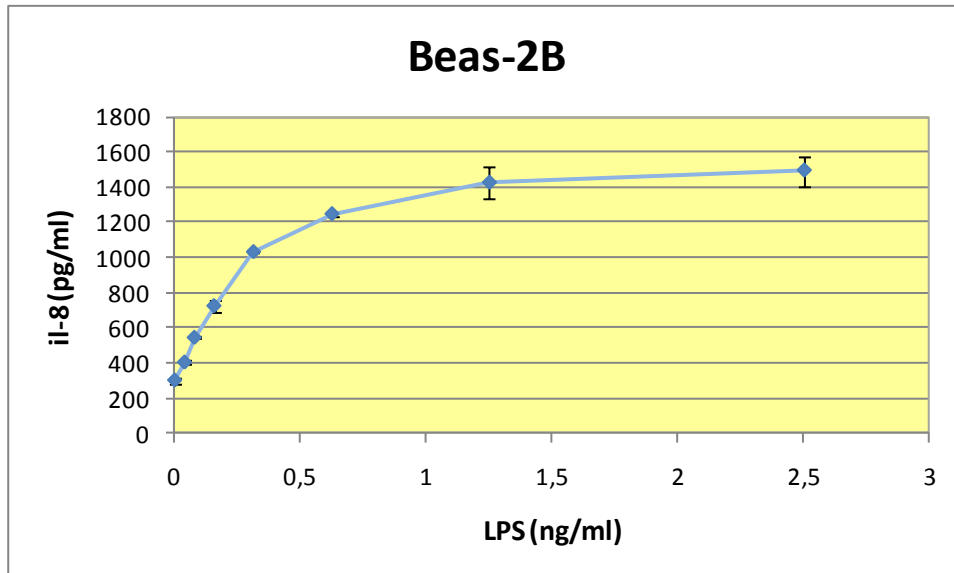
Alle maandstalen uit Genk met uitzondering van februari vertonen een significant concentratie-effect tussen il-8 productie en de PM10 blootstellingsconcentratie (One-way ANOVA, $p < 0.001$). De il-8 productie in Beas-2B cellen na blootstelling aan PM10 afkomstig van bemonsterde lucht in Koksijde liggen onder de waarde van de negatieve controle (0 μg PM10).

Tabel 21: Productie van interleukine-8 in functie van PM concentratie

IL-8		PM µg/ml					
pg/ml		0	6,25	12,5	25	50	100
Genk	gemiddelde	238,46	206,72	201,00	210,52	213,80	212,58
Blanco	SD	6,76	9,59	11,97	8,12	0,93	15,45
Genk	gemiddelde	251,64	143,36	156,53	186,50	197,41	218,33
Februari	SD	17,21	1,46	4,07	2,49	7,27	7,75
Genk	gemiddelde	223,96	140,38	142,42	163,97	223,45	282,21
Maart*	SD	12,65	2,59	0,56	5,35	16,46	0,98
Genk	gemiddelde	217,38	155,82	183,12	207,17	302,73	502,06
April*	SD	11,02	2,63	14,09	6,42	12,35	3,29
Genk	gemiddelde	201,65	140,76	143,38	178,41	242,27	323,43
Mei*	SD	10,80	10,19	0,25	3,58	0,41	10,78
Genk	gemiddelde	248,82	207,69	242,85	303,52	515,45	674,22
Juni*	SD	0,76	7,96	8,56	11,57	6,53	6,26
Genk	gemiddelde	204,82	241,96	246,12	325,51	463,79	649,55
Juli*	SD	3,04	8,22	2,04	2,78	14,41	13,40
Koksijde	gemiddelde	203,34	203,64	203,31	229,30	234,80	238,43
Blanco	SD	1,44	3,87	5,83	3,14	3,79	31,99
Koksijde	gemiddelde	190,33	131,41	122,94	125,49	107,63	126,97
Februari	SD	13,85	0,71	5,80	5,55	5,67	7,76
Koksijde	gemiddelde	221,08	144,75	127,80	129,33	128,15	135,40
Maart	SD	8,45	16,84	0,56	9,30	4,49	2,19
Koksijde	gemiddelde	257,13	166,72	161,51	135,69	177,47	214,55
April	SD	0,11	8,41	3,10	4,32	2,90	43,38
Koksijde	gemiddelde	215,80	162,15	170,88	134,28	177,79	183,06
Mei	SD	11,67	12,44	0,06	5,48	10,97	7,09
Koksijde	gemiddelde	204,74	156,94	132,03	185,65	216,11	227,47
Juni	SD	4,26	2,54	6,30	14,77	2,65	0,66

*One-way ANOVA, $p < 0.05$

De il-8 productie na blootstelling van Beas-2B aan het endotoxine LPS wordt weergegeven in Figuur 22. LPS induceert de productie van il-8 in Beas-2B cellen. Er is een concentratieafhankelijke toename van il-8.



Figuur 22: Concentratierreeks LPS en il-8 productie door Beas-2B cellen. (gemiddelde \pm SD)

4.4.2. TREND IN FUNCTIE VAN DE TIJD

→ Productie van interleukine-6

Il-6 productie in functie van de PM10 concentratie wordt voor elke maand weergegeven in Figuur 23. Voor beide locaties is er significant hoofdeffect van tijd (factorial ANOVA, $p < 0.05$).

In Genk werden er significante verschillen in il-6 productie waargenomen tussen de maanden waarbij de hoogste inflammatoire potentie werd gemeten in juni, gevolgd door mei, april, maart en februari (Tukey posthoc) (Tabel 22).

Il-6 productie door PM10 afkomstig van bemonsterde lucht in Koksijde is vergelijkbaar voor alle maanden (Tabel 22). Alhoewel PM10 verzameld in de maand juni een significant hogere inflammatoire potentie vertoont in vergelijking met de andere maanden (Tukey posthoc, $p < 0.001$).

Over de volledige staalnameperiode heen is de inflammatoire potentie het hoogst in de zomermaanden (juni en juli) en het laagst in de wintermaanden (februari en maart).

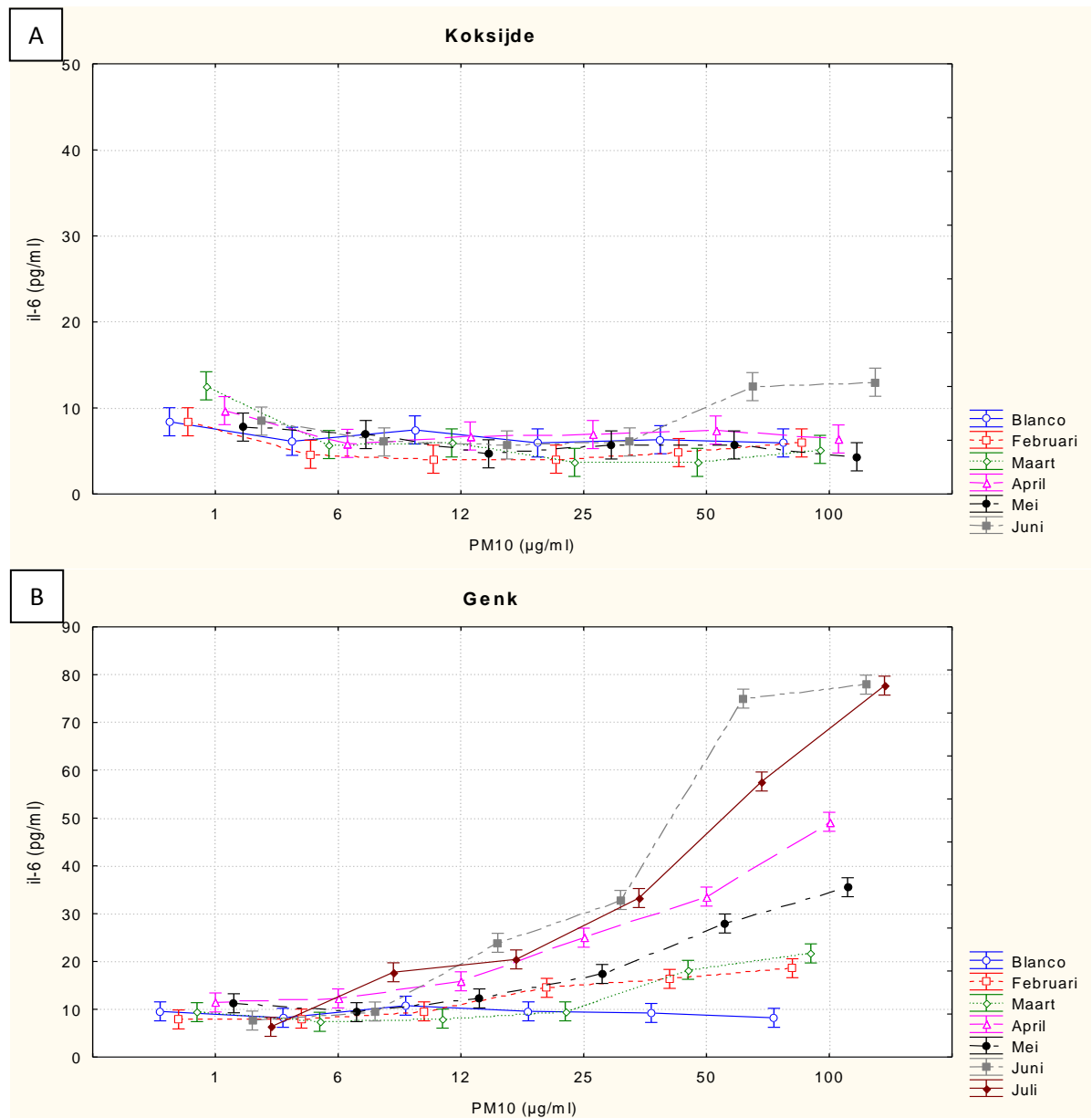
Of deze verschillen kunnen verklaard worden door de chemische belading van de partikels wordt verder bekeken in HOOFDSTUK 5.

Een recente studie waarbij geïsoleerde macrofagen van ratten in cultuur werden gebracht en werden blootgesteld aan PM-stalen verzameld in Amsterdam, Lodz, Oslo en Rome toont een sterkste inflammatoire respons (interleukine-6 en tumor necrosis factor α) voor stalen verzameld tijdens de lente en de zomer, de seizoenen met de hoogste prevalentie van allergenen (Hetland *et al.*, 2005). Deze hogere inflammatoire respons is mogelijks ook te verklaren door chemische reacties die geïnduceerd worden door UV.

Seizoensvariatie in zowel bronchiale hyperresponsiviteit welke een merker is voor luchtweginflammatie en luchtwegfunctie als in NO in ademlucht (FENO), een niet-invasieve biomarker die wordt gebruikt als maat voor luchtweginflammatie, in allergische patiënten is gekend en wordt geassocieerd met de aanwezigheid van allergenen in de lucht waarbij vooral de

link wordt gelegd met het pollenseizoen (Taggart *et al.*, 1996; Tilles and Bardana, 1997; Vahkvist *et al.*, 2006).

Over het effect van luchtvervuiling en de weeromstandigheden (oa temperatuur, vochtigheid) op potentiële allergenen is nog maar weinig gekend (D'Amato *et al.*, 2010).



Figuur 23: IL-6 productie na blootstelling van Beas-2B aan PM10 afkomstig van Koksijde (A) en Genk (B) in functie van de maand van staalname (gemiddelde \pm 95%CL).

Tabel 22: Verschillen in il-6 inductie tussen de maandstalen (Factorial ANOVA; significante p-waarden (Factorial ANOVA) zijn in bold weergegeven).

Koksijde						
	Februari	Maart	April	Mei	Juni	Juli
Februari		0.066	<0.001	0.253	<0.001	
Maart	0.066		0.031	0.548	<0.001	
April	<0.001	0.031		0.007	0.003	
Mei	0.253	0.548	0.007		<0.001	
Juni	<0.001	<0.001	0.004	<0.001		
Genk						
	Februari	Maart	April	Mei	Juni	Juli
Februari		0.86	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Maart	0.86		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
April	<0.001	<0.001		<0.001	<0.001	<0.001
Mei	<0.001	<0.001	<0.001		<0.001	<0.001
Juni	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		<0.001
Juli	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

→ **Productie van interleukine-8**

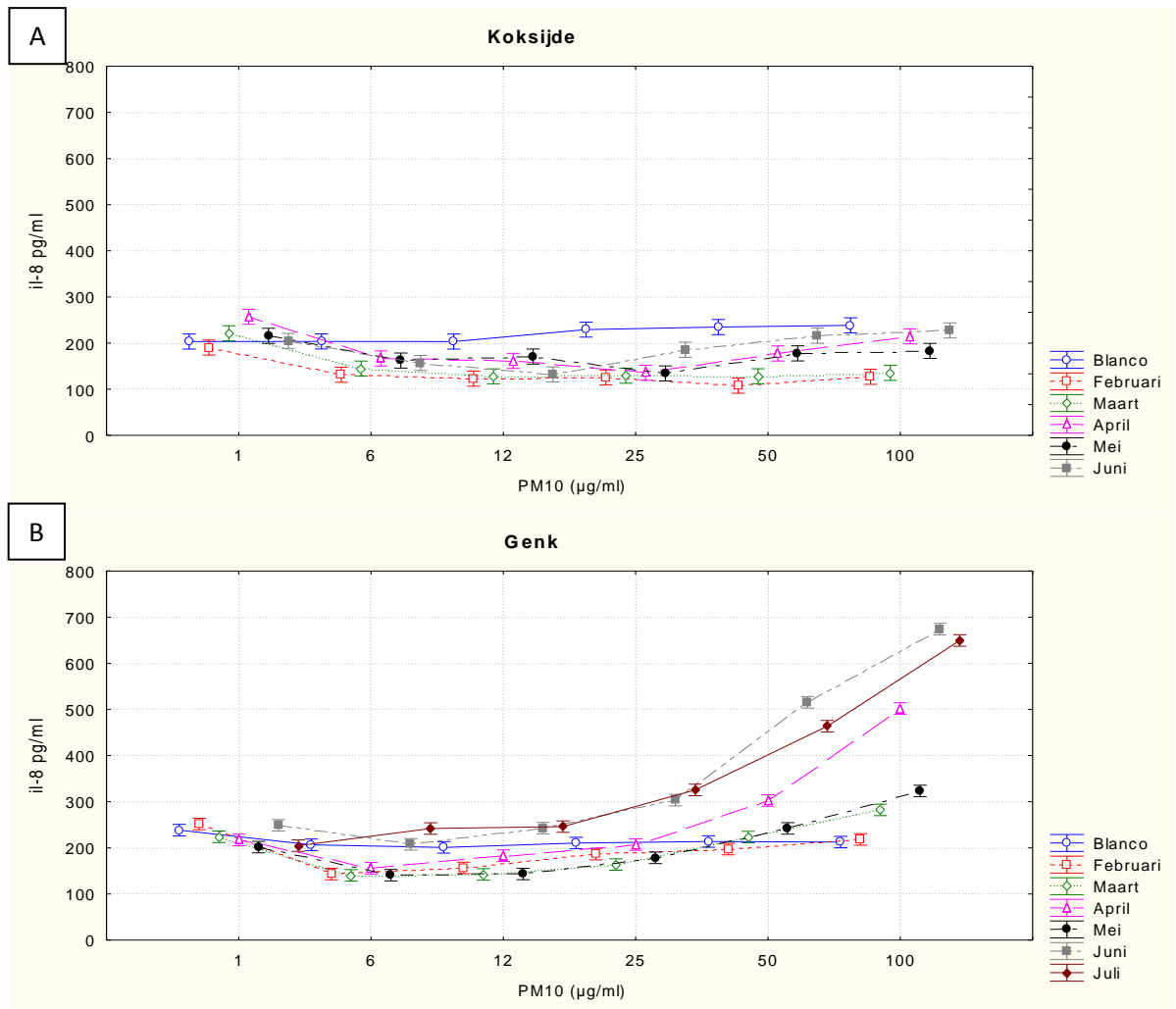
Il-8 productie in functie van de PM10-concentratie wordt voor elke maand weergegeven in Figuur 24.

Alle stalen uit Genk vertonen een significante positieve relatie tussen il-8 productie en de PM10 blootstellingsconcentratie (One-way ANOVA, $p < 0.001$). Voor Genk werd een significant effect van tijd vastgesteld (Factorial ANOVA, $p < 0.05$). Er werden significante verschillen waargenomen tussen de maanden waarbij de hoogste inflammatoire potentie werd gemeten in juli, juni en april (Tukey posthoc, $p < 0.05$) (Tabel 23).

De il-8 productie in Beas-2B cellen na blootstelling aan PM10 afkomstig van bemonsterde lucht in Koksijde lagen onder de waarde van de negatieve controle (0 μg PM10).

Over de volledige staalnameperiode heen is de inflammatoire potentie het hoogst in de zomermaanden (juni en juli) en het laagst in de wintermaanden (februari en maart).

Of deze verschillen kunnen verklaard worden door de chemische belading van de partikels wordt verder bekeken in HOOFDSTUK 5.



Figuur 24: IL-8 productie na blootstelling van Beas-2B aan PM10 afkomstig van Koksijde (A) en Genk (B) in functie van de maand van staalname (gemiddelde \pm 95%CL).

Tabel 23: Verschillen in IL-8 inductie tussen de maandstalen. Significante p-waarden (Factorial ANOVA) zijn in bold weergegeven.

Genk						
	Februari	Maart	April	Mei	Juni	Juli
Februari		0.30	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Maart	0.30		<0.001	0.016	<0.001	<0.001
April	<0.001	<0.001		<0.001	<0.001	<0.001
Mei	<0.001	0.016	<0.001		<0.001	<0.001
Juni	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		<0.001
Juli	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

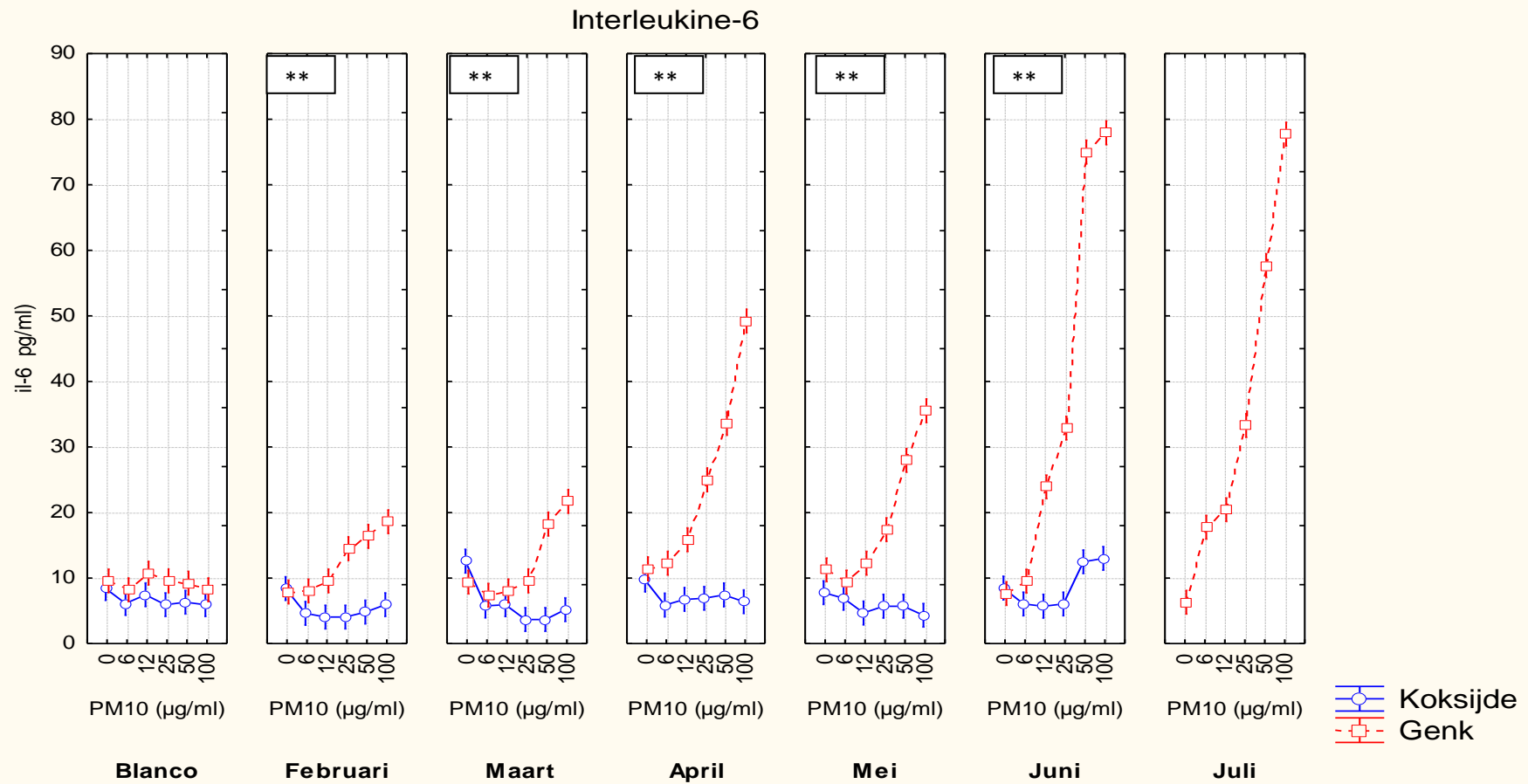
4.4.3. TREND IN FUNCTIE VAN PLAATS

→ Productie van interleukine-6

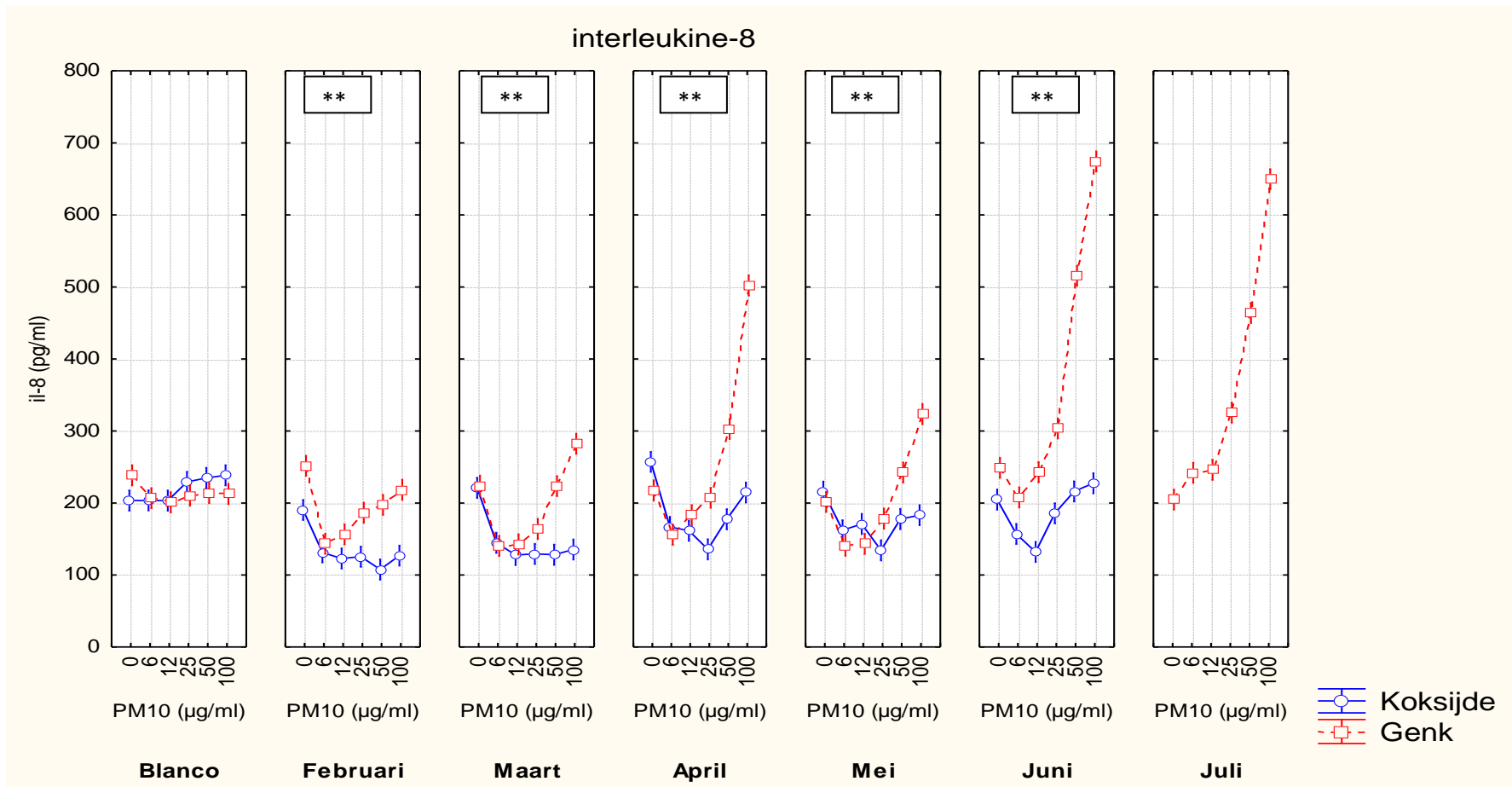
De il-6 inductie door PM10 afkomstig van Genk is significant verhoogd in vergelijking met Koksijde (Factorial ANOVA, $p < 0.05$). Er kon eveneens een significante interactie tussen plaats en tijd worden aangetoond. De locatieverschillen werden waargenomen voor alle maanden (Tukey posthoc, $p < 0.05$) (Figuur 25).

→ Productie van interleukine-8

De il-8 inductie door PM10 afkomstig van Genk is significant verhoogd in vergelijking met Koksijde (Factorial ANOVA, $p < 0.05$). Er kon eveneens een significante interactie tussen plaats en tijd worden aangetoond. Deze verschillen werden waargenomen voor alle maanden (Tukey posthoc, $p < 0.05$) (Figuur 26).



Figuur 25: Vergelijking van il-6 productie tussen Koksijde en Genk in functie van de maand van stalname. (gemiddelde ± 95%CL; **: p<0.01).



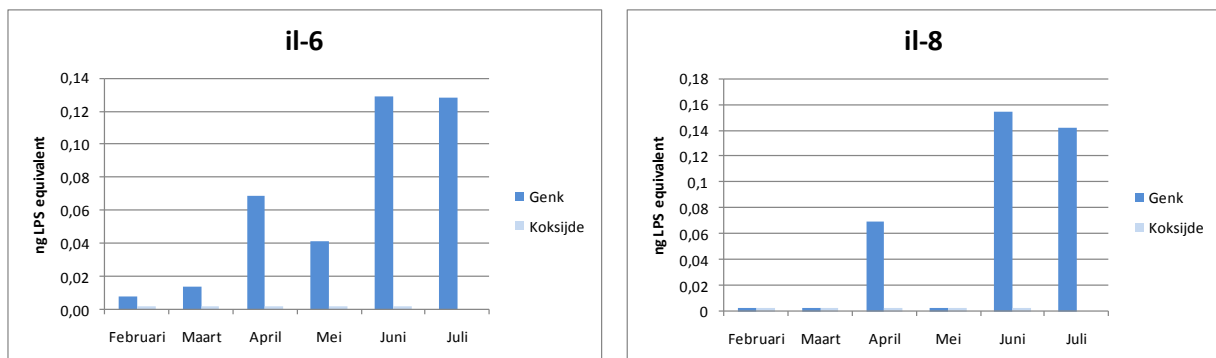
Figuur 26: Vergelijking van il-8 productie tussen Koksijde en Genk in functie van de maand van stalname. (gemiddelde ± 95%CL; **: p < 0.01).

4.4.4. RELATIEVE TOXICOLOGISCHE POTENTIE

Voor elk van de geteste stalen werd de gemeten cytokine productie na blootstelling aan 100 µg PM10 berekend als inflammatoire potentie uitgedrukt als ng LPS equivalenten (Figuur 27).

Voor alle luchtstalen uit Koksijde lag de cytokine inductie te laag om een inflammatoire potentie te berekenen met behulp van de standaardcurve van LPS.

Op basis van de geïnduceerde il-6 en il-8 bedroeg de gemiddelde inflammatoire potentie (± SD) van de PM10 verzameld in Genk respectievelijk 0.065 ± 0.05 ng LPS equivalenten en 0.05 ± 0.09 ng LPS equivalenten. Ondanks de grote variatie tussen de maanden was de inflammatoire potentie van de PM10 uit Genk significant verhoogd tov Koksijde (gepaarde t-test, $p=0.03$).



Figuur 27: Berekende inflammatoire potentie (ng LPS equivalenten) van PM10 verzameld in Koksijde en Genk.

4.5. ENDOTOXINE BEPALING

De aanwezigheid van endotoxine werd nagegaan in het partikel extract bij de hoogste blootstellingconcentratie van 100 µg PM10/ml. Endotoxine concentraties boven de detectielimiet (0.1 EU/ml) werden gemeten in de gepoolde stalen van juni en juli uit Genk (respectievelijk 0.15 en 0.25 EU/ml) en het staal van de maand juni uit Koksijde (0.13 EU/ml). De resultaten worden weergegeven in Tabel 24.

Tabel 24: Endotoxine in de partikel fractie.

	Endotoxine (EU/ml)	
	gemiddelde	SD
Genk Blanco	< DL*	
Genk Februari	< DL	
Genk Maart	< DL	
Genk April	< DL	
Genk Mei	< DL	
Genk Juni	0,181	0,009
Genk Juli	0,248	0,024
Koksijde Blanco	< DL	
Koksijde Februari	< DL	

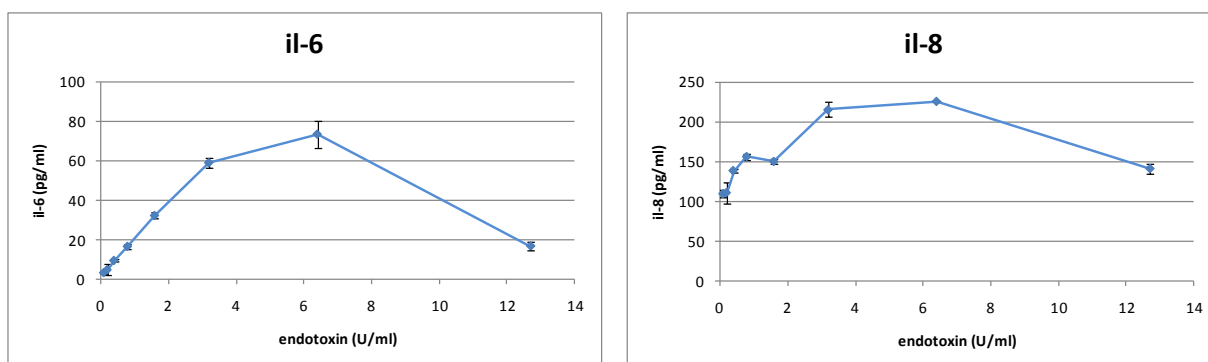
Koksijde Maart	< DL	
Koksijde April	< DL	
Koksijde Mei	< DL	
Koksijde Juni	0,134	0,001

*DL: detectielimiet

Er zijn weinig gegevens bekend over de achtergrondwaarden van endotoxines in omgevingslucht. In een studie van Madsen (2006) werden in 53 luchtstalen uit verschillende Deense locaties endotoxines gemeten. De hoogste meetwaarden werden genoteerd in de maanden april en mei. De mediaan van het endotoxine niveau bedroeg 0.33 EU/m³. Als de resultaten van de huidige studie worden omgerekend bekomen we 0.053 EU/m³ voor Genk en 0.033 EU/m³ voor Koksijde. De bemonstering van de lucht was verschillend voor beide studies maar de analyse methode (LAL test) was dezelfde.

Om uitsluitsel te kunnen geven of deze gemeten endotoxineconcentraties aanleiding kunnen geven tot de gemeten il-6 en il-8 inducties van de luchtstalen werden Beas-2B cellen blootgesteld aan een concentratiereeks van endotoxine (0.1; 0.2; 0.4; 0.8; 1.6; 3.2; 6.4 en 12.7 U/ml). Vervolgens werden il-6 en il-8 gemeten in het supernatans. De resultaten worden weergegeven in Figuur 28.

De gemeten endotoxineconcentraties in de luchtstalen geven il-6 en il-8 inducties die lager liggen dan de gemeten cytokineproductie in de negatieve controle culturen (0 µg PM10) na blootstelling van Beas-2B aan PM10 verzameld in Koksijde en Genk. De aanwezigheid van endotoxine in de bemonsterde lucht kan de inflammatoire potentie van de PM10 stalen niet verklaren. Een verklaring moet eerder gezocht worden in de chemische samenstelling van de partikels (zie HOOFDSTUK 5).



Figuur 28: Il-6 en il-8 productie door Beas-2B cellen in functie van de endotoxine concentratie.

4.6. RADICAALGENEREREND VERMOGEN

4.6.1. RESULTATEN

De metingen van het radicaalgenererend vermogen van fijn stof, uitgedrukt in arbitraire eenheden per m³ bemonsterde lucht, zijn weergegeven in Tabel 25. De ruwe data werden gecorrigeerd voor de grootte van de filters om een vergelijking mogelijk te maken.

In Genk varieerde het radicaalgenererend vermogen van het fijn stof verzameld de dag voor de onderzoeksdag van de HBM-studie tussen 644 en 2701 (n=10). In Koksijde werd het radicaalgenererend vermogen bepaald van elke luchtstaal dat werd verzameld in functie van de gepoolde maandstalen (n=43) en varieerden de waarden tussen 122 en 707.

Tabel 25: Radicaalgenererend vermogen van de fijn stof luchtstalen van Genk en Koksijde (/m³ bemonsterde lucht): ruwe data en na correctie voor filtergrootte.

Genk				Koksijde			
Datum	Filter	Ruwe data	Gecorrigeerd voor filtergrootte	Datum	Filter	Ruwe data	Gecorrigeerd voor filtergrootte
15/01/2010	G21	40516	2701	1/02/2010	K1	20911	232
17/01/2010	G23	25749	1073	4/02/2010	K2	43982	489
31/01/2010	G28	27445	1144	7/02/2010	K3	40326	448
7/02/2010	G220	45308	1888	10/02/2010	K4	22872	254
10/03/2010	G2265	45885	1912	13/02/2010	K5	45988	511
11/04/2010	G2302	15448	644	16/02/2010	K6	57594	640
14/04/2010	G2305	30113	1803	19/02/2010	K7	34135	379
25/04/2010	G2310	31994	1333	22/02/2010	K8	24999	278
28/04/2010	G2311	29189	1216	25/02/2010	K9	21981	244
30/06/2010	G2425	29856	1244	28/02/2010	K10	15045	167
				3/03/2010	K11	38959	433
				6/03/2010	K12	16735	186
				9/03/2010	K13	31757	353
				12/03/2010	K14	51434	571
				16/03/2010	K15	30240	336
				19/03/2010	K16	38723	430
				22/03/2010	K17	26801	298
				25/03/2010	K18	41273	459
				28/03/2010	K19	20215	225
				31/03/2010	K20	18411	205
				3/04/2010	K21	11014	122
				6/04/2010	K22	14411	160
				9/04/2010	K23	41385	460
				12/04/2010	K24	29246	325
				15/04/2010	K25	41140	457
				18/04/2010	K26	52409	582
				21/04/2010	K27	15173	169
				24/04/2010	K28	36217	402
				29/04/2010	K29	53935	599
				2/05/2010	K30	15939	177
				5/05/2010	K31	25050	278
				8/05/2010	K32	18885	210
				11/05/2010	K33	17438	194
				14/05/2010	K34	24326	270
				17/05/2010	K35	27219	302
				8/06/2010	K36	44701	497
				11/06/2010	K37	27681	308
				14/06/2010	K38	37900	421
				17/06/2010	K39	28803	320
				20/06/2010	K40	14689	163

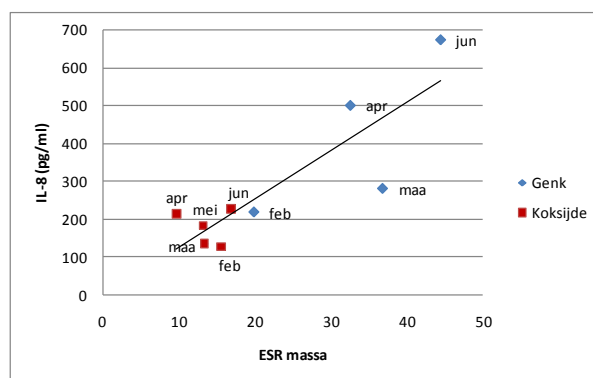
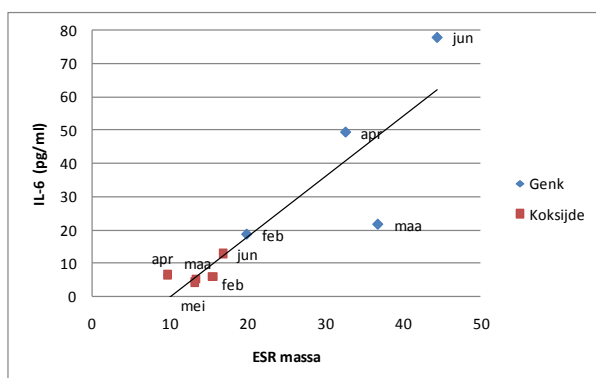
	23/06/2010	K41	63673	707
	26/06/2010	K42	48688	541
	29/06/2010	K43	32268	359

Oxidatieve stress werd geschat met behulp van een niet-biologische test, namelijk het meten van het radicaalgenererend vermogen van fijn stof in de luchtstalen, uitgedrukt in arbitraire eenheden per m³ bemonsterde lucht.

Ondanks het beperkt aantal datapunten kon er een sterk significante positieve associatie aangetoond worden tussen het radicaal genererend vermogen van PM10 en de inflammatoire potentie van de partikels (Tabel 26, Figuur 29).

Tabel 26: Associatie tussen radicaalgenererend vermogen (ESR) van PM10 en il-6 en il-8 inductie in Beas-2B. (Spearman's rank correlatiecoëfficiënt, p-waarde en aantal gegevens (n))

Radicaalgenererend vermogen (ESR massa)	Immunotoxiciteit					
	Il-6(Beas-2B)			Il-8(Beas-2B)		
	r	p	n	r	p	n
	0,88	0,002	9	0,80	0,010	9



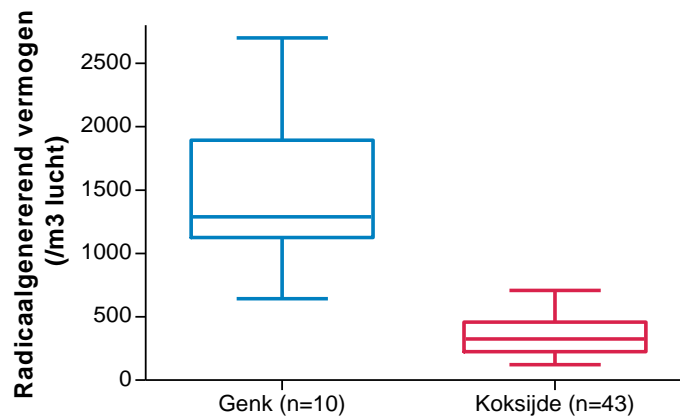
Figuur 29: Radicaalgenererend vermogen (ESR) in relatie tot il-6 en il-8 productie in Beas-2B (Spearman correlatie).

4.6.2. TREND IN FUNCTIE VAN DE TIJD

Tijdens de studieperiode (januari-juni) werd er geen associatie gevonden tussen het radicaal genererend vermogen en de kalendertijd zowel voor Genk als Koksijde.

4.6.3. TREND IN FUNCTIE VAN PLAATS

Een vergelijking van het radicaalgenererend vermogen van de luchtstalen van Genk (10 dagen) en Koksijde (43 dagen) is weergegeven in Figuur 30. Het radicaalgenererend vermogen is significant hoger voor Genk (gemiddelde = 1495.7, SD = 584.2) dan voor Koksijde (gemiddelde = 352.6, SD = 149.1) (T-test en Mann–Whitney U test, p<0.0001).



Figuur 30: Boxplot met radicaalgenererend vermogen (per m³ bemonsterde lucht) van de luchtstalen van Genk en Koksijde (mediaan, minimum en maximum, 1^e en 3^{de} kwartiel)

4.7. TOXICOLOGISCH PROFIEL VAN GENK EN KOKSIJDE

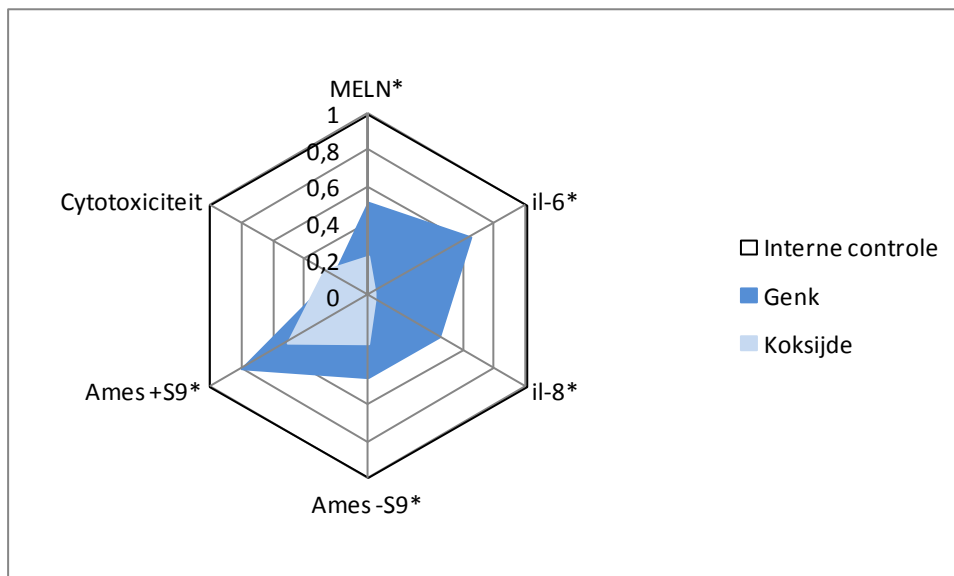
De gevolgde strategie waarbij gelijktijdig op een referentielocatie en op een blootstellinglocatie gecombineerde stalen werden verzameld, laat toe om op basis van de gemeten eindpunten voor elke locatie een toxicologisch profiel op te stellen. Voor de statistische verwerking van de resultaten van deze meetstrategie waarbij zowel rekening wordt gehouden met de geteste PM10 concentratie (μg) of m³ lucht en de tijdsfactor (gepaarde stalen) werd gebruik gemaakt van een Repeated measures ANOVA. Deze statistische benadering toont aan dat er een significante verhoging is van de mutagene, inflammatoire en oestrogene potentie van fijn stof afkomstig van Genk in vergelijking met Koksijde ($p < 0.05$).

Door gebruik te maken van een interne controle (referentiestof) voor elk gemeten eindpunt, kan het waargenomen effect van het luchtstaal omgerekend worden naar een relatieve toxische eenheid (RTE) of relatieve potentie factor (Van Klaveren *et al.*, 2006). Het concept waarbij de potentie van een stof om een bepaald effect te induceren relatief ten opzichte van elkaar wordt uitgedrukt wordt internationaal toegepast voor het bepalen van mengseltoxiciteit (EPA, 2001; Van den berg *et al.*, 2006). De meest toxische verbinding in de groep wordt als relatieve maat genomen (en op 1 gesteld). De toxiciteit van de andere verbindingen kan als fractie van de meest toxische worden uitgedrukt. Hiervoor worden toxiciteit equivalentie factoren (TEFs) gebruikt. Op dit moment worden TEFs vooral gebruikt voor de somtoxiciteit van dioxines en PCBs die op dezelfde receptor als dioxine aangrijpen. Voor elke *in vitro* test werd voor de interne controlestof een concentratie vastgelegd die dient als referentie voor de gemeten toxiciteit van de luchtstalen. De gemiddelde berekende toxische respons per locatie weergegeven als equivalent van de referentiestof (vb pg E2-equivalenten) werd uitgedrukt als fractie van de vastgelegde concentratie van de referentiestof (Tabel 27). Met behulp van deze waarden kan het toxicologisch profiel van de hotspot en het controle gebied op eenvoudige manier grafisch worden voorgesteld (Figuur 31).

Tabel 27: Relatieve toxische eenheid (RTE) van de bemonsterd lucht uit Genk en Koksijde.

	Referentie concentratie interne controle	RTE	
		Genk	Koksijde
MELN	1 µg E2	0,52	0,22
il-6	0,1 ng LPS	0,65	0.04*
il-8	0,1 ng LPS	0,45	0.04*
Ames -S9	1 µg BaP	0,45	0,26
Ames +S9	1 µg BaP	0,80	0,51
Cytotoxiciteit	1 µg Cd Cl2	0,22	0,28

*Detectielimiet



Figuur 31: Grafische voorstelling van het toxicologisch profiel van Genk en Koksijde. (* significante verschillen tussen Genk en Koksijde)

Door in de toekomst dezelfde interne controle stof mee te nemen bij effectgerichte metingen, kan de luchtkwaliteit op verschillende plaatsen beter vergeleken worden en kunnen evoluties in de tijd opgevolgd worden.

HOOFDSTUK 5. RELATIE EFFECTGERICHT METEN EN POLLUENTEN EN METEO

5.1. CHEMISCHE KARAKTERISTIEKEN VAN FIJN STOF

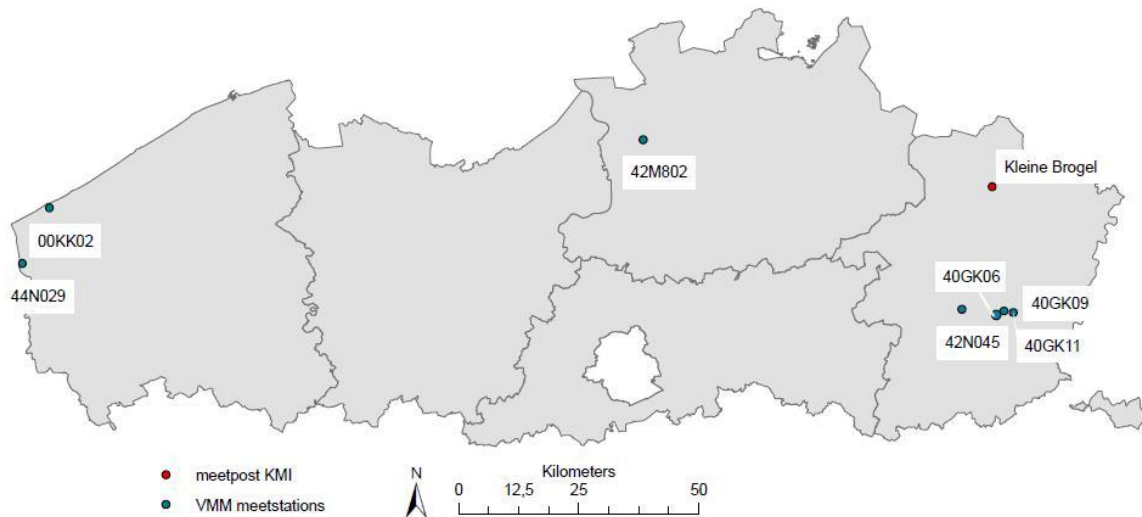
Gegevens over de fysische en chemische samenstelling van omgevingslucht en de meteorologische condities werden ter beschikking gesteld door VMM en KMI. In Tabel 28 wordt een overzicht gegeven van de beschikbare data en de meetposten uit de VMM meetnetten en het KMI meetnet waar de metingen werden uitgevoerd. Figuur 32 toont de ligging van deze meetposten.

Tabel 28: Overzicht van de karakteristieken van de omgevingslucht en de lokale meetposten.

	Meetposten Regio Genk ¹	Meetposten Regio Koksijde
Polluenten		
Zware metalen (ng/m ³) (Pb, Zn, Cu, Ni, As, Mn, Cd, Cr)	00GK11 Genk	00KK02 Koksijde
PAKs (ng/m ³) 1.fluorantheen 2.pyreen 3.benzo(a)anthraceen* 4.chryseen* 5.benzo(b)fluorantheen* 6.benzo(k)fluorantheen* 7.benzo(a)pyreen* 8.dibenzo(a,h)anthraceen* 9.benzo(ghi)peryleen* 10.indeno(1,2,3-cd)pyreen*		44N029 Houtem
PM10(µg/m ³)	40GK09 Genk	44N029 Houtem
PM2.5 (µg/m ³)	42N045 Hasselt	44N029 Houtem
Zwarte rook (µg/m ³)	42N045 Hasselt	44N029 Houtem
Dioxines en PCBs	75GK29 Genk 75GK18 Genk	75N029 Veurne
Meteo		
Temperatuur (°C)	Kleine-Brogel	44N029 Houtem
Neerslag (mm)	Kleine-Brogel	44N029 Houtem
Windrichting (°)	42M802 Antwerpen	44N029 Houtem
Windsterkte (m/s)	Kleine-Brogel	44N029 Houtem

*carcinogene PAKs

¹ Voor een gedetailleerde kaart van de ligging van de meetposten in Genk wordt verwezen naar Figuur 2.



Figuur 32: Ligging van de meetposten in Vlaanderen.

Voor de regio Genk zijn een aantal fysico-chemische gegevens (PM_{2.5}, zwarte rook) afkomstig van meetposten die geografisch verder verwijderd zijn van de meetpost 00GK11 waar de luchtbemonstering voor de huidige studie werd uitgevoerd. Mogelijks zijn deze meetwaarden niet representatief voor de meetpost 00GK11. Daarom werd nagegaan of er gemodelleerde gegevens beschikbaar zijn voor deze parameters. Voor PM_{2.5} werden geïnterpoleerde waarden gebruikt die representatief zijn voor de gridcel waarin Genk Sledderlo (meetpost 00GK11 in Genk) valt. Voor PM_{2.5} wordt gebruik gemaakt van het model RIO-Corine. Voor zwarte rook is er momenteel nog geen model beschikbaar.

Voor PAKs zijn er geen meetgegevens beschikbaar voor de regio Genk. Voor PAKs zijn er in het verleden gemodelleerde berekeningen (VLOPS model) uitgevoerd. De afwijkingen met de metingen waren echter zo groot dat het niet wordt aangeraden om modelresultaten voor PAKs te gebruiken. Bovendien kan VLOPS enkel jaargemiddelden berekenen, geen dagwaarden.

Voor de periode van de huidige meetcampagne is de gemiddelde concentratie fijn stof (PM₁₀) niet statistisch verschillend tussen de locatie Genk en Koksijde (gepaarde t-test, $p > 0.05$) (Figuur 33). De gemiddelde concentratie PM_{2.5} en zwarte rook daarentegen zijn significant verhoogd in Genk in vergelijking met Koksijde (gepaarde t-test, $p < 0.05$). Het verloop van de PM₁₀, PM_{2.5} en zwarte rook concentraties wordt weergegeven in Figuur 34, Figuur 35, Figuur 36.

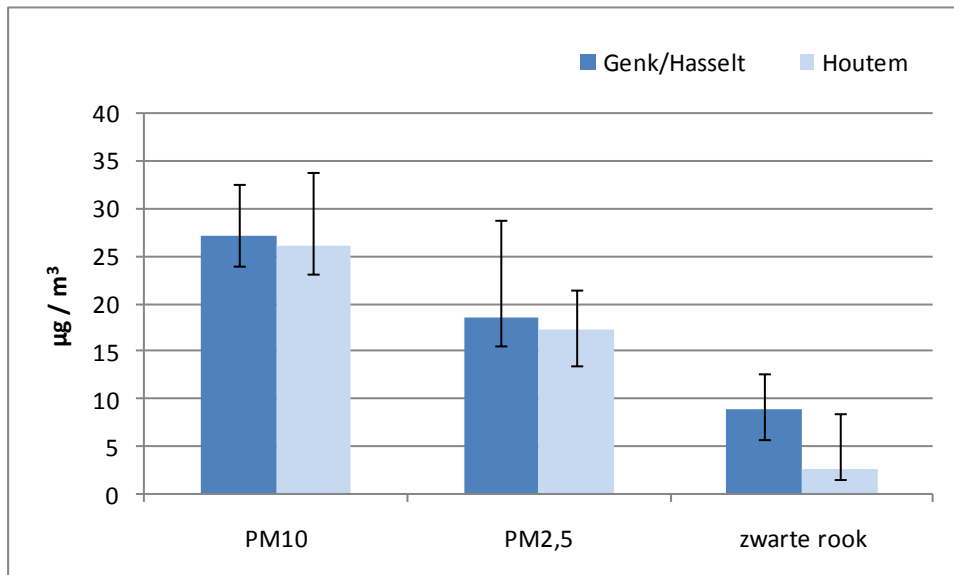
Met uitzondering van Arseen (As) zijn de concentraties van de verschillende metalen in fijn stof significant hoger in Genk dan in Koksijde (gepaarde t-test, $p < 0.01$) (Figuur 37). Het jaarverloop van de verschillende metalen wordt grafisch voorgesteld in Figuur 38 (Pb), Figuur 39 (Zn), Figuur 40 (Cu), Figuur 41 (Ni), Figuur 42 (As), Figuur 43 (Mn), Figuur 44 (Cd), Figuur 45 (Cr).

Voor de verschillende parameters werden van elke dag 24h-waarden aangeleverd door VMM. PAKs metingen gebeuren minder frequent waardoor het aantal meetdagen per maand lager ligt (februari $n=14$; maart $n=8$; april $n=8$; mei $n=12$; juni $n=8$). Het jaarverloop van de som van de gemeten PAKs in de meetpost te Houtem wordt weergegeven in Figuur 46. PAKs concentraties in de omgevingslucht zijn verhoogd tijdens de wintermaanden januari, februari en maart. Deze verhoging wordt in verband gebracht met de verwarming van huizen en gebouwen.

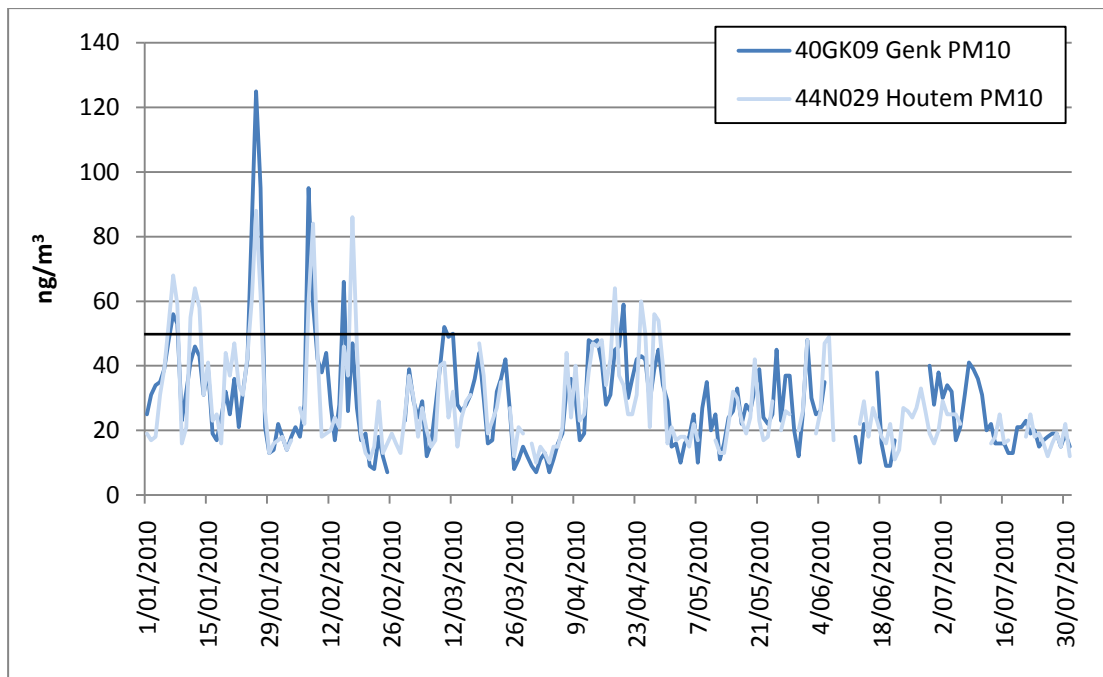
Van elke variabele werd een maandgemiddelde berekend. Deze werden gebruikt in de statistische verwerking om verdere interpretatie van de effectgerichte meetresultaten toe te laten. Voor de

chemische meetwaarden beneden de detectiewaarde werd de detectielimiet in beschouwing genomen.

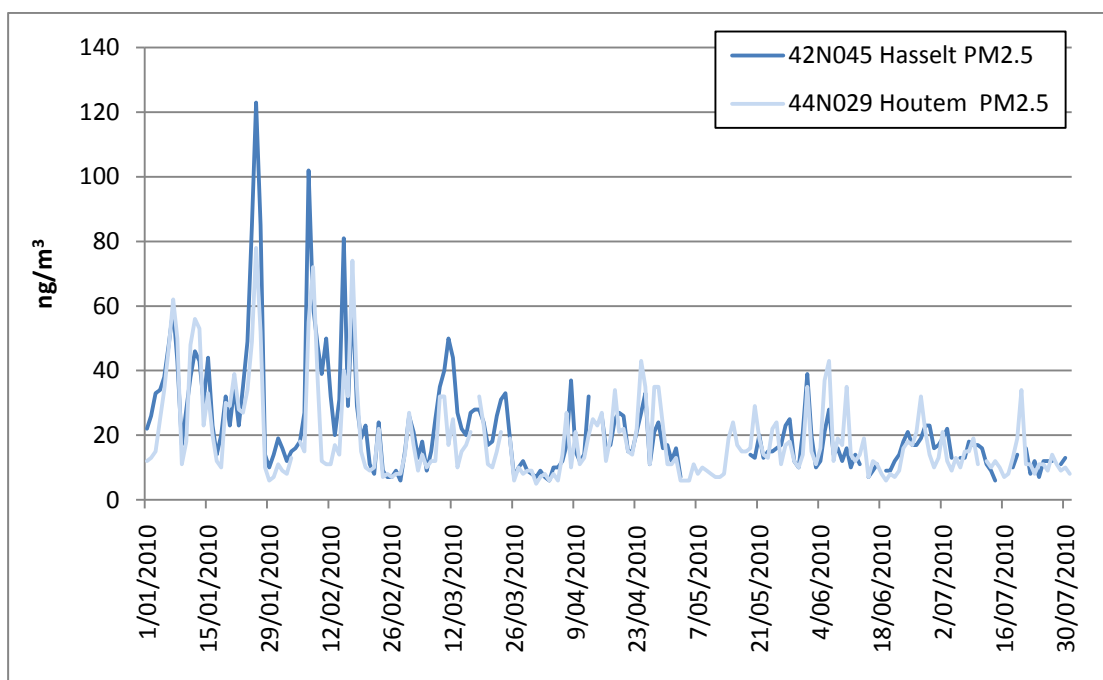
Voor dioxine, PCB126 en de som van dioxines en DL(dioxin-like)-PCB in depositie zijn er maandgemiddelden beschikbaar (Figuur 47). Er is slechts één maandwaarde (04-05/2010) beschikbaar voor de meetlocatie Veurne welke lager ligt dan de meetwaarden van dezelfde periode in Genk. In Genk zijn er twee meetlocaties. De maandwaarden van de meetpost 75GK18 liggen aanzienlijk hoger dan deze van de meetpost 75GK29.



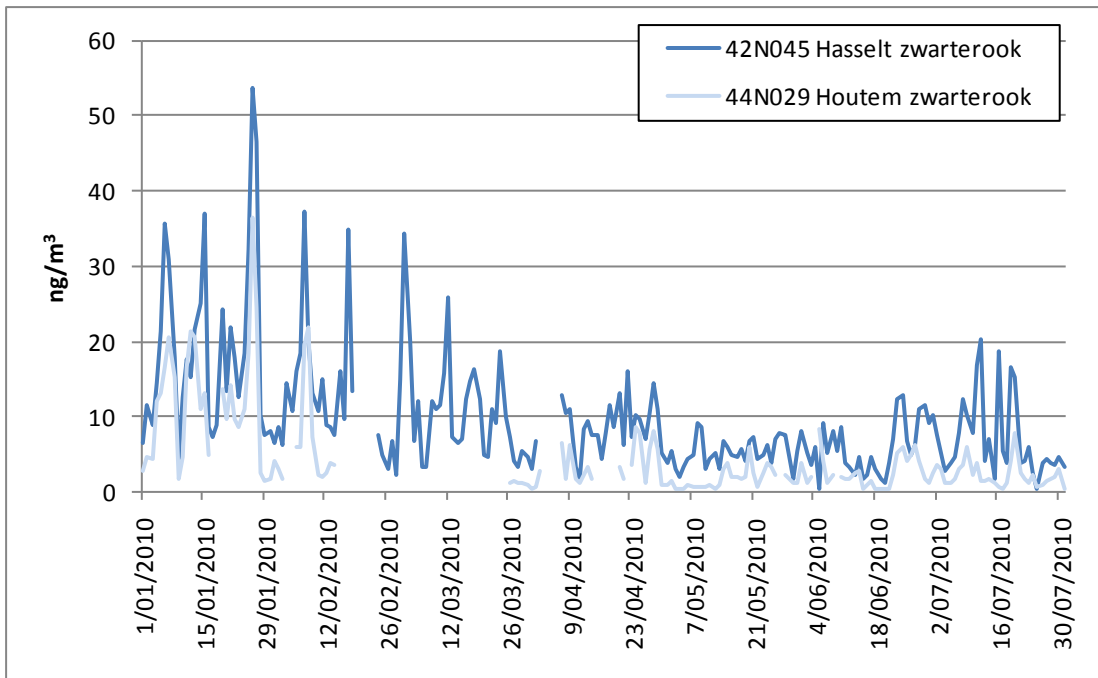
Figuur 33: Concentratie van PM10, PM2.5 en zwarte rook tijdens de meetcampagne (geometrisch gemiddelde \pm P25/P75).



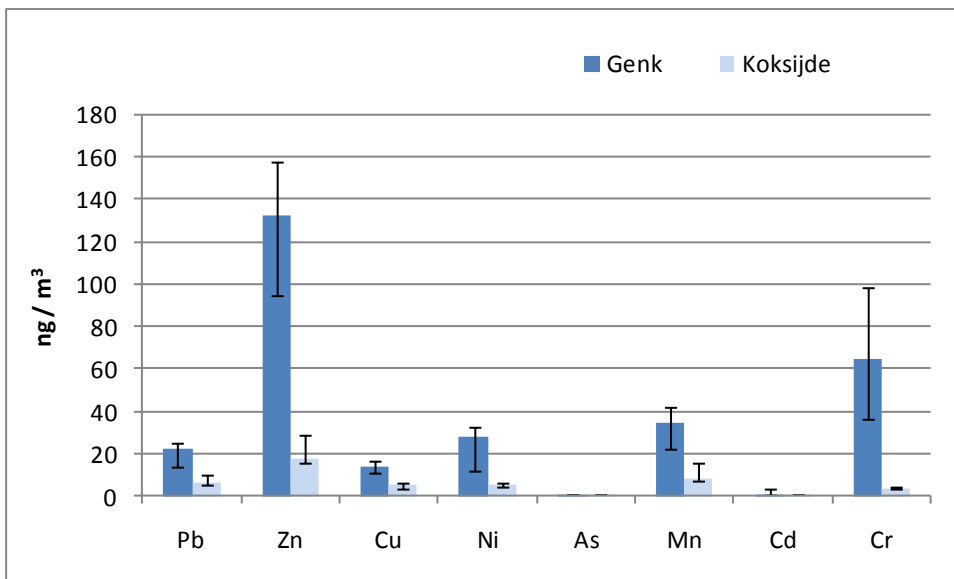
Figuur 34: Jaarverloop van PM10. (— grenswaarde 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3/\text{dag}$)



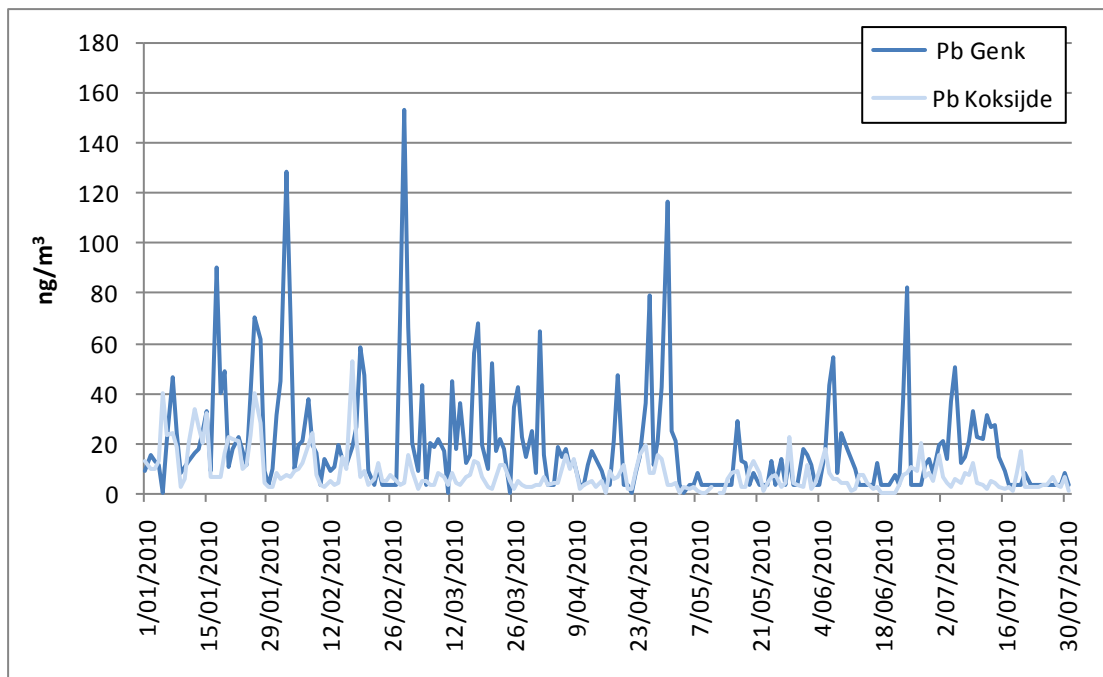
Figuur 35: Jaarverloop van PM2.5.



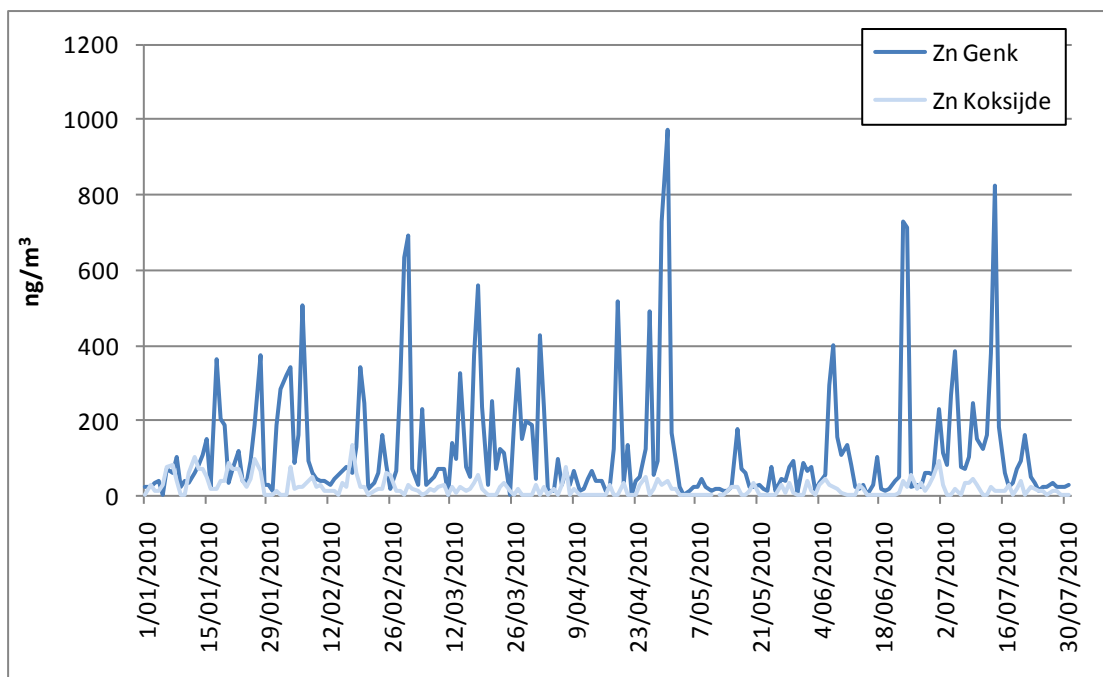
Figuur 36: Jaarverloop van zwarte rook.



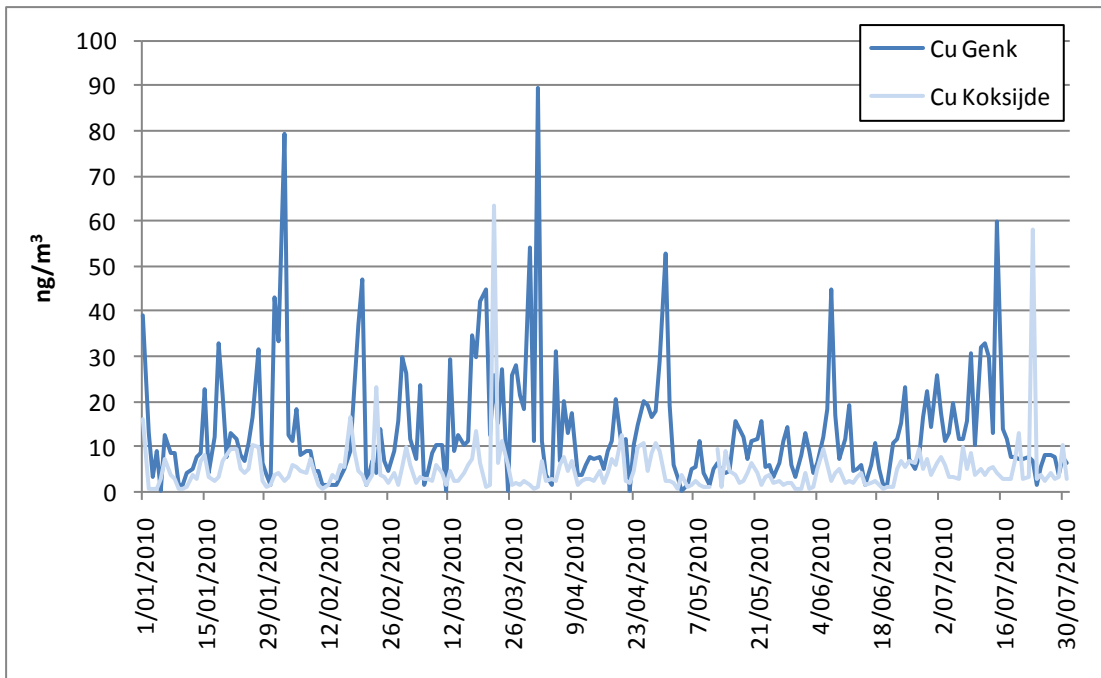
Figuur 37: Concentratie van metalen in PM10 tijdens de meetcampagne (geometrisch gemiddelde ± P25/P75).



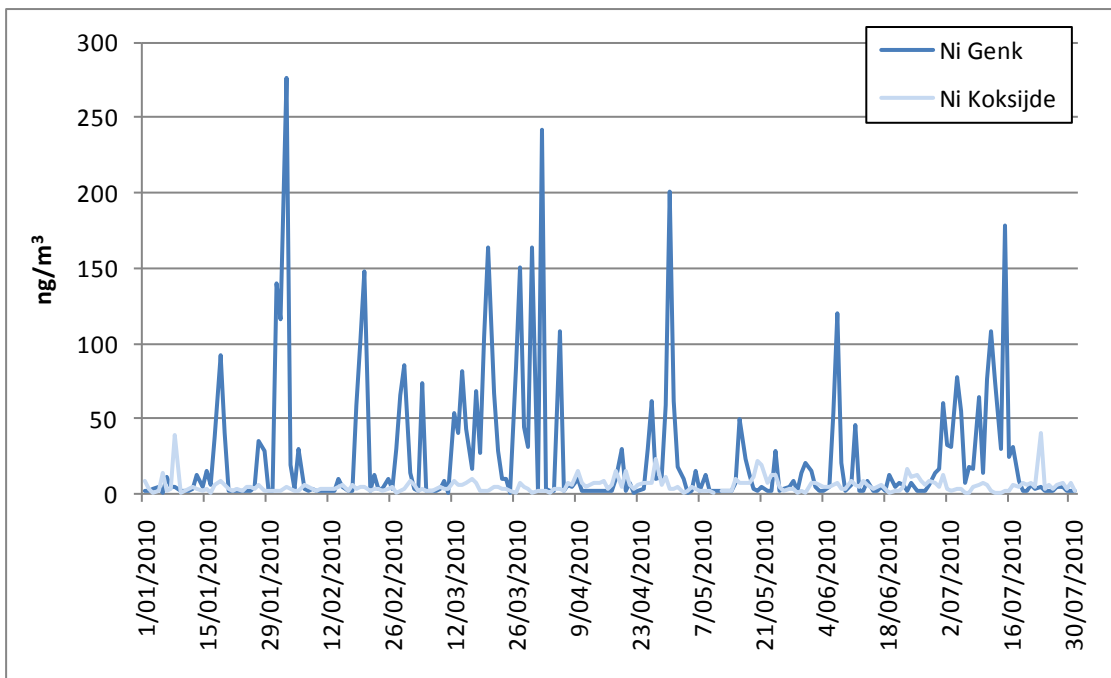
Figuur 38: Jaarverloop van lood (Pb) in PM10 voor Genk en Koksijde.



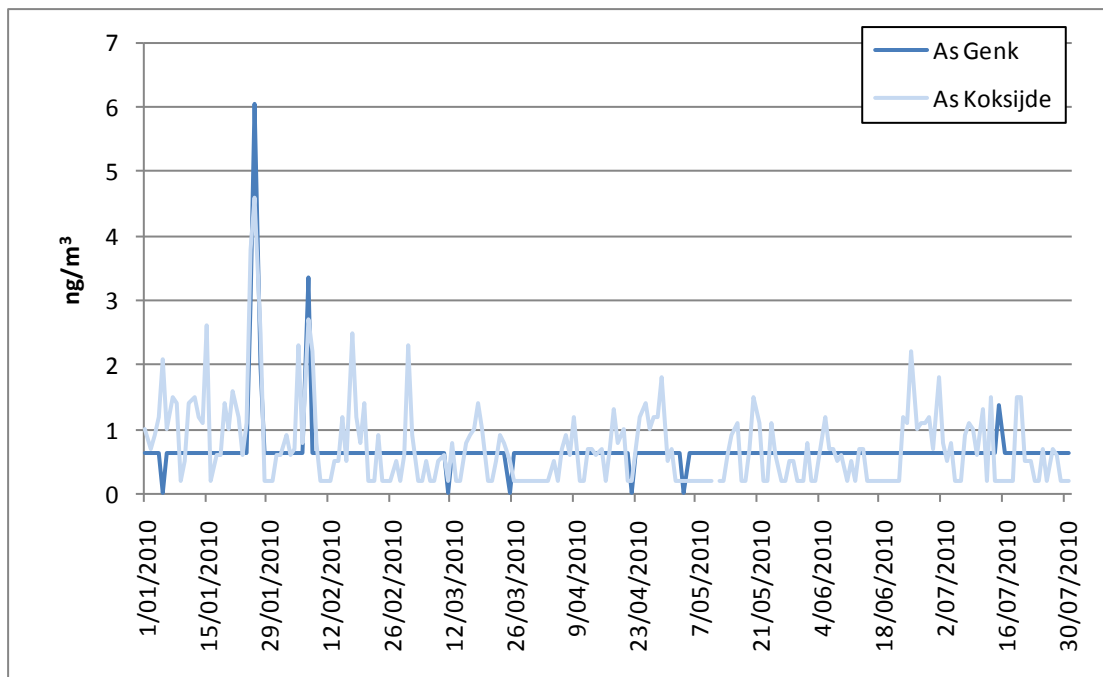
Figuur 39: Jaarverloop van zink (Zn) in PM10 voor Genk en Koksijde.



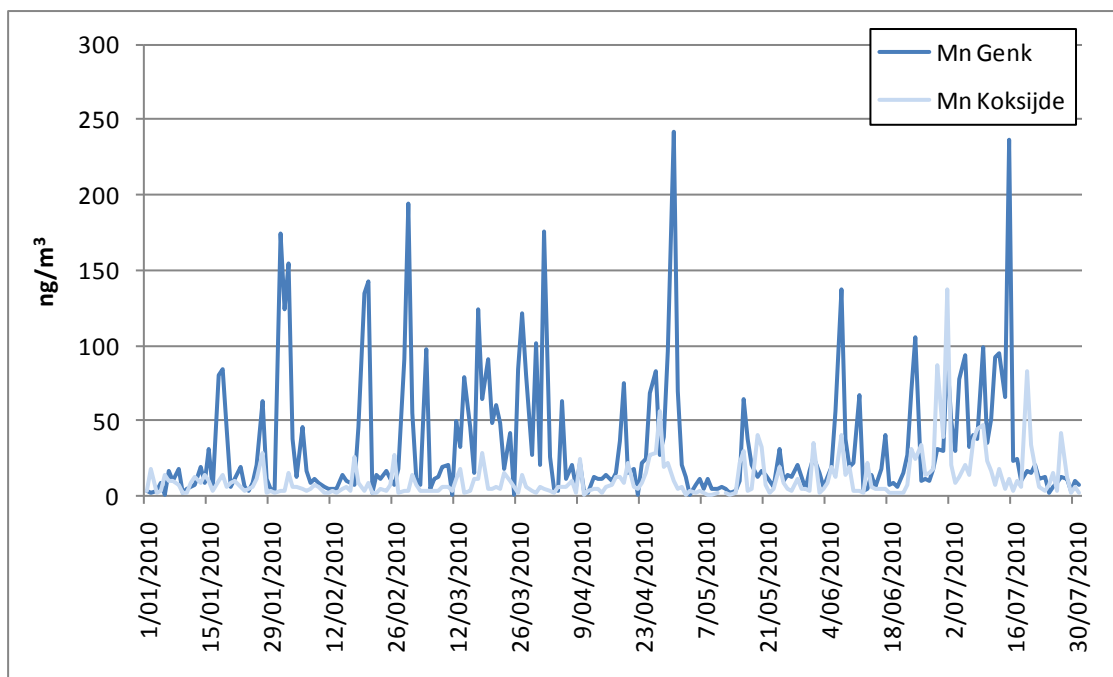
Figuur 40: Jaarverloop van koper (Cu) in PM10 voor Genk en Koksijde.



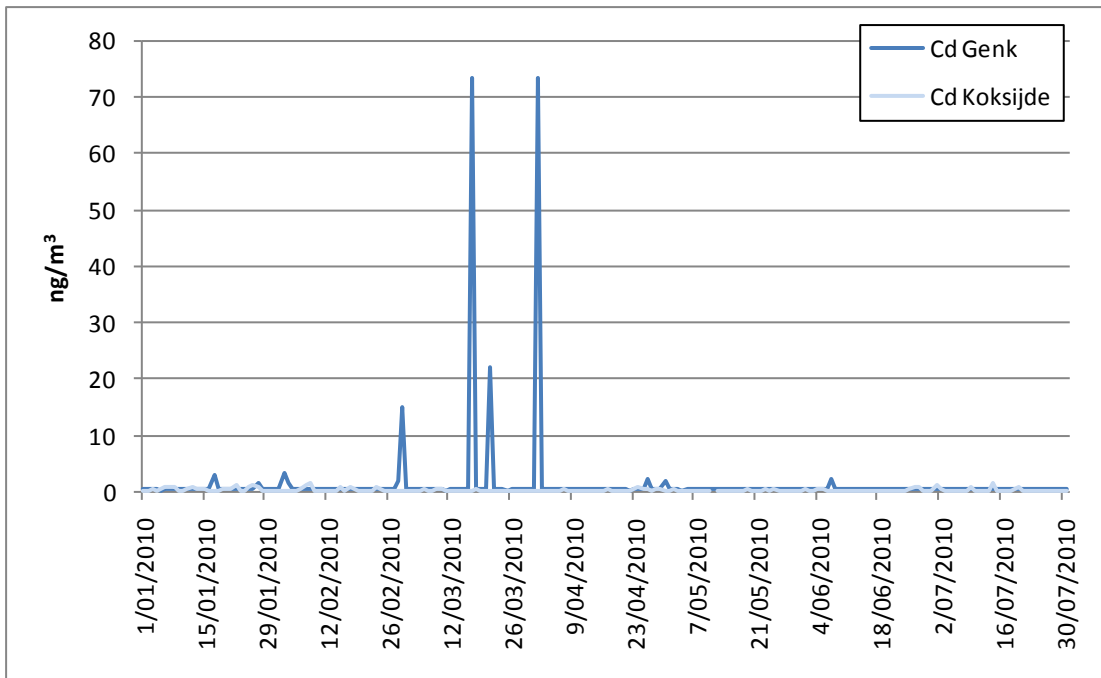
Figuur 41: Jaarverloop van nikkel (Ni) in PM10 voor Genk en Koksijde.



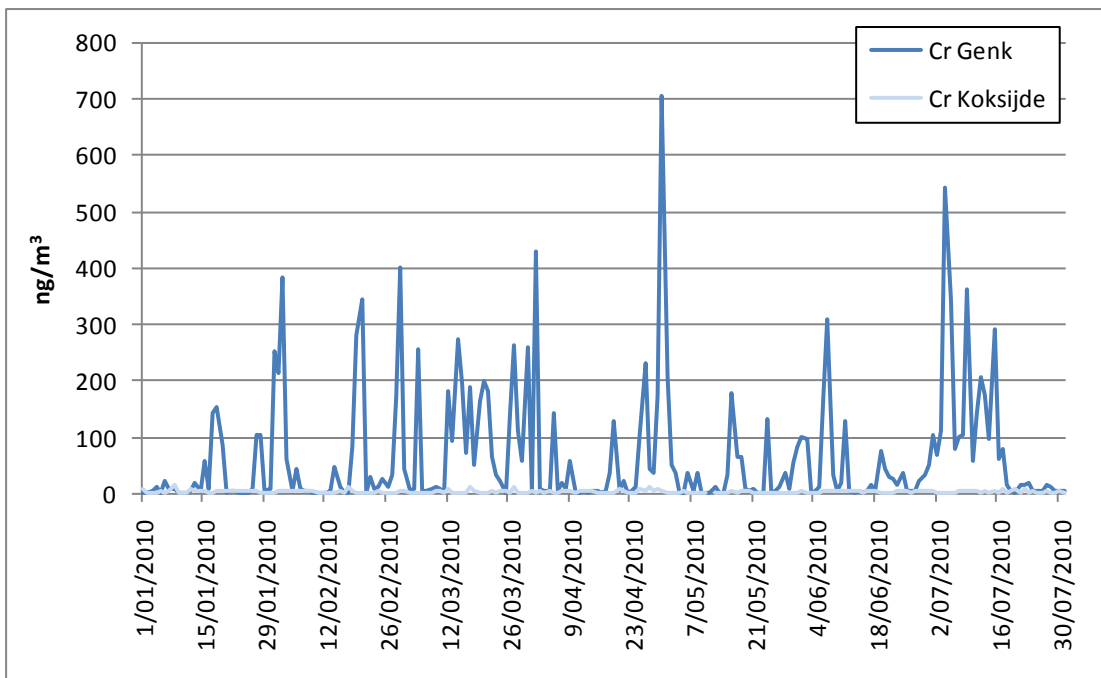
Figuur 42: Jaarverloop van arseen (As) in PM10 voor Genk en Koksijde.



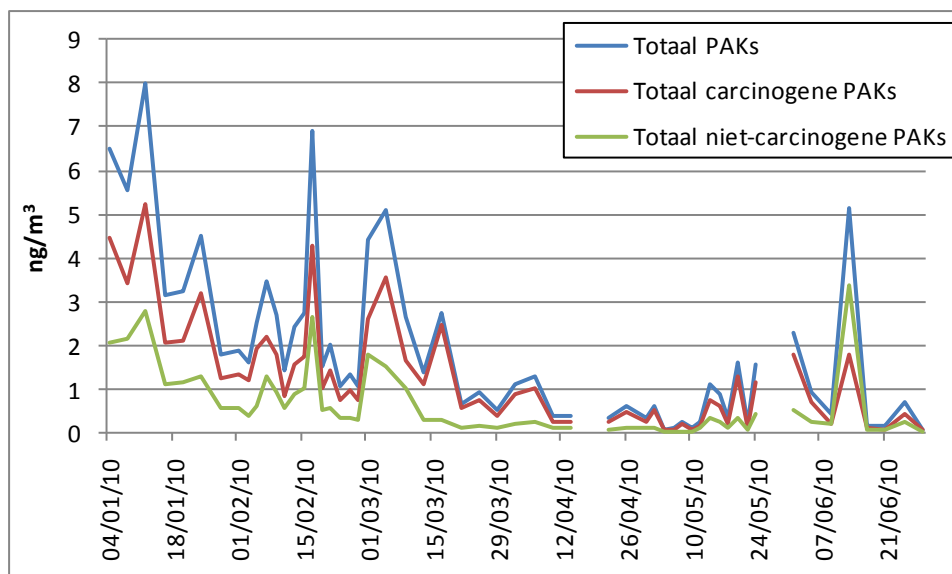
Figuur 43: Jaarverloop van mangaan (Mn) in PM10 voor Genk en Koksijde.



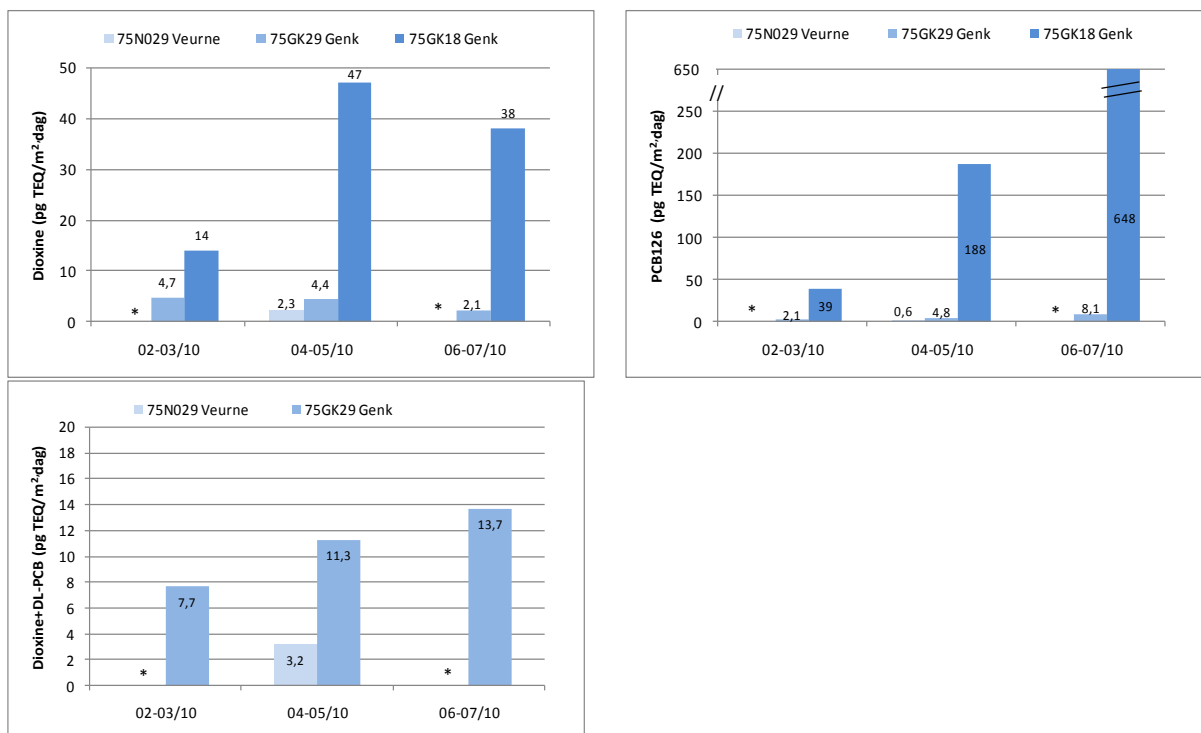
Figuur 44: Jaarverloop van cadmium (Cd) in PM10 voor Genk en Koksijde.



Figuur 45: Jaarverloop van chroom (Cr) in PM10 voor Genk en Koksijde.



Figuur 46: Jaarverloop van PAKs (som van alle PAKs, som van niet-carcinogene PAKs, som van carcinogene PAKs) in TSP voor de meetpost Houtem.



Figuur 47: Maandgemiddelden van de depositieconcentraties van dioxines, PCB126 en de som van dioxines en DL-PCBs tijdens de meetcampagne.

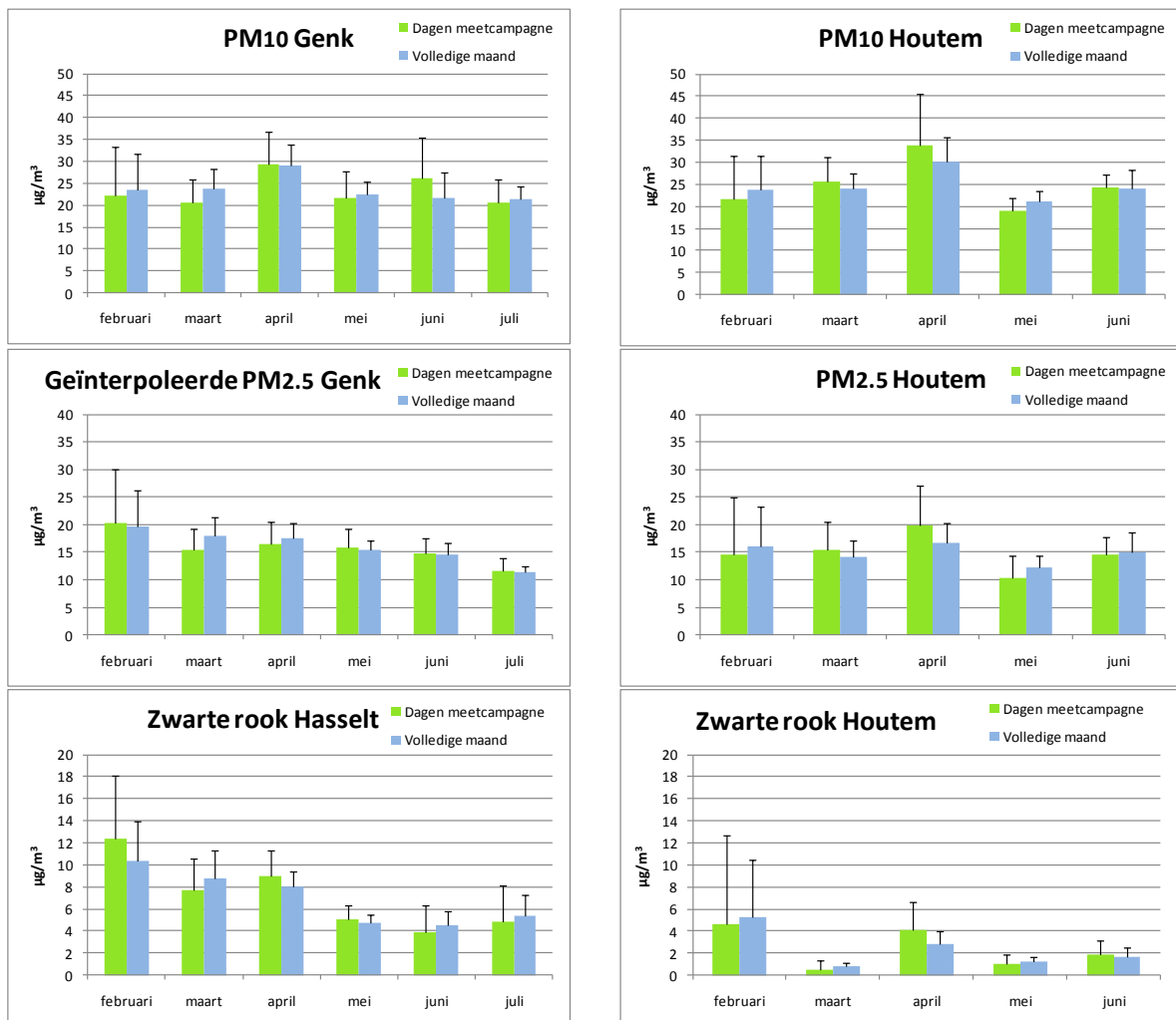
5.2. RELATIE VAN DE BIOLOGISCHE EINDPUNTEN TOT POLLUTIE

Om te bepalen welke fysische, chemische en meteorologische determinanten een mogelijk verklaring kunnen zijn voor de waargenomen effecten (HOOFDSTUK 4) werden de toxicologische resultaten vergeleken met enerzijds de chemische karakteristieken van de stofdeeltjes en anderzijds werd de invloed van de meteorologische condities nagegaan. Hiervoor werden niet-parametrische

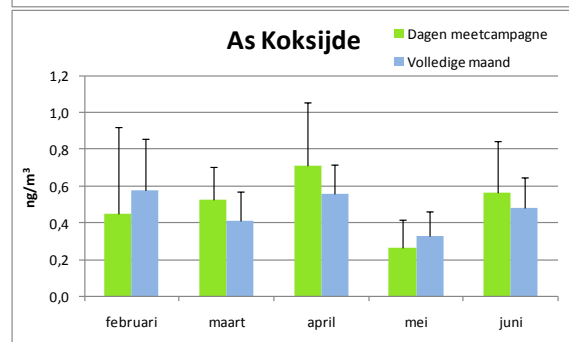
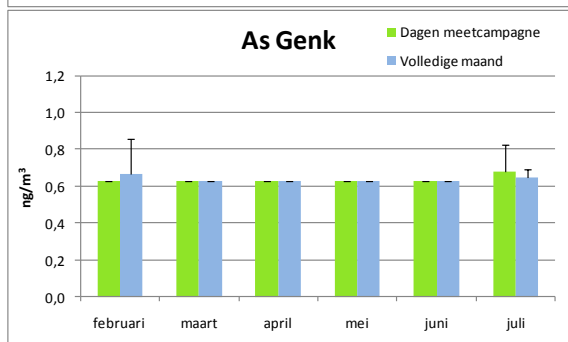
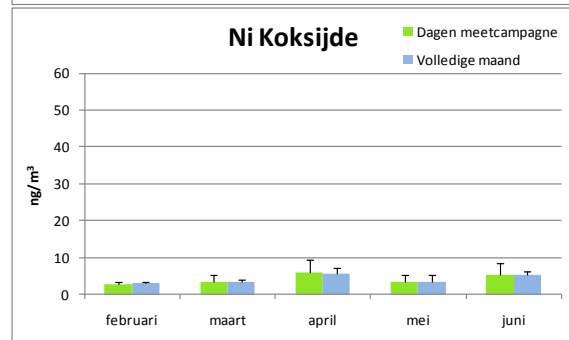
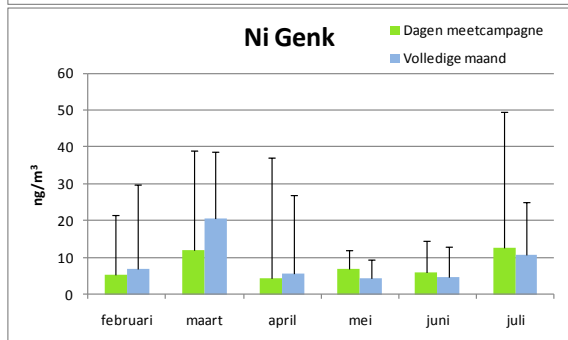
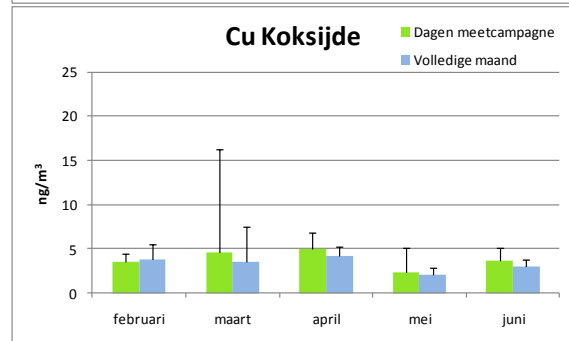
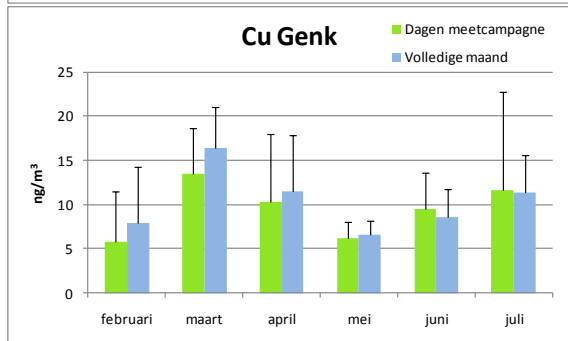
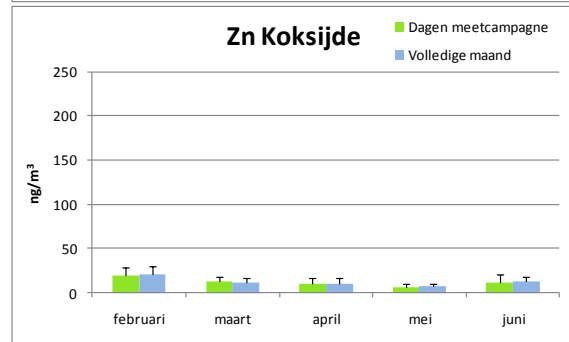
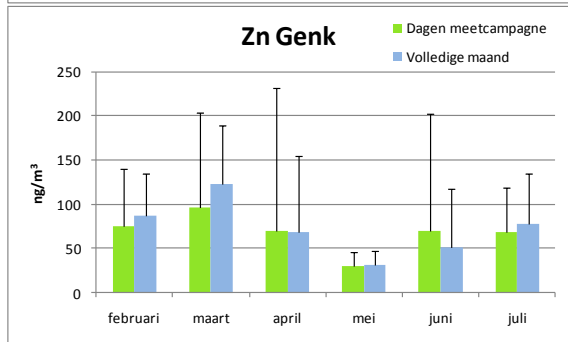
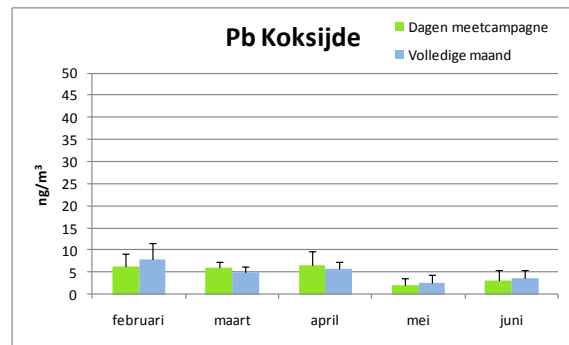
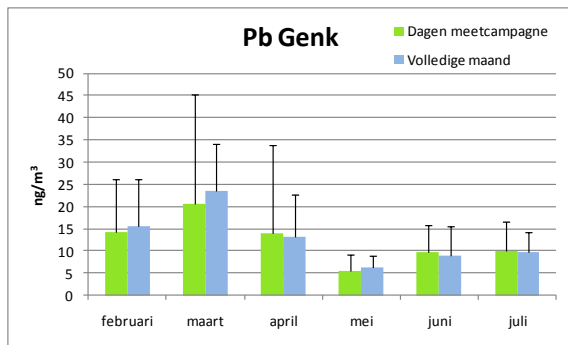
Spearman's rank correlatiecoëfficiënten tussen chemische/meteo componenten (maandgemiddelden) en de biologische eindpunten bij de hoogste blootstellingsconcentratie berekend (uitzondering: voor oestrogeen activiteit werd de berekende E2eq/m³ gebruikt).

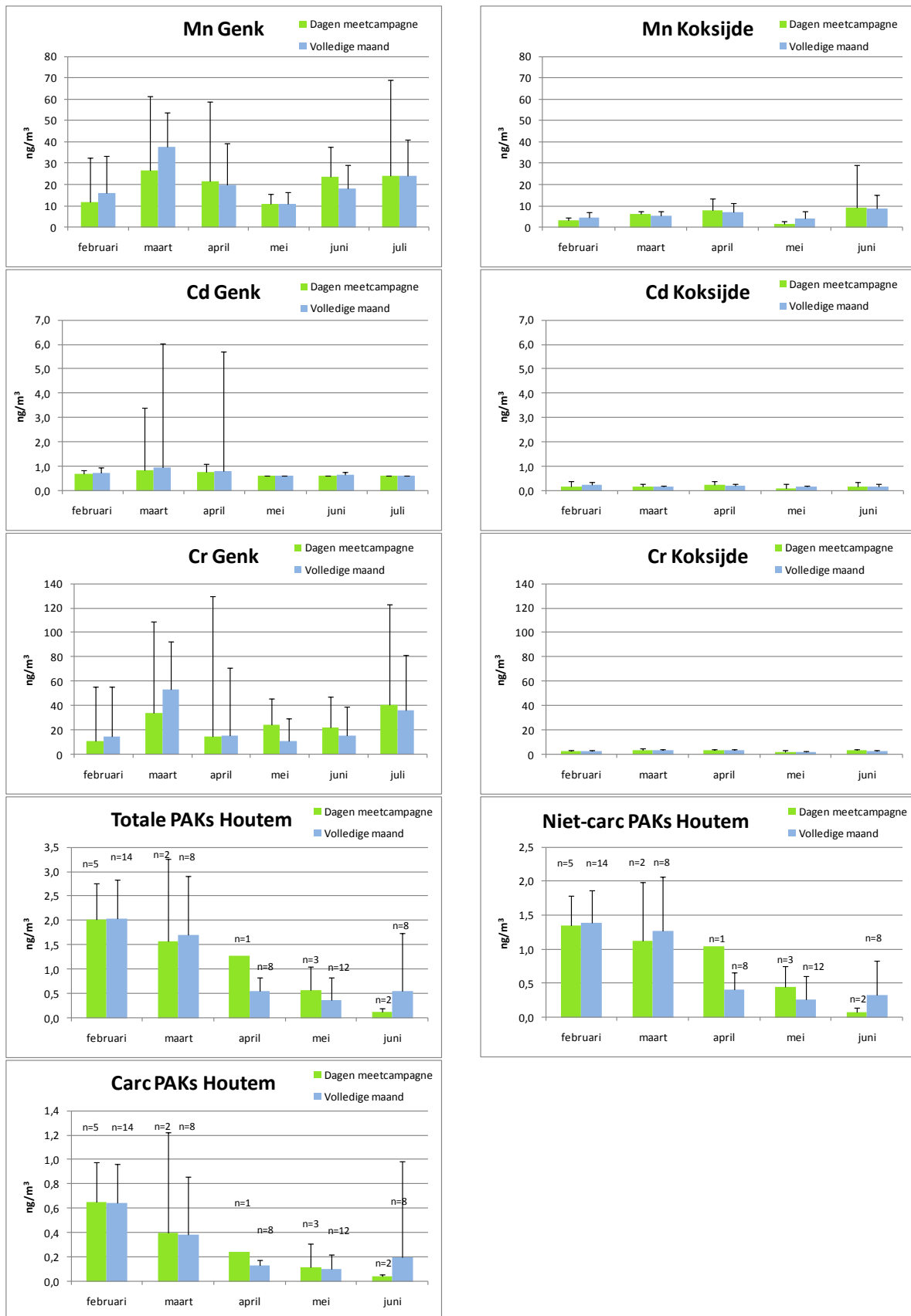
Omwille van logistieke redenen is de PM10 collectie in functie van de effectgerichte meetcampagne in Koksijde en Genk niet volledig simultaan verlopen (zie Tabel 8 en Tabel 9 voor de bemonsteringsdagen). Om na te gaan of de frequentie van bemonstering per maand (max 13 dagen per maand) representatief is voor de volledige maand werd voor de verschillende parameters tevens een gemiddelde berekend van de meetwaarden op de staalnamedagen van de effectgerichte meetcampagne.

Figuur 48 geeft het verloop van elke component op basis van een geometrisch maandgemiddelde en op basis van het geometrisch gemiddelde van de bemonsteringsdagen. Hieruit blijkt dat de gemiddelde meetwaarden op de beperkte staalnamedagen per maand goed overeenstemmen met het maandgemiddelde met uitzondering van de neerslag. Voor PAKs werd alleen de totale hoeveelheid PAKs vergeleken. Omdat de PAKs-metingen niet dagelijks gebeuren is het aantal dagen waarop het campagnegemiddelde werd berekend vrij beperkt (februari n=5, maart n=2, april n=2; mei n=3; juni n=2).



HOOFDSTUK 5 Relatie effectgericht meten en polluenten en meteo





Figuur 48: Maandverloop van de fysische en chemische metingen voor de meetposten regio Genk en Koksijde. (geometrische gemiddelde±95%CL)

Tabel 29 geeft een overzicht van de berekende Spearman rank correlatiecoëfficiënten tussen de fysische en chemische determinanten en de biologische eindpunten. Significante correlaties zijn in vet aangeduid.

Door het beperkt aantal meetpunten voor dioxines en PCBs (n=4) werden geen correlaties berekend met de effectgerichte metingen.

Tabel 29: Associatie tussen de biologische effectparameter en de fysico-chemische karakteristieken van PM10 (Spearman's rank correlatie coefficient, p-waarden en aantal gegevens(n))

Fysico-Chemische componenten	Cytotoxiciteit			Immunotoxiciteit						Mutageniteit						Endocriene verstoring			Radicaalgenerend vermogen		
	Beas-2B			Il-6(Beas-2B)			Il-8(Beas-2B)			Ames (-S9)/plaat			Ames (+S9)/plaat			MELN test					
	r	p	n	r	p	n	r	p	n	r	p	n	r	p	n	r	p	n	r	p	n
PM10	0,49	0,125	11	-0,16	0,631	11	-0,07	0,832	11	0,29	0,386	11	0,35	0,285	11	0,11	0,739	11	0,67	<0,0001	49
PM2.5	0,35	0,298	11	0,08	0,811	11	0,01	0,979	11	0,79	0,004	11	0,84	0,0013	11	0,45	0,164	11	0,74	<0,0001	51
Zware metalen																					
Pb	-0,23	0,501	11	0,64	0,035	11	0,45	0,17	11	0,64	0,035	11	0,55	0,077	11	0,75	0,008	11	0,71	<0,0001	52
Zn	-0,29	0,385	11	0,71	0,015	11	0,48	0,133	11	0,53	0,096	11	0,45	0,16	11	0,72	0,013	11	0,63	<0,0001	52
Cu	-0,33	0,326	11	0,8	0,003	11	0,72	0,013	11	0,4	0,223	11	0,39	0,235	11	0,82	0,002	11	0,73	<0,0001	52
Ni	*		11	0,53	0,09	11	0,5	0,117	11	0,06	0,853	11	0,13	0,71	11	0,82	0,002	11	0,47	0,001	52
As	-0,5	0,115	11	0,78	0,005	11	0,55	0,08	11	0,47	0,145	11	0,42	0,195	11	0,79	0,004	11	0,59	<0,0001	52
Mn	-0,33	0,326	11	0,86	0,0008	11	0,77	0,005	11	0,2	0,555	11	0,22	0,519	11	0,81	0,003	11	0,63	<0,0001	52
Cd	-0,24	0,474	11	0,74	0,01	11	0,61	0,05	11	0,62	0,044	11	0,6	0,05	11	0,77	0,006	11	0,66	<0,0001	52
Cr	-0,33	0,326	11	0,84	0,0013	11	0,76	0,006	11	0,2	0,555	11	0,21	0,537	11	0,75	0,008	11	0,48	0,0003	52
Zwarte rook	-0,22	0,519	11	0,55	0,083	11	0,34	0,312	11	0,65	0,029	11	0,59	0,056	11	0,79	0,004	11	0,83	<0,0001	35
PAKs																					
1.fluorantheen	0,1	0,879	5	0,2	0,747	5	-0,7	0,188	5	0,9	0,037	5	0,9	0,037	5	-0,41	0,493	5	0,39	0,194	13
2.pyreen	0,1	0,879	5	0,2	0,747	5	-0,7	0,188	5	0,9	0,037	5	0,9	0,037	5	-0,41	0,493	5	0,40	0,180	13
3.benzo(a)anthraceen	-0,6	0,285	5	-0,5	0,391	5	-1	<0,0001	5	0,6	0,285	5	0,6	0,285	5	-0,82	0,089	5	0,40	0,176	13
4.chryseen	0,1	0,879	5	0,2	0,747	5	-0,7	0,188	5	0,9	0,037	5	0,9	0,037	5	-0,41	0,493	5	0,35	0,243	13
5.benzo(b)fluorantheen	0,1	0,879	5	0,2	0,747	5	-0,7	0,188	5	0,9	0,037	5	0,9	0,037	5	-0,41	0,493	5	0,32	0,283	13
6.benzo(k)fluorantheen	*		5	0,1	0,873	5	-0,6	0,285	5	0,8	0,104	5	0,8	0,104	5	-0,56	0,322	5	0,26	0,398	13
7.benzo(a)pyreen	0,2	0,747	5	0,1	0,873	5	-0,6	0,285	5	1	<0,0001	5	1	<0,0001	5	-0,31	0,614	5	0,25	0,403	13
8.dibenzo(a,h)anthraceen	-0,4	0,505	5	0,2	0,747	5	-0,8	0,104	5	0,6	0,285	5	0,6	0,285	5	-0,82	0,089	5	0,06	0,846	13
9.benzo(ghi)peryleen	0,1	0,879	5	*		5	-0,5	0,391	5	0,9	0,037	5	0,9	0,037	5	-0,46	0,434	5	0,26	0,385	13
10.indeno(1,2,3-cd)pyreen	-0,2	0,747	5	-0,4	0,505	5	-0,6	0,285	5	0,8	0,104	5	0,8	0,104	5	-0,62	0,269	5	0,30	0,324	13
totale PAKS	0,2	0,747	5	0,1	0,873	5	-0,6	0,285	5	1	<0,0001	5	1	<0,0001	5	-0,31	0,614	5	0,32	0,289	13
carcinogene PAKS	0,2	0,747	5	0,1	0,873	5	-0,6	0,285	5	1	<0,0001	5	1	<0,0001	5	-0,31	0,614	5	0,28	0,354	13
niet-carcinogene PAKS	0,1	0,873	5	0,2	0,747	5	-0,7	0,188	5	0,9	0,037	5	0,9	0,037	5	-0,41	0,493	5	0,37	0,209	13
Endotoxine	-0,79	0,006	11	0,65	0,043	11	0,55	0,1	11	-0,3	0,934	11	-0,18	0,627	11	0,43	0,215	11			

*geen resultaat

5.2.1. AMES TEST

Bij blootstelling aan een dagequivalent van 20 m³ lucht kan de gemeten biologische respons afhankelijk zijn van zowel de hoeveelheid particulair materiaal per m³ lucht als van de aard van de chemische belading van de partikels. Een significant positieve correlatie kon aangetoond worden tussen de concentratie PM_{2.5} in de omgevingslucht en het direct ($r=0.76$, $p=0.006$) en indirect mutageen ($r=0.77$, $p=0.005$) karakter van de partikels. Deze resultaten wijzen erop dat niet enkel de massa PM₁₀ belangrijk is voor het genotoxisch effect maar ook de samenstelling van PM₁₀.

De directe mutagene potentie bleek positief gecorreleerd met de gemeten Pb concentratie in de omgevingslucht ($r=0.64$, $p=0.04$). Een zwak significant positieve associatie werd ook vastgesteld tussen de aanwezigheid van Cd in de lucht en de directe ($r=0.62$, $p=0.044$) en indirecte mutageniciteit ($r=0.6$, $p=0.05$) van de partikels. Cd is een gekend carcinogeen (IARC klasse 1), terwijl Pb mogelijk kankerverwekkend is (Bal *et al.*, 2011). Alhoewel er geen aanwezigheid van metalen verwacht wordt in het organisch extract zou de gevonden correlatie met mutagene potentie te wijten kunnen zijn aan de aanwezigheid van organische metaal verbindingen. Om hier uitsluitel over te krijgen moet de chemische samenstelling van het extract verder onderzocht worden.

Er werden significant positieve associaties gevonden tussen het mutageen karakter van PM₁₀ en de aanwezigheid van PAKs in de omgevingslucht. Omdat er alleen PAKs gegevens zijn van de meetpost Houtem is de dataset voor de statische verwerking zeer beperkt en minder betrouwbaar. De gemeten directe en indirecte mutageniciteit van de filterextracten is significant gecorreleerd met de totale concentratie van PAKs in zwevend stof ($r=1$, $p<0.0001$), som carcinogene PAKs ($r=1$, $p<0.0001$) en som niet-carcinogene PAKs ($r=0.9$, $p=0.037$). Een significant positieve correlatie werd ook aangetoond tussen de gemeten mutageniciteit (direct en indirect) en afzonderlijke PAKs zoals fluorantheen ($r=0.9$, $p=0.037$), pyreen ($r=0.9$, $p=0.037$), chryseen ($r=0.9$, $p=0.037$), benzo(b)fluorantheen ($r=0.9$, $p=0.037$) en benzo(a)pyreen ($r=1$, $p<0.0001$). 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 de aanwezigheid van PAKs (Du Four *et al.*, 2004; Brits *et al.*, 2004; Claxton *et al.*, 2004).

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 mogelijk 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 zwarte rook. In deze studie is zwarte rook in de omgevingslucht gecorreleerd met het direct mutageen effect ($r=0.65$, $p=0.02$). Zwarte rook bestaat voornamelijk uit roet afkomstig van verbrandingsprocessen en vormt een specifieke fractie van PM₁₀. In de jaren '50 werd de algemene luchtkwaliteit vooral bepaald door zwaveldioxide (SO₂) en zwarte rook, o.a. door het gebruik van steenkool. Recent is er opnieuw aandacht voor zwarte rook, deze keer als verkeersgerelateerde indicator.

5.2.2. MELN TEST

Er werd nagegaan of er een verband is tussen de gemeten oestrogene activiteit en beschikbare pollutant gegevens.

Er werd geen correlatie gevonden tussen de concentratie zwevend stof (PM10 en PM2.5) in de lucht en de oestrogene activiteit van de gecollecteerde partikels.

Er werden significant positieve associaties gevonden tussen de oestrogene activiteit en de aanwezigheid van zware metalen Pb, Zn, Cu, Ni, As, Mn, Cd en Cr in PM10. Alhoewel er geen aanwezigheid van metalen verwacht wordt in het organisch extract zou de gevonden correlatie met oestrogene potentie te wijten kunnen zijn aan de aanwezigheid van organische metaalverbindingen. Om hier uitsluitsel over te krijgen moet de chemische samenstelling van het extract verder onderzocht worden.

In deze studie is zwarte rook in de omgevingslucht gecorreleerd met de oestrogene activiteit ($r=0.79$, $p=0.014$) van de gecollecteerde PM10. Dit wijst er erop dat in de roetfractie van PM10 stoffen aanwezig zijn met een endocrien verstorend karakter. Welke chemische stoffen aan de basis liggen van de oestrogene activiteit is niet gekend.

Er werd voor PAKs geen verband gevonden met de gemeten oestrogene activiteit. Vanwege de complexe matrix waarmee er hier wordt gewerkt kan de aanwezigheid van andere organische pollutanten in de omgevingslucht (bijv. pesticiden, PCBs,..) die niet gemeten werden niet uitsluiten, terwijl deze mogelijk ook kunnen bijdragen tot de gemeten oestrogene activiteit.

5.2.3. CYTOTOXICITEIT

Er werd nagegaan of de gemeten cytotoxiciteit kan verklaard worden door de chemische samenstelling van de partikels. Het eerder zwak cytotoxisch karakter van de partikels kon niet gecorreleerd worden met de aanwezigheid van zware metalen, zwarte rook of PAKs in de omgevingslucht.

Endotoxine gehalte en cytotoxisch karakter van de PM10 daarentegen bleken negatief geassocieerd ($r=-0.79$, $p=0.006$).

5.2.4. PRODUCTIE VAN INFLAMMATOIRE CYTOKINES

Er werd nagegaan of de biologische inflammatoire responsen kunnen verklaard worden door de aanwezigheid van zware metalen in het fijn stof. De gemeten immuun reactie in bronchiale Beas-2B cellen is gecorreleerd met de concentratie van verschillende zware metalen in de omgevingslucht. De Spearman rank correlaties tonen aan dat er een significant positieve correlatie is tussen de productie van het inflammatoire cytokines il-6 en de metalen Pb ($r=0.64$, $p=0.035$), Zn ($r=0.71$, $p=0.015$), Cu ($r=0.8$, $p=0.003$), As ($r=0.78$, $p=0.005$), Mn ($r=0.86$, $p=0.0008$), Cd ($r=0.74$, $p=0.01$) en Cr ($r=0.84$, $p=0.001$). Ook de productie van il-8 is positief gecorreleerd met de aanwezigheid van de metalen Cu ($r=0.72$, $p=0.013$), As ($r=0.55$, $p=0.08$), Mn ($r=0.77$, $p=0.005$), Cd ($r=0.61$, $p=0.05$) en Cr ($r=0.76$, $p=0.006$) in de omgevingslucht.

Blootstelling van bronchiale epitheelcellen aan particulier materiaal 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). In een Japanse studie werden correlaties gevonden tussen il-8 productie in Beas-2B met Cr en Mn (Huang *et al.*, 2003). 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

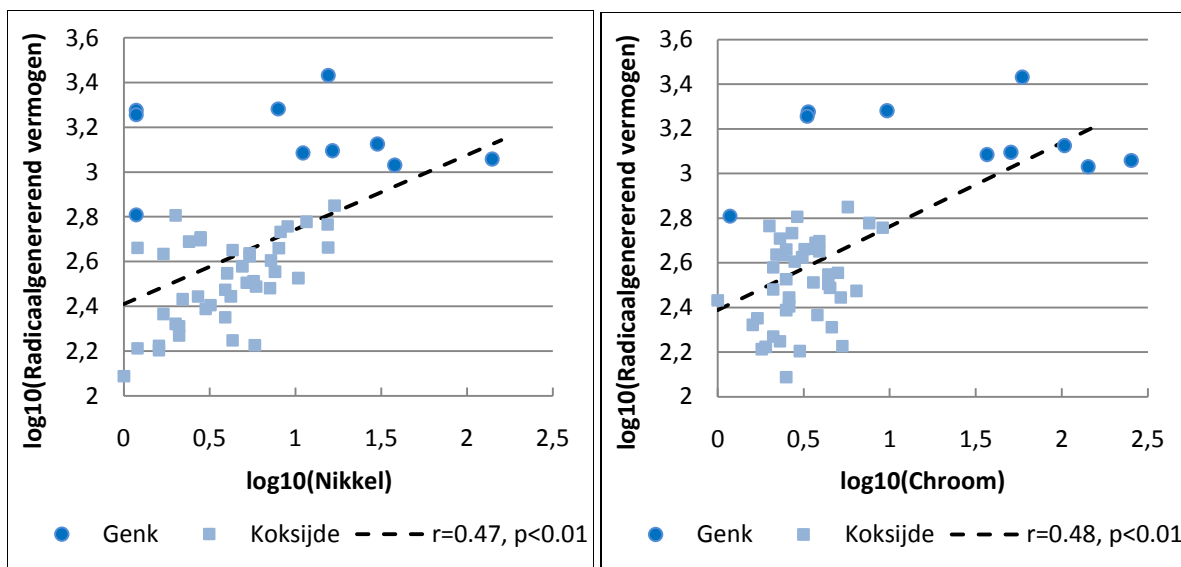
Cr was gecorreleerd met il-8 productie. De speciale rol van de metaalcomponenten op PM10 bij de inductie van il-6, il-8 en TNF- α werd ook aangetoond in humane bronchiale epitheelcellen door het toevoegen van een metaalchelator (Carter *et al.*, 1997).

Alhoewel de aanwezigheid van endotoxine op de partikels de cytokine inductie in Beas-2B niet kan verklaren werd een significant positieve associatie waargenomen tussen de endotoxine hoeveelheid en il-6 inductie ($r=0.65$, $p=0.042$) in Beas-2B cellen.

De cytokine inductie door PM10 in Beas-2B kon niet geassocieerd worden met zwarte rook en PAKs.

5.2.5. RADICAALGENEREREND VERMOGEN

Het radicaalgenererend vermogen van de dagstalen fijn stof is significant gecorreleerd met alle beschouwde metalen in de omgevingslucht: lood, $r=0.71$; zink, $r=0.63$; koper, $r=0.73$; nikkel, $r=0.47$; arseen, $r=0.59$; mangaan, $r=0.63$; cadmium, $r=0.66$; chroom, $r=0.48$ (r =Spearman correlatie Genk en Koksijde samen, $n=53$, $p<0.01$). Figuur 32 toont de associatie voor nikkel en chroom (zowel radicaalgenererend vermogen als metalen logaritmisches getransformeerd). Ook de correlaties tussen radicaalgenererend vermogen en PM10 ($r=0.67$), PM2.5 ($r=0.74$) en zwarte rook ($r=0.83$) zijn significant ($p<0.01$).



Figuur 49: Radicaalgenererend vermogen dagelijkse luchtstalen in relatie tot concentraties nikkel en chroom in de omgevingslucht (r = Spearman correlatie)

5.3. INVLOED VAN KLIMATOLOGISCHE OMSTANDIGHEDEN

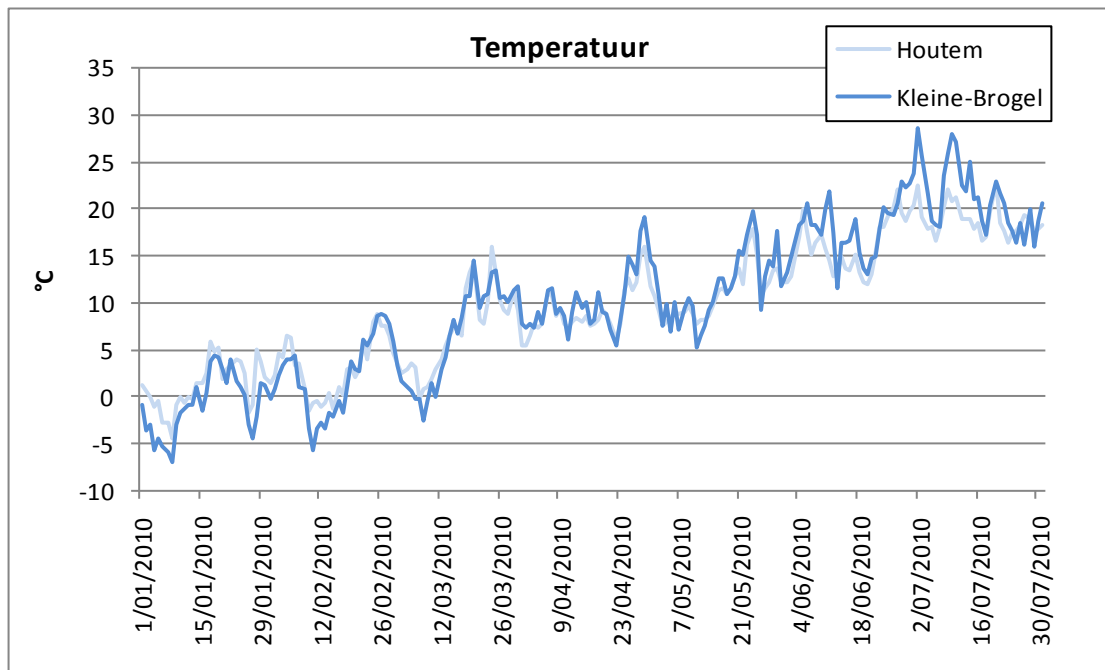
Bij de interpretatie van de resultaten werd gebruik gemaakt van de VMM meteostations in Houtem en Antwerpen (Luchtbal) en het KMI meetstation in Kleine-Brogel. De windrichtinggegevens van Antwerpen (Luchtbal) worden als proxy gebruikt voor de regio Genk. Het jaarverloop van de

omgevingstemperatuur, de windsterkte en de neerslag wordt weergegeven in Figuur 50, Figuur 51 en Figuur 52. Tijdens de periode van januari 2010 tem juli 2010 valt er in Kleine-Brogel significant meer neerslag en is de windsterkte verhoogd in vergelijking met Houtem. De omgevingstemperatuur is significant verschillend tussen Kleine-Brogel en Houtem waarbij er lagere temperaturen genoteerd worden in de winter en hogere temperaturen tijdens de zomerperiode in Kleine-Brogel (Tabel 30).

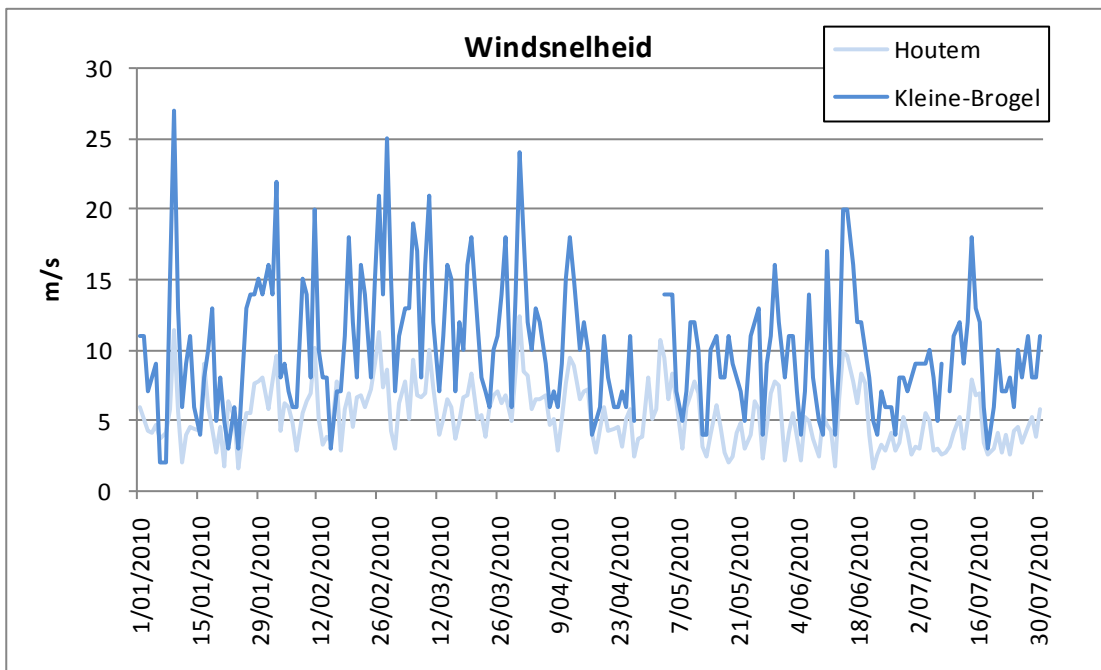
Tabel 30: Meteo gegevens voor Houtem en Kleine-Brogel voor de periode 1/7/2010-31/7/2010.

meteo	Houtem			Kleine-Brogel			t-test p
	mediaan	95%CL	n	mediaan	95%CL	n	
windsnelheid m/s	5,19	0,30	193	9,50	0,64	186	1,09E-54
temperatuur °C	9,56	0,88	193	10,70	1,09	193	0,028
neerslag mm	0,00	0,39	193	0,20	0,72	129	0,002

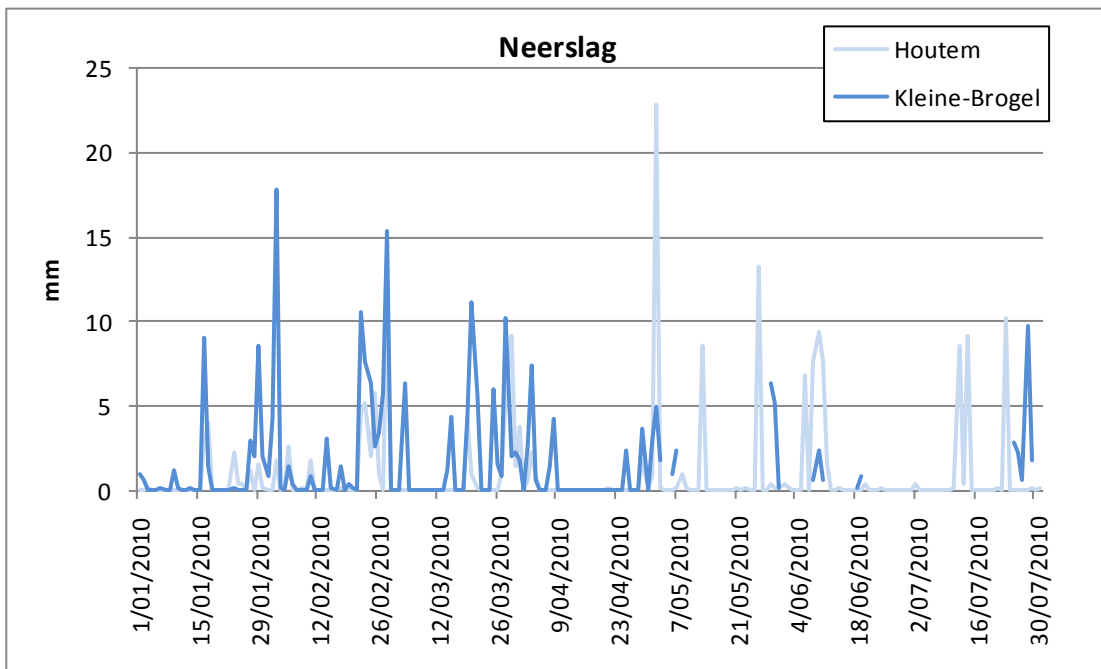
Er werd nagegaan of er een relatie kon aangetoond worden tussen de effectgerichte metingen en de weersomstandigheden (temperatuur, neerslag, windrichting, windsnelheid).



Figuur 50: Jaarverloop van de omgevingstemperatuur in Houtem en Kleine-Brogel.

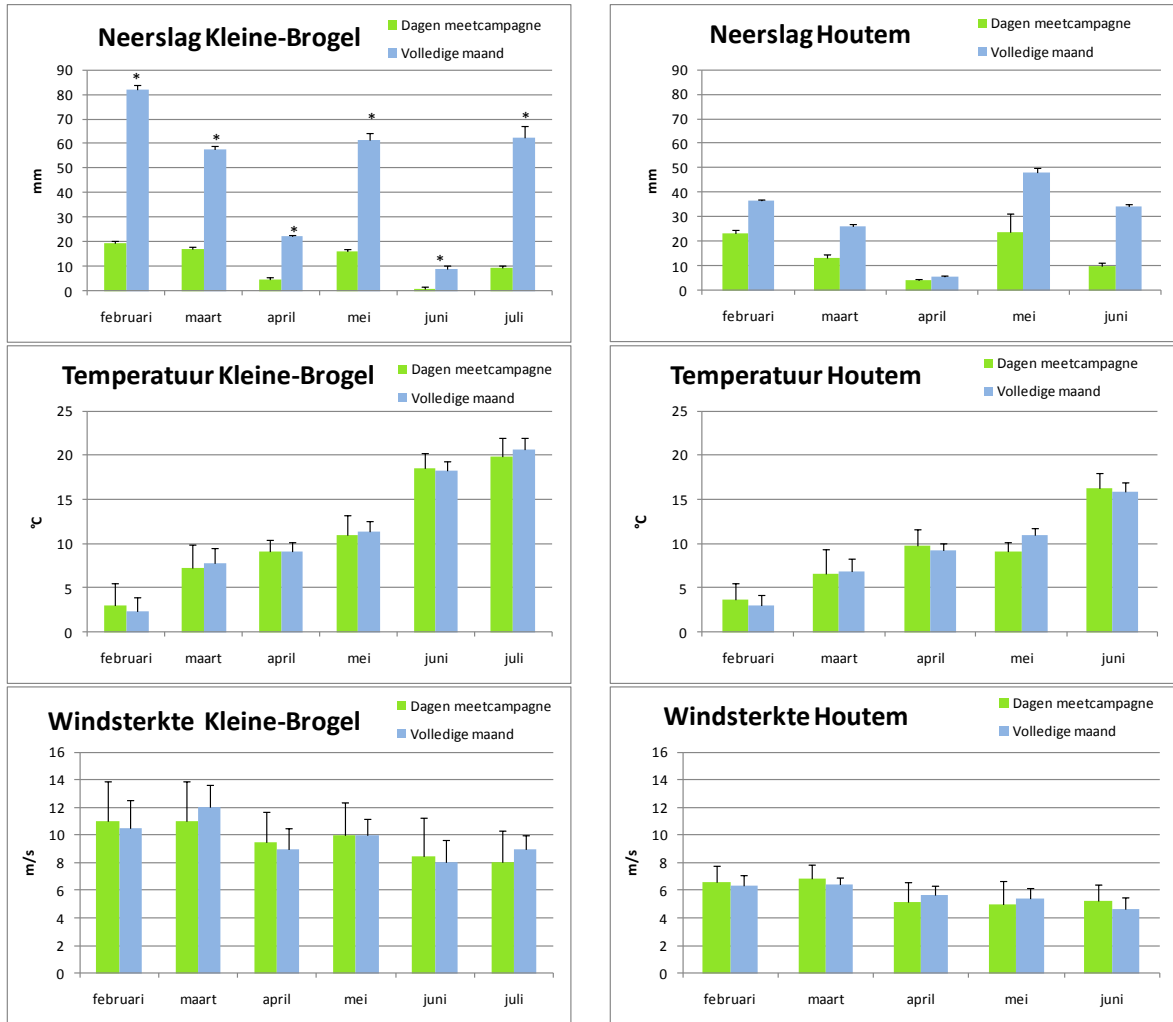


Figuur 51: Jaarverloop van de windsterkte in Houtem en Kleine-Brogel.



Figuur 52: Jaarverloop van de neerslag in Houtem en Kleine-Brogel.

Analoog als voor de fysico-chemische parameters werd het verloop van de temperatuur, de neerslag en windsnelheid op basis van een maandgemiddelde en op basis van het gemiddelde van de bemonsteringsdagen bekeken (Figuur 53). Hieruit blijkt dat de gemiddelde meetwaarden op de beperkte staalnamedagen per maand goed overeenstemmen met het maandgemiddelde met uitzondering van de neerslag.



Figuur 53: Maandverloop van de meteorologische metingen van Kleine-Brogel en Houtem.

Tabel 31 geeft een overzicht van de berekende Spearman rank correlatiecoëfficiënten tussen de meteorologische determinanten en de biologische eindpunten. Significante correlaties zijn in bold aangeduid.

5.3.1. TEMPERATUUR

Een significant positieve associatie werd waargenomen tussen de omgevingstemperatuur en de capaciteit van PM10 om il-8 te induceren in Beas-2B cellen ($r = 0.66$, $p = 0.026$). De temperatuur was eveneens positief gecorreleerd met il-6 inductie maar de relatie was niet significant ($r = 0.65$, $p = 0.07$). Deze resultaten bevestigen de verhoogde cytokineproductie na blootstelling aan PM10 verzameld in juni en juli (zie 4.4.2).

Zowel de directe ($r = -0.68$, $p = 0.02$) als indirecte ($r = -0.62$, $p = 0.04$) mutagene capaciteit van de PM10 extracten waren significant negatief gecorreleerd met de omgevingstemperatuur.

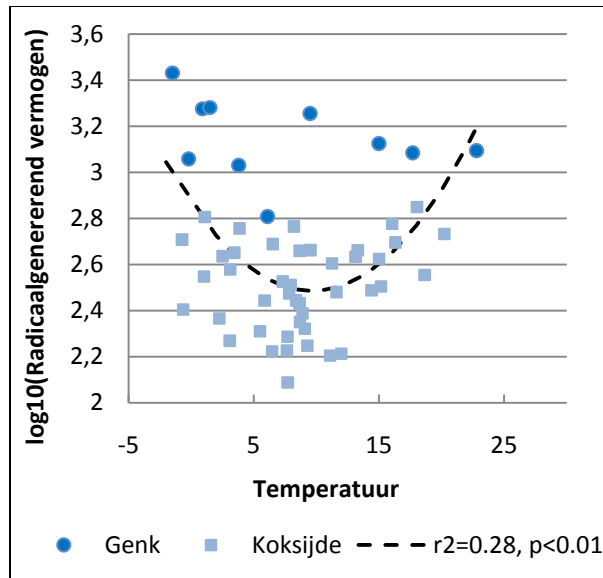
Deze resultaten bevestigen het verhoogde mutageen karakter tijdens de wintermaanden (zie 4.1.2). De uitstoot bij verwarming van huizen en gebouwen wordt in verband gebracht met de verhoogde PAKs concentraties in de omgevingslucht tijdens de koudere maanden wat mogelijks ook een verklaring is voor de waargenomen verhoogde mutageniciteit tijdens februari en maart.

Resultaten van vroegere studies geven aanwijzingen dat de weersomstandigheden een belangrijke rol spelen bij de inductie van genotoxische effecten (Schoeters *et al.*, 2001; Ducattian Vargas, 2003; Zhao *et al.*, 2002; Binkova *et al.*, 2003; Cerna *et al.*, 1999). Seizoensvariaties werden meermaals aangetoond.

Er werd voor temperatuur geen verband gevonden met hormoonverstorende activiteit.

Voor radicaal generend vermogen en temperatuur is de lineaire associatie niet significant ($r = -0.002$, $p = 0.989$), maar er kan wel een kwadratisch verband voor temperatuur waargenomen worden (Figuur 54). Een regressiemodel met temperatuur en de kwadratische term voor temperatuur toont een significant niet-lineair verband en verklaart 28% ($= r^2$) van de variatie in het radicaalgenererend vermogen (logaritmisch getransformeerd).

Over de verschillende temperaturen kan de component specifieke toxiciteit van PM verschillen. Het hoger radicaal generend vermogen tijdens de winter of tijdens koude dagen kan worden verklaard door inversies die gepaard gaan door een sterke verhoogde PM concentratie, waarbij ook een toename van blootstelling aan transitie metalen, verantwoordelijk voor het radicaal generend vermogen. De verhoogde inflammatoire respons die wordt gezien tijdens de zomer kan in verband gebracht worden met het verhoogde radicaalgenererend vermogen van fijn stof bij een hogere omgevingstemperatuur.



Figuur 54: Radicaalgenererend vermogen dagelijkse luchtstalen in relatie tot temperatuur ($r^2 = 0.28$ R-square van regressiemodel met temperatuur en kwadratische term)

5.3.2. NEERSLAG

Er werd voor neerslag geen significant verband gevonden met het cytotoxisch, inflammatoir, mutageen en de hormoonverstorende activiteit, terwijl er een duidelijk significant negatieve associatie is tussen het radicaalgenererend vermogen van de partikels en de hoeveelheid neerslag. De Spearman correlatie bedraagt -0.32 ($p=0.02$).

5.3.3. WINDSNELHEID

De windsnelheid is positief gecorreleerd met het cytotoxisch effect van de partikels ($r=0.67$, $p=0.024$) en negatief met het immunotoxisch effect (il-6: $r=-0.95$, $p<0.0001$; il-8: $r=-0.93$, $p<0.0001$), de oestrogene activiteit ($r=-0.71$, $p=0.015$) en het radicaalgenererend vermogen ($r=-0.58$, $p<0.0001$).

Eerder werd aangetoond dat het cytotoxisch karakter van fijn stof in verband kan gebracht worden met de aanwezigheid van bodemstofelementen (Steeenberg *et al.*, 2006; Van Den Heuvel *et al.*, 2008). De negatieve associaties van de effectgerichte metingen met windsnelheid zouden verklaard kunnen worden door een groter aandeel bodemstofelementen in vergelijking met andere potentieel schadelijke stoffen in het zwevend stof bij sterke wind waardoor het cytotoxisch karakter van de partikels toeneemt. Voor de huidige campagne zijn er geen gegevens over elementenanalyse in PM10 beschikbaar.

Voor windsterkte en radicaalgenererend vermogen is de lineaire associatie niet significant ($r=-0.07$, $p=0.638$).

5.3.4. WINDRICHTING

De windrichting tijdens de meetcampagne werd in kaart gebracht (windrozen) voor beide locaties (Figuur 55).

Uit de windrozen van 2009 voor Luchtbal Antwerpen en Houtem (Figuur 56) en de windrichtingdata van de afgelopen jaren (meteo Luchtbal 2003-2009) (Tabel 32) blijkt dat de

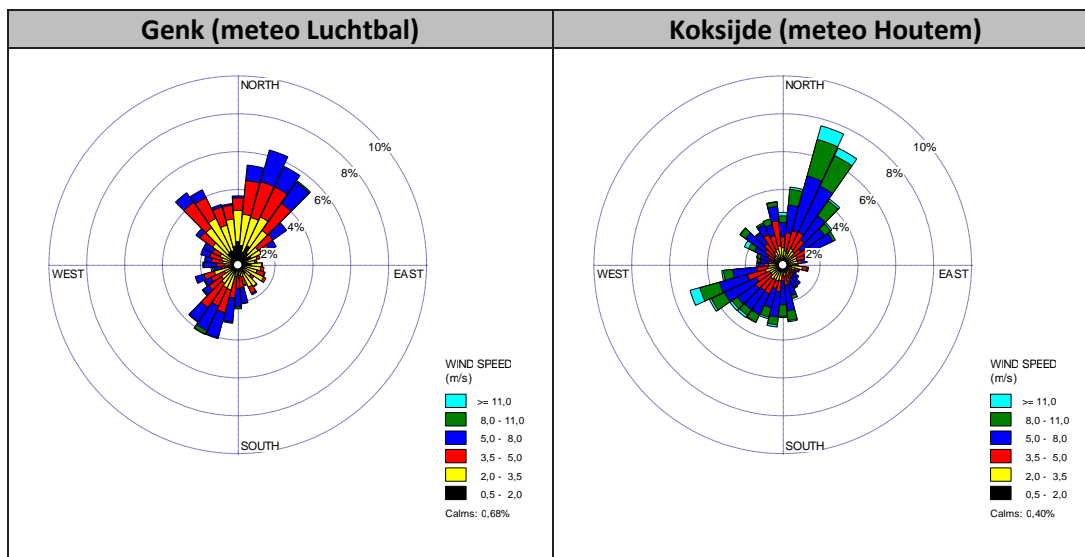
overheersende windrichting het zuidwesten is. In tegenstelling tot de voorbije jaren is er tijdens de meetperiode februari-juli 2010 zowel in Houtem als in Luchtbal meer wind uit het noordoosten en minder uit het zuidwesten. Deze trend van de eerste helft van 2010 wordt ook gezien als het volledige kalenderjaar 2010 in beschouwing wordt genomen (Tabel 32). De vermindering van het aandeel ZW wind tijdens de meetcampagne betekent dat er in Houtem minder aanvoer is van lucht afkomstig van de industriezone in Duinkerke en in Genk minder aanvoer van lucht afkomstig van de industriezone in Genk-Zuid.

Figuur 57 toont de windrozen voor de opeenvolgende campagnemaanden. Er werden enerzijds windrozen opgemaakt voor de volledige maand, rekening houdend met alle dagen van de maand en windrozen per maand waarbij er alleen rekening werd gehouden met de dagen van de staalname. Uit de vergelijking van de windrozen kunnen we besluiten dat de windrozen voor de meetcampagne representatief zijn voor de hele maand.

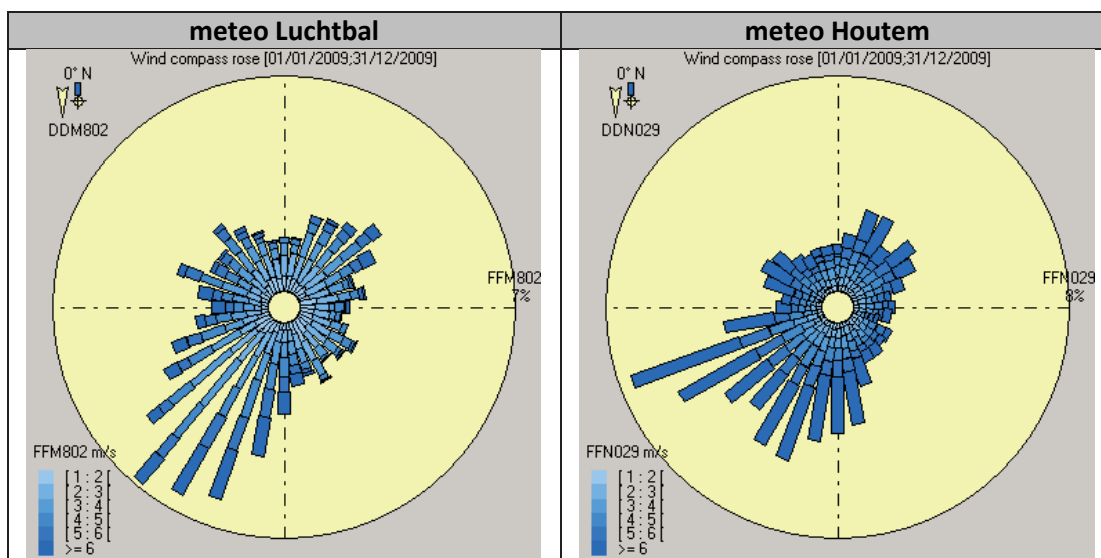
Uit de windrozen kunnen we afleiden dat zowel in Koksijde als in Genk er meer ZW-Z-ZO wind is in de maanden februari en maart terwijl in april, mei en juni der overheersende windrichting NW-N-NO is. In juli is er dan weer meer wind uit ZW richting. De aanwezigheid van PAKs en zwarte rook in de omgevingslucht is verhoogd in de wintermaanden februari en maart. Piekconcentraties van het carcinogeen metaal Cd worden gemeten in maart. Al deze chemische componenten zijn geassocieerd met het mutageen karakter van de luchtstalen.

Tabel 31: Associatie tussen de biologische effectparameter en de meteorologische condities (Spearman's rank correlatie coëfficiënt, p-waarden, aantal gegevens (n))

Meteo	Cytotoxiciteit			Immunotoxiciteit						Mutageniteit						Endocriene verstoring			Radicaalgenerend vermogen		
	Beas-2B			Il-6(Beas-2B)			Il-8(Beas-2B)			Ames (-S9)/plaat			Ames (+S9)/plaat			MELN test					
	r	p	n	r	p	n	r	p	n	r	p	n	r	p	n	r	p	n	r	p	n
Temperatuur	-0,5	0,142	11	0,55	0,08	11	0,66	0,026	11	-0,72	0,013	11	-0,65	0,029	11	0,14	0,679	11	0	0,989	53
Neerslag	-0,2	0,555	11	0,08	0,811	11	-0,145	0,67	11	0,17	0,611	11	0,16	0,631	11	0,25	0,457	11	-0,32	0,022	52
Windsterkte	0,67	0,024	11	-0,95	<0,0001	11	-0,93	<0,0001	11	-0,1	0,78	11	-0,17	0,611	11	-0,71	0,015	11	-0,07	0,638	52



Figuur 55: Windrozen in meetstations Luchtbal en Houtem tijdens de volledige campagneperiode februari 2010-juli 2010.



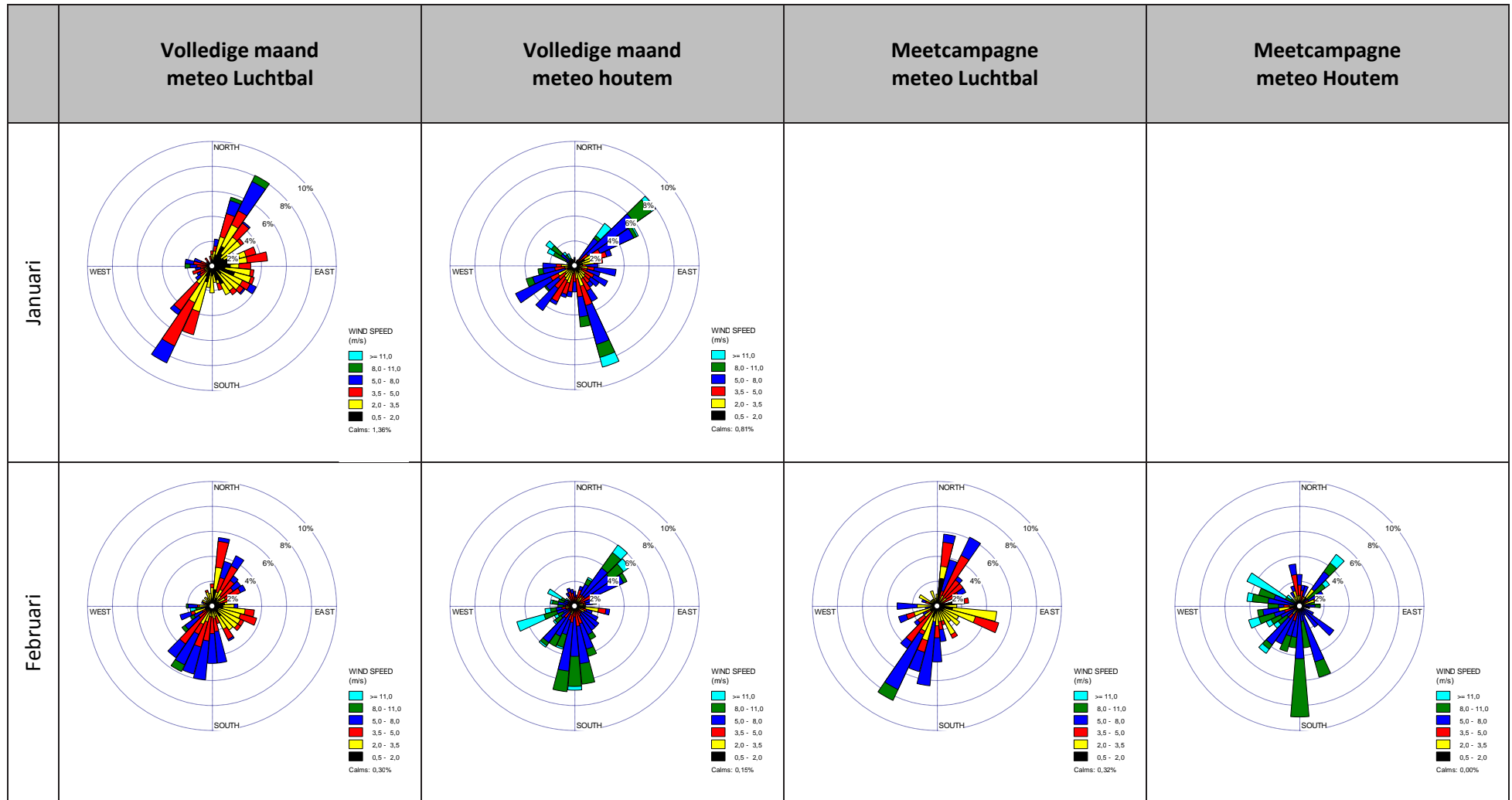
Figuur 56: Windrozen in meetstations Luchtbal en Houtem tijdens het kalenderjaar 2009.

Tabel 32: Windrichting in Vlaanderen tijdens opeenvolgende kalenderjaren (2003-2008).

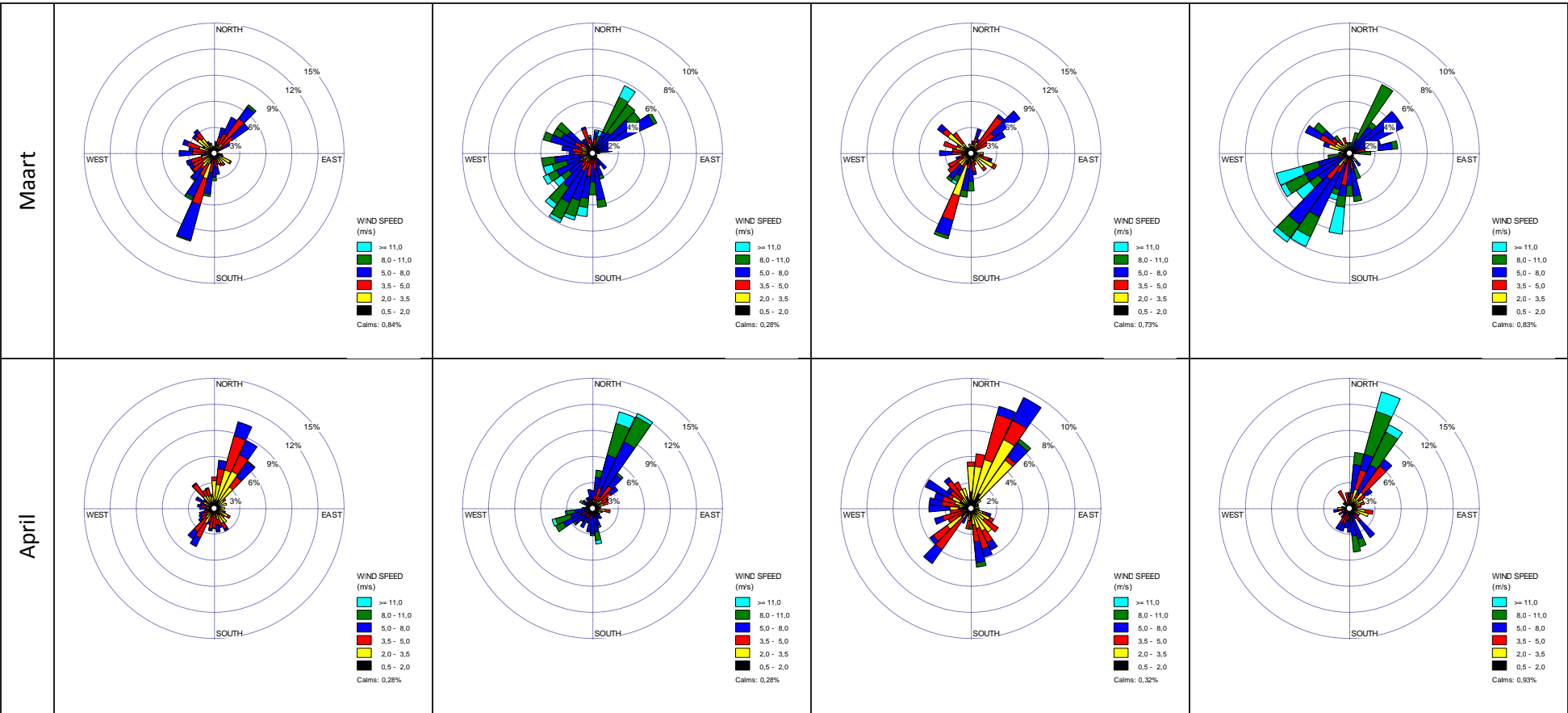
	2003*	2004*	2005*	2006*	2007*	2008*	2009*	2010*	Meetcampagne*§
Sector 355-85 NO	25%	18%	20%	20%	23%	21%	22%	28%	35%
Sector 85-175 ZO	22%	17%	17%	18%	7%	14%	16%	16%	13%
Sector 175- 265 ZW	36%	44%	40%	43%	49%	48%	42%	34%	32%
Sector 265-355 NW	18%	21%	23%	18%	21%	16%	20%	22%	20%

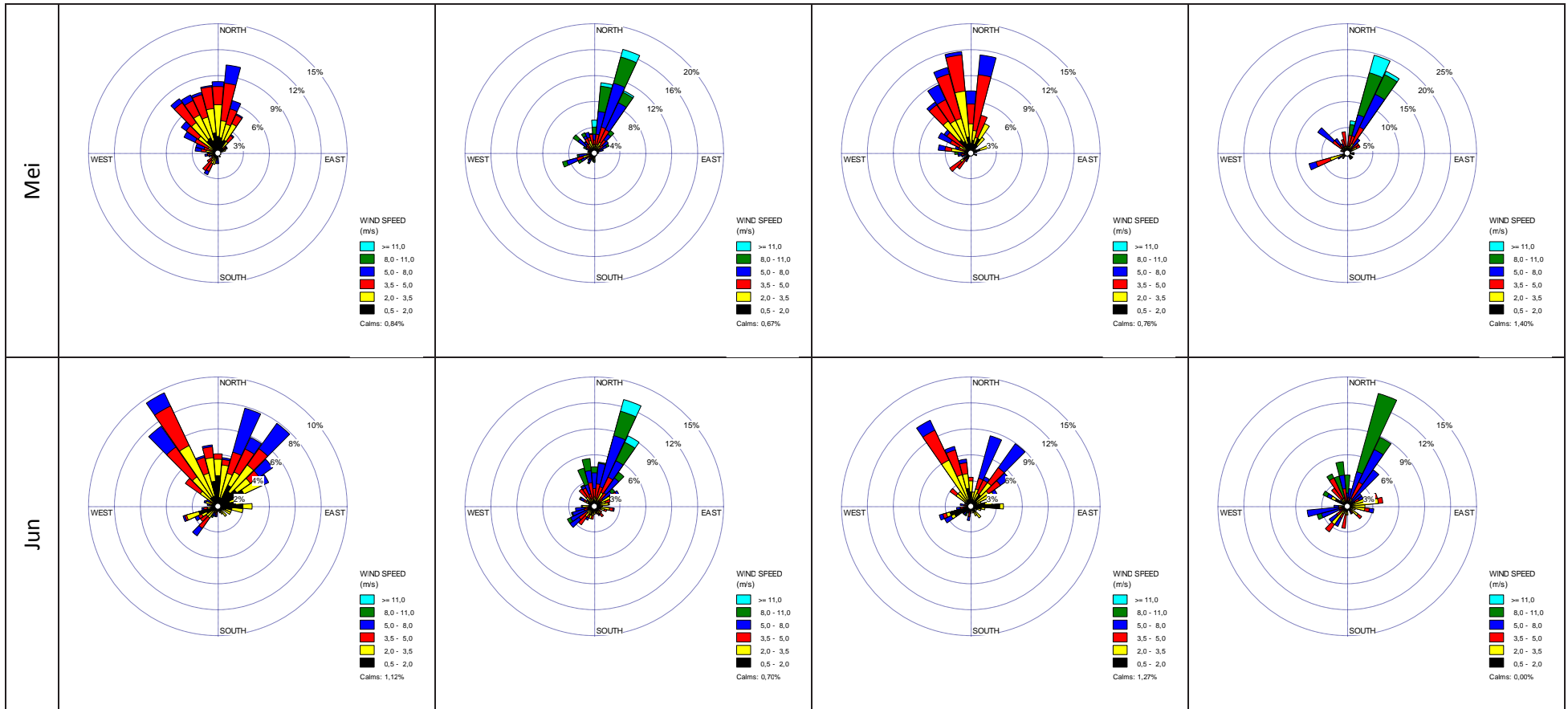
* Bron meteogegevens van de VMM

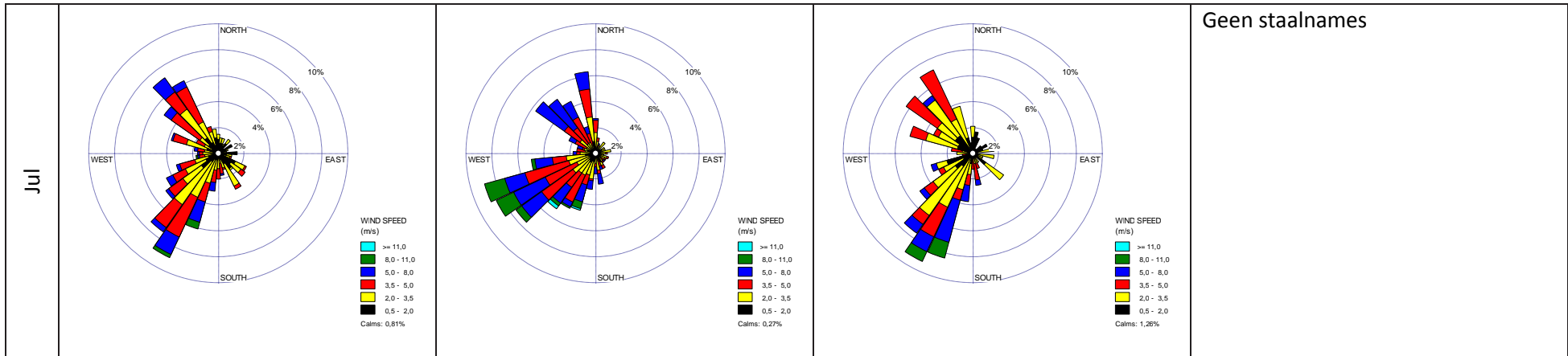
§ Huidige meetcampagne (januari 2010-juli 2010)



HOOFDSTUK 5 Relatie effectgericht meten en polluenten en meteo







Figuur 57: Windrozen in meetstations Luchtbal en Houtem tijdens de maanden van de meetcampagne zowel voor de volledige maand (alle dagen van de maaand) en de dagen van de meetcampagne.

HOOFDSTUK 6. RELATIE EFFECTGERICHT METEN EN HUMANE GEZONDHEID

6.1. GEZONDHEIDSENQUÊTE GENK-ZUID

Naar aanleiding van maatschappelijke signalen in de regio Genk-Zuid werd in 2006 een milieu-gezondheidsenquête uitgevoerd (Nelen *et al.*, 2007). Deze enquête schetst een beeld van de gepercipieerde milieuhinder en het eventueel verhoogd voorkomen van gezondheidsklachten in de populatie. De doelgroep van deze enquête was de volwassen bevolking (20-70 jaar) wonend in wijken rondom het industriegebied Genk-Zuid, in de steden Bilzen en Genk en de gemeenten Diepenbeek en Zutendaal en een controlegroep van dezelfde leeftijd in de rest van de betrokken steden en gemeenten.

In de enquête werd gepeild naar het voorkomen van onderstaande ziekten of aandoeningen die de deelnemer de afgelopen 12 maanden heeft gehad:

- Cardiovasculaire aandoeningen
- Kanker
- Luchtwegaandoeningen
- Gebruik van slaap-, kalmeermiddelen en antidepressiva
- Psychische gezondheid

De gezondheidseffecten waarvoor significante verschillen (zonder en na correctie voor confounders) werden gevonden, worden in Tabel 33 samengevat. In deze tabel worden

- de case gebieden van alle gemeenten samen vergeleken met de controle gebieden;
- per gemeente de case gebieden vergeleken met de controlegebieden;
- de verschillende wijken in Genk met elkaar vergeleken.

Bij peiling naar het voorkomen van verschillende ziekten en aandoeningen kwamen alleen luchtwegaandoeningen meer voor in de case gebieden rondom Genk-Zuid tegenover de controle gebieden. Het verschil in luchtwegklachten blijft na correctie voor gekende risicofactoren maar verdwijnt bij in rekening brengen van socio-economische factoren.

Tabel 33: Resultaten van de gezondheidsenquête Genk-Zuid

Gebieden	Gezondheidseffect	Significante verschillen		
		zonder correctie	na correctie voor confounders	na extra correctie voor socio-economische factoren
Totaal	Algemene gezondheidstoestand	ja	ja	ja
	Luchtwegaandoeningen	ja	ja	nee
	Gebruik van slaap- kalmeermiddelen en anti-depressiva	ja	ja	ja
Bilzen	Algemene gezondheidstoestand	ja	ja	ja
	Cardiovasculaire aandoeningen	nee	ja*	nee
Diepenbeek	Luchtwegaandoeningen	ja	ja	nee
	Gebruik van slaap- kalmeermiddelen en anti-depressiva	ja	ja	ja
Zutendaal	Kanker	nee	nee	ja*

Genk	Algemene gezondheidstoestand	Ja	ja	ja
	Gebruik van slaap- kalmeermiddelen en anti-depressiva	nee	ja	ja
Genk wijken	Algemene gezondheidstoestand	Ja	ja	ja
	Cardiovasculaire aandoeningen	Ja	ja	nee
	Gebruik van slaap- kalmeermiddelen en anti-depressiva	nee	nee	ja
	Stress-score	Ja	ja	ja

*Significant doch meer in het controle gebied

6.2. OVERZICHT VAN DE EFFECTMERKERS IN DE HBM-STUDIE VAN DE HOTSPOT GENK-ZUID

De resultaten van de humane biomonitoringscampagne in de hotspot Genk-Zuid zijn beschikbaar via het Steunpunt Milieu en Gezondheid van de Vlaamse Overheid. In totaal werden 197 adolescenten onderzocht waarvan 147 tijdens de campagneperiode van de huidige studie.

De volgende effectbiomerkers werden onderzocht:

- Allergieën
- Recente ziekten (afgelopen 14 dagen)
- Hormoonverstoring (puberteitsontwikkeling, geslachtshormoon, endocriene verstoring, schildklierhormoon)
- DNA-schade (komeetttest)
- Oxidatieve schade (8-OH-deoxyguanosine)

De resultaten van de effectmerkers in de studiepopulatie werden vergeleken met de resultaten van de Vlaamse referentiepopulatie. Een overzicht van de resultaten is terug te vinden in Tabel 34 en Tabel 35 en Figuur 58. Als algemene conclusie van de waargenomen gezondheidseffecten in Genk kan gesteld worden dat er (1) voor het voorkomen van astma en allergie geen verschil is met Vlaanderen, behalve lagere incidentie dierenallergie en een trend voor hogere incidentie van eczeem; (2) voor genotoxische effecten een significante verhoging van komeetwaarden in vergelijking met Vlaamse referentiewaarden; (3) voor hormonen en puberteit er aanwijzingen zijn dat er meer jongens het volwassen stadium bereikt hebben.

Tabel 34: Resultaten van de humane biomerkers voor astma&allergie in de hotspot Genk-Zuid: vergelijking met de Vlaamse referentiepopulatie

RUWE DATA				GECORRIGEERDE DATA		
ASTMA & ALLERGIE	Genk	Vlaanderen	P	β Genk *	p	CONFOUNDERS + COVARIATEN
astma - doctor diagnosed	9,14	9,38	0,94	1,06	0,88	roken, familiaal astma, leeftijd
astma - laatste 12 ma.	14,53	16,15	0,67	0,83	0,55	roken, familiaal astma, leeftijd
astma - ooit	21,79	22,04	0,95	0,94	0,81	roken, familiaal astma, leeftijd
hooikoorts - doctor diagnosed	20,86	25,91	0,25	0,77	0,32	roken, familiale hooikoorts, leeftijd
hooikoorts - ooit	28,72	32,98	0,37	0,82	0,41	roken, familiale hooikoorts, leeftijd
eczeem - ooit	20,97	14,21	0,09	1,46	0,18	roken, familiale allergie, leeftijd
allergie voeding, insect, medicatie	24,28	19,08	0,24	1,30	0,33	roken, familiale allergie, leeftijd
allergie metaal, chem.stoffen	18,97	19,89	0,83	0,65	0,17	roken, familiale allergie, leeftijd
allergie, dieren	4,97	10,64	0,05	0,43	0,04	roken, familiale allergie, leeftijd

GENOTOXICITEIT	Genk	Vlaanderen	p	β Genk *	p	CONFOUNDERS + COVARIATEN
komeet (standaard) (% DNA)	4,43	3,39	<0,001	1,21	<0,001	leeftijd, geslacht, roken, seizoen
komeet (na fpg enzyme) (% DNA)	4,99	4,38	0,24	1,15	0,23	leeftijd, geslacht, roken, seizoen
8-OH-dexoyguanosine ($\mu\text{g/l}$)	14,5	14,6	0,9	0,94	0,19	SG, leeftijd, geslacht, roken, duur urinecollectie

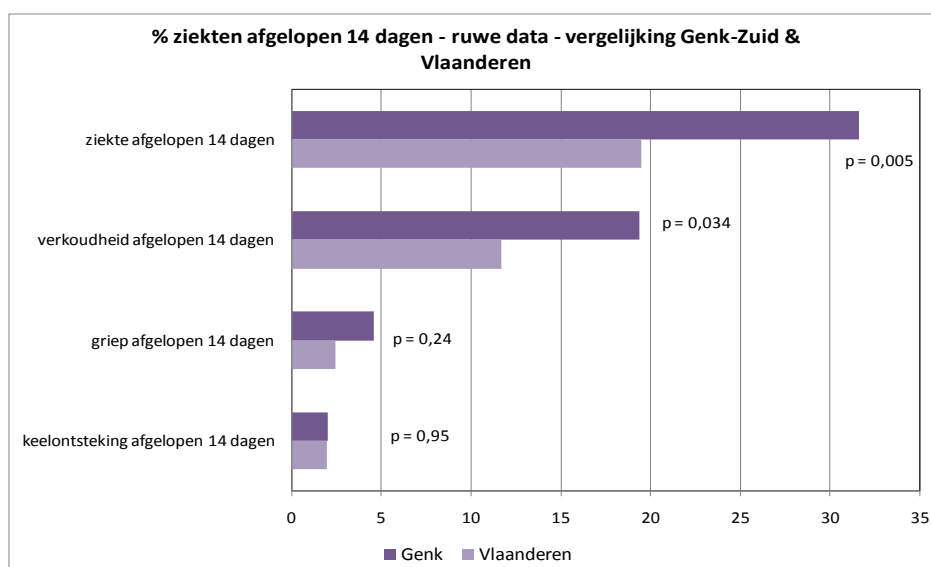
Tabel 35: Resultaten van de humane biomerkers voor hormoonwaarden en puberteitsontwikkeling in de hotspot Genk-Zuid: vergelijking met de Vlaamse referentiepopulatie.

RUWE DATA			
HORMONEN	Genk	Vlaanderen	p
TSH (μU/ml)	2,22	2,11	0,26
fT4 (pg/ml)	1,21	1,26	0,002
fT3 (pg/ml)	4,15	3,97	<0,001
SHBG (nmol/l)	38,7	42,9	0,11
Testosteron (ng/dl)	363	318	0,19
Vrij testosteron (ng/dl)	5,6	3,3	<0,001
Oestradiol (pg/ml)	21,7	17,5	0,003
Vrij oestradiol (pg/ml)	0,31	0,2	<0,001
LH (mU/ml)	3,03	2,84	0,43
FSH (mU/ml)	3,83	3,9	0,82
ratio T/E	16,7	18,1	0,28

GECORRIGEERDE DATA		
β Genk *	p	CONFOUNDERS + COVARIATEN
1,04	0,42	leeftijd, geslacht, BMI, recent ziek, opleiding
0,95	<0,001	leeftijd, geslacht, BMI, recent ziek, alcohol, seizoen, opleiding
1,07	<0,001	leeftijd, geslacht, BMI, recent ziek
0,93	0,2	leeftijd, BMI, nuchter bij staalafname, roken
1,07	0,46	leeftijd, BMI, staalafname vóór 11 uur, roken, opleiding
1,57	<0,001	leeftijd, BMI, staalafname vóór 11 uur, roken, seizoen, opleiding
1,16	0,04	leeftijd, BMI, staalafname vóór 11 uur, roken, opleiding
1,37	0,003	leeftijd, BMI, staalafname vóór 11 uur, roken, seizoen, recent ziek
1,02	0,82	leeftijd, BMI, roken, seizoen, opleiding
0,95	0,55	leeftijd, BMI, roken, opleiding
0,96	0,55	leeftijd, BMI, staalafname vóór 11 uur, roken

PUBERTEIT	Genk	Vlaanderen	p
Borstontw. meisjes (B5 bereikt)	73,0	53,9	0,02
Pubisbehaving meisjes (P5 bereikt)	72,7	53,2	0,02
Reeds menarche meisjes	93,4	90,9	0,52
Regelmatische menses meisjes	70,2	54,8	0,048
Genitale ontw. jongens (G4 bereikt)	87,3	81,8	0,38
Pubisbehaving jongens (P4 bereikt)	83,6	82,0	0,80

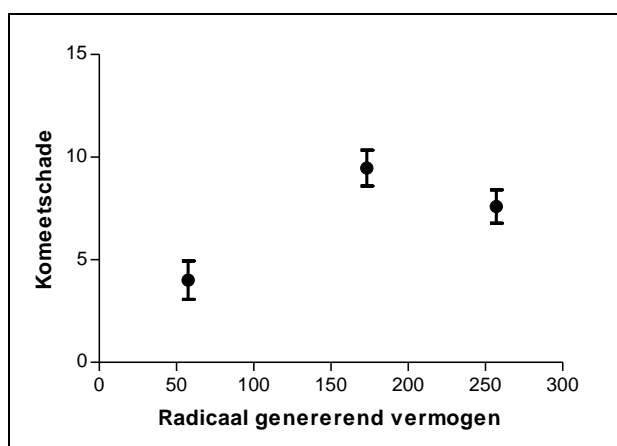
β Genk *	p	CONFOUNDERS + COVARIATEN
2,60	0,02	leeftijd, BMI, roken, pil
3,30	0,01	leeftijd, BMI, roken, pil, opleiding
0,97	0,96	leeftijd, BMI, roken
2,53	0,02	leeftijd, BMI, roken
1,85	0,31	leeftijd, BMI, roken
1,21	0,73	leeftijd, BMI, roken



Figuur 58: Resultaten van de humane biomerkers voor recente ziekten in de hotspot Genk-Zuid: vergelijking met de Vlaamse referentiepopulatie

6.3. RELATIE VAN RADICAALGENEREREND VERMOGEN VAN PM10 TOT BIOMERKERS VAN RECENTE BLOOTSTELLING

Gedurende de meetcampagne vonden 9 onderzoeksdagen plaats en werden 126 adolescenten onderzocht. PM-massa en het radicaal genererend vermogen gemeten 1 dag voor de bloedname verklaarde samen 20% van de variatie in de oxidatieve-komeetttest (Tabel 36), terwijl de klassieke komeetttest en de urinaire uitscheiding van 8-deoxy-hydroxyguanosine geen significante associaties vertoonden.



Figuur 59: Resultaten van de humane biomerkers voor oxidatieve komeetttest in de hotspot Genk in functie van tertielen van het radicaal genererend vermogen van fijn stof (PM₁₀). Het radicaal genererend vermogen werd bepaald op 24 uur stalen verzameld op de dag voor de bloedname. Gegeven is de gemiddelde (95% betrouwbaarheidsinterval) oxidatieve komeetschade met correcties voor geslacht, leeftijd, BMI, roken en PM₁₀ massa. Overall p=0.003

Omdat het aantal meetdagen relatief klein is en de distributie van de variabelen niet normaal is verdeeld werden ook partiële of gecorrigeerde correlatiecoëfficiënten berekend op basis van een niet-parametrische test (Spearman rank) (Tabel 36). De comet-ox blijft significant geassocieerd met het OH generende capaciteit van PM₁₀ 1 dag voor de bloedname in de niet-parametrische analyse.

Deze bevindingen die voor de eerste keer het radicaal generende vermogen van fijn stof linkt met humane toxiciteit (komeetttest) in een populatie is consistent met eerdere gegevens van *in vitro* onderzoek (Shi *et al.*, 2006).

Tabel 36: Partiële correlatie coëfficiënten tussen radicaal biomerkers van oxidatieve DNA-schade en radicaal generende vermogen van PM₁₀

	Parametrisch		Niet-parametrisch	
	r	p	r	p
Comet ox.				
Radical PM	0.31	0.0005	0.21	0.0207
PM ₁₀ *	0.17	0.066	0.04	0.66
Comet				
Radical PM	0.16	0.07	0.009	0.92
PM ₁₀ *	0.19	0.03	0.1	0.27
DGUA				
Radical PM	0.11	0.15	0.13	0.15
PM ₁₀ *	0.13	0.14	0.11	0.20

Pearson en spearman rank werden respectievelijk gebruikt voor Parametrische en niet-parametrische tests. Partiële correlaties werden gecorrigeerd voor voor geslacht, leeftijd, BMI, roken en voor PM10 massa. Partiele correlatie gecorrigeerd voor radicaal generend vermogen (ipv PM10 massa).

6.4. RELATIE VAN DE EFFECTGERICHTE METINGEN TOT HUMANE BIOMERKERS VAN EFFECT

Met behulp van biologische testen werd in deze studie relevante informatie verzameld met betrekking tot het schadelijk karakter van de omgevingslucht in Genk-Zuid en Koksijde. De effectgerichte metingen tonen aan dat de luchtstalen die werden verzameld in Genk verhoogde mutagene en respiratoir inflammatoire effecten en verhoogde oestrogene activiteit vertoonden ten opzichte van de luchtstalen afkomstig van de achtergrondlocatie Koksijde.

De *in vitro* testen geven een beeld over de potentiële gezondheidseffecten van het fijn stof. Op basis van de resultaten van de effectgerichte metingen zou men een verhoging van respiratoire klachten, hormoonverstoring en DNA-schade verwachten in de Genkse populatie tov de controlepopulatie. Er werd nagegaan in hoeverre deze hypothese bevestigd kan worden met de beschikbare gezondheidsgegevens uit de HBM-studie.

De inductie van il-6 en il-8 in de bronchiale epitheelcellen na blootstelling aan PM10 wijzen op het inflammatoir karakter van de partikels. De beschikbare gezondheidsgegevens geven weinig informatie over long- en luchtwegaandoeningen.

In de gezondheidsenquête Genk-Zuid kwamen luchtwegaandoeningen meer voor in de case gebieden rondom het industrieterrein Genk-Zuid tegenover de controlegebieden na correctie voor confounders. In de gemeente Genk en Bilzen werden meer luchtwegklachten gerapporteerd in het case gebied tov het controle gebied maar het verschil was niet significant. Voor de gemeente

Diepenbeek zijn de verschillen in luchtwegklachten tussen het case en controle gebied wel significant. De luchtwegaandoeningen die in de enquête werden bevraagd zijn astma, chronische bronchitis, longemfyseem, stoflong en COPD. Bij deze bevraging kan geen onderscheid gemaakt worden tussen allergische aandoeningen en andere luchtwegklachten.

In de HBM-studie werd gekeken naar het voorkomen van astma en allergie. In de voorgelegde vragenlijst werden luchtwegklachten niet specifiek bevraagd. Bij de bevraging van recente ziekten is er een verhoging van het voorkomen van verkoudheden tijdens de afgelopen 14 dagen in vergelijking met de referentiepopulatie. Hierbij moet echter de opmerking gemaakt worden dat in de HBM-studie er meer onderzoeksdagen plaatsvonden in de wintermaanden in vergelijking met de referentie HBM.

Het perceptieonderzoek dat werd uitgevoerd in de HBM-studie geeft aan dat de jongeren van mening zijn dat er meer luchtwegklachten voorkomen in de hotspot Genk-Zuid.

De effectgerichte meting van de inflammatoire cytokines in bronchiale epitheelcellen geeft een indicatie over het inflammatoir karakter van het testitem en is niet geschikt voor het screenen van het sensitiserend potentieel (inductie van allergische reactie). Deze studie leert ons enerzijds dat er in de toekomst best een specifieke bevraging gebeurt van de studiepopulatie naar luchtwegklachten (vb bronchitis). Anderzijds moet de optie om een *in vitro* test voor het opsporen van sensiterende stoffen mee te nemen in de batterij van effectgerichte metingen overwogen worden.

De resultaten van de Ames test tonen aan dat de luchtstalen uit Genk een verhoogde mutagene potentie vertonen. In de HBM-studie is er een significante verhoging van komeetwaarden in vergelijking met Vlaamse referentiewaarden. Het resultaat van de effectgerichte meting dat een indicatie geeft van mogelijke genotoxische effecten wordt bevestigd door de effectmerker voor genotoxiciteit in de HBM-studie.

In de huidige studie werd endocrien versturende activiteit in de PM10-extracten afkomstig van Genk-Zuid waargenomen. In de HBM-studie werden significante verschillen waargenomen in hormoonwaarden en puberteitsontwikkeling in vergelijking met referentie populatie. De invloed etniciteit en leeftijdsdistributie moet echter nog verder onderzocht worden.

In de HBM-studie zullen blootstelling-effect relaties worden geanalyseerd. Of dezelfde associaties tussen luchtmetingen en humane effectmerkers worden gezien als tussen de luchtmetingen en de eindpunten in deze effectgerichte meetcampagne dient verder te worden opgevolgd.

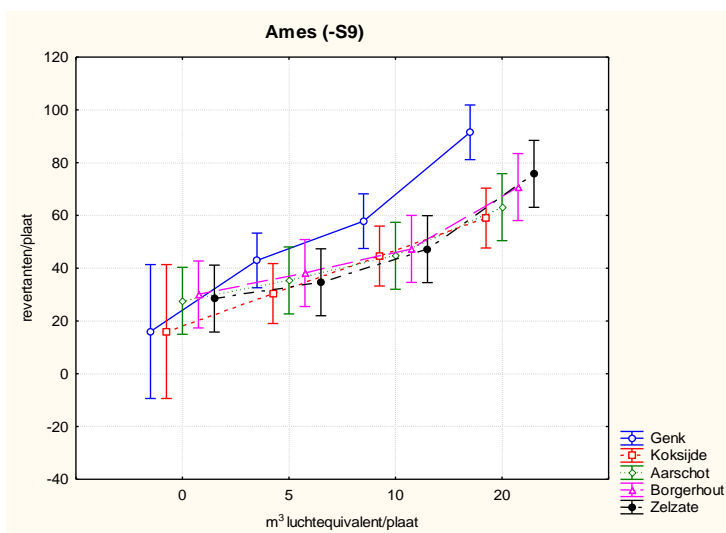
HOOFDSTUK 7. VERGELIJING MET PILOOTPROJECT (2006-2007)

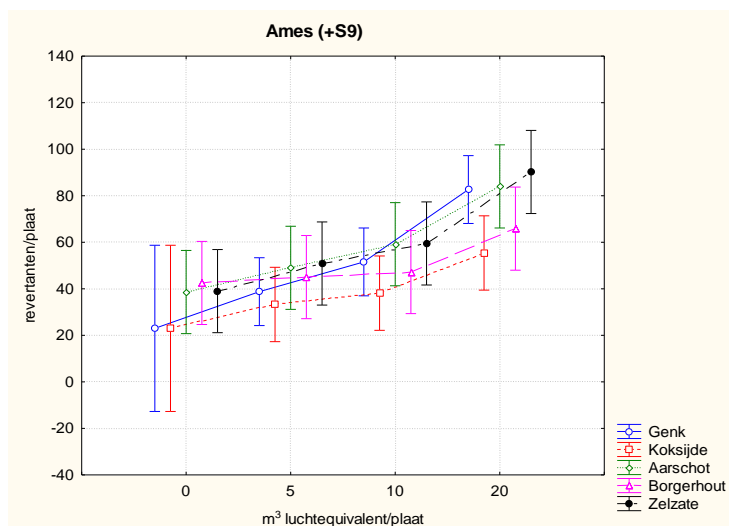
In opdracht van de dienst Milieu & Gezondheid van het departement LNE werd een pilootproject voor effectgerichte metingen in omgevingslucht uitgevoerd ("Uitwerken en uitvoeren van een pilootproject voor effectgerichte metingen om de luchtkwaliteit in Vlaanderen te kunnen evalueren" (OL200500031)) (Van Den Heuvel *et al.*, 2008). 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) verzameld. Het mutageen, inflammatoir, cytotoxisch en hormoonversturend karakter van de luchtstalen werd nagegaan met behulp van *in vitro* testsystemen.

De resultaten van huidige studie werden vergeleken met de resultaten van het Pilootproject effectgericht meten. Om beide studies te vergelijken werden voor het pilootproject alleen de resultaten van de bemonsteringsdagen in een vergelijkbare periode van het jaar (februari 2007-juli 2007) in beschouwing genomen. In deze periode vonden 15 bemonsteringsdagen plaats.

7.1. AMES TEST

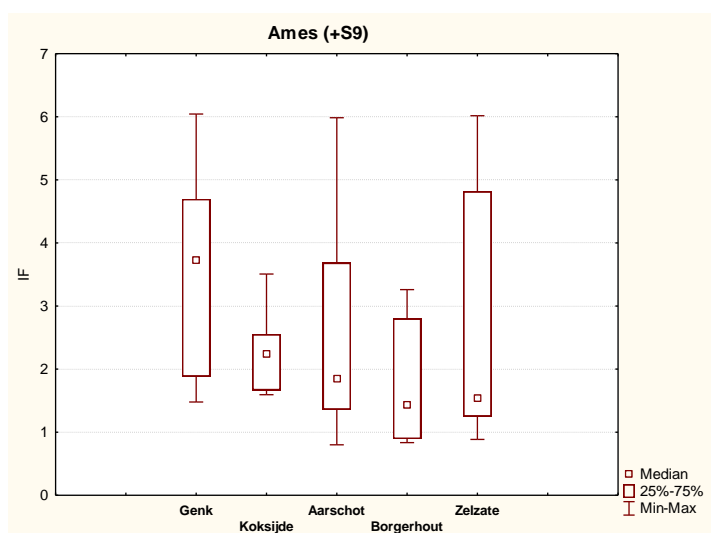
In beide studies werden ASE-extracten gemaakt van de beladen filters en werd dezelfde concentratiereeks van m^3 luchtequivalent getest. De concentratie-effect curven worden weergegeven in Figuur 60. Statistische vergelijking van de verschillende locaties toont aan dat het direct mutageen signaal in Genk verhoogd is ten opzichte van dat van de andere locatie over de volledige periode (Factorial Anova, Tukey posthoc, $p < 0.005$). Voor de indirecte mutageniciteit kon alleen een statistisch significant verschil aangetoond worden tussen Koksijde en Zelzate (Factorial ANOVA, Tuckey posthoc, $p = 0.03$)

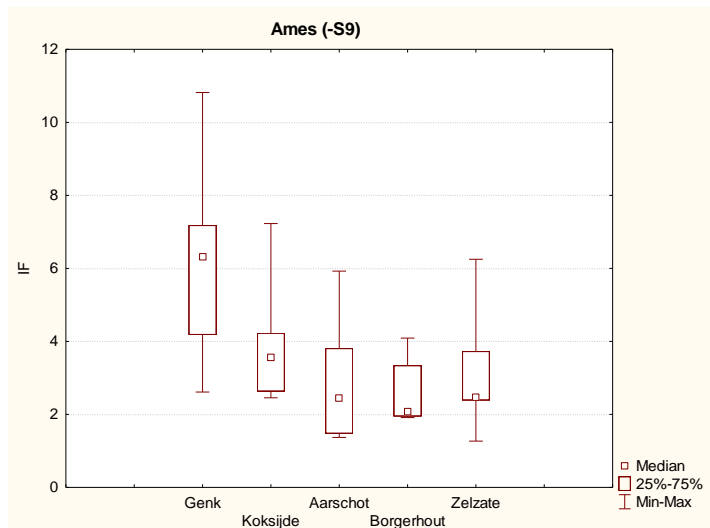




Figuur 60: Directe (-S9) en indirecte (+S9) mutageniciteit van de luchtstalen (revertanten/plate) afkomstig van Genk (n=6), Koksijde (n=5), Aarschot (n=13), Borgerhout (n=12) en Zelzate (n=14). (gemiddelde \pm 95% CL)

Omdat er in de huidige studie met gepoolde stalen per maand werd gewerkt, werd voor de Ames resultaten (IF bij blootstelling aan 20 m³ lichtequivalent) van de pilootstudie een gemiddelde berekend van de verschillende filters per maand. De IF van de verschillende locaties werden dan vergeleken in een gepaarde t-test. Ook hier bleek er een statistisch significant verhoging van de directe mutageniciteit in Genk in vergelijking met de 4 andere locaties (gepaarde t-test, $p < 0.05$). De indirecte mutageniciteit was verhoogd in Genk tov Koksijde en Borgerhout. De IF worden grafisch weergegeven in Figuur 61.





Figuur 61: Directe (-S9) en indirecte (+S9) mutageniciteit van de luchtstalen (IF bij 20 m³ luchtequivalent) afkomstig van Genk (n=6), Koksijde (n=5), Aarschot (n=6), Borgerhout (n=6) en Zelzate (n=6).

In de pilootstudie werd de mutagene potentie (revertanten/20m³ lucht) van de bemonsterde lucht uitgedrukt relatief tov het aantal revertanten/plaat na blootstelling aan 5 µg B(a)P. Deze aanpak toonde aan dat er 2 stalen waren met een mutagene potentie die vergelijkbaar is met deze van 5 µg B(a)P. In de huidige studie werd een concentratiereeks van B(a)P getest in de Ames test. Dit laat toe om de mutagene activiteit van de extracten uit te drukken als B(a)P equivalenten. In Genk komt de hoogst gemeten activiteit overeen met 1.34 µg B(a)P equivalent. De vergelijking van de B(a)P resultaten (aantal revertanten/plaat en IF) uit beide studies en andere experimenten leert ons dat er een grote variatie is tussen de resultaten. Deze variabiliteit wordt veroorzaakt door verschillende factoren: verschillende lotnummers van de petriplaten, de titers van de TA98 verschillen waardoor er meer of min bacteriën werden bloot gesteld aan B(A)P, nooit exact dezelfde temperatuur en incubatietijd (20 minuten verschil bij de overnachtingincubatie zal al een groot verschil in het aantal bacteriën per ml opleveren) enz. Hierdoor kunnen verschillende experimenten niet kwantitatief vergeleken worden. Evaluatiecriteria om te bepalen of een stof al of niet mutageen is, zijn een verdubbeling t.o.v. de solventcontrole (TA98), de dosis-gebondenheid en voldoen aan de aanvaardingscriteria (het gemiddelde van de spontane revertanten, het gemiddelde van de solventcontrole en het gemiddelde van de positieve controle moet binnen de grenzen van de historische waarden vallen).

In het pilootproject werd een verhoogde mutageniciteit vastgesteld in de lente terwijl in de huidige studie een verhoging werd gezien tijdens de wintermaanden.

In de pilootstudie was er een significant positieve relatie tussen de waargenomen mutageniciteit en hoeveelheid PM10/m³ lucht. In de huidige studie werd deze relatie vastgesteld met de hoeveelheid PM2.5/m³ lucht.

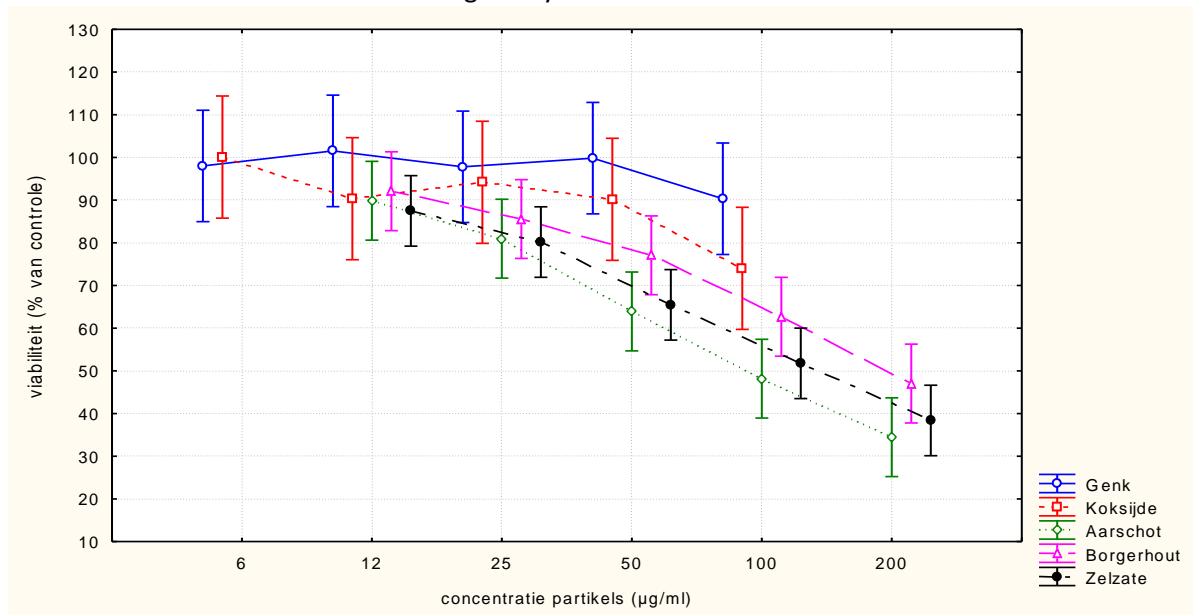
In beide studies werden positieve associaties teruggevonden met de aanwezigheid van PAKs in de omgevingslucht.

7.2. CYTOTOXICITEIT IN BEAS-2B

In de pilootstudie werden bronchiale Beas-2B cellen blootgesteld aan een concentratiereeks van TSP. In de huidige studie gebeurde de blootstelling met PM10. Dosis-respons curven voor de verschillende locaties worden weergegeven in Figuur 62. Het cytotoxisch karakter van TSP

afkomstig van Aarschot, Borgerhout en Zelzate is significant verhoogd in vergelijking met het effect van PM10 uit Genk en Koksijde (Factorial ANOVA, $p < 0.001$).

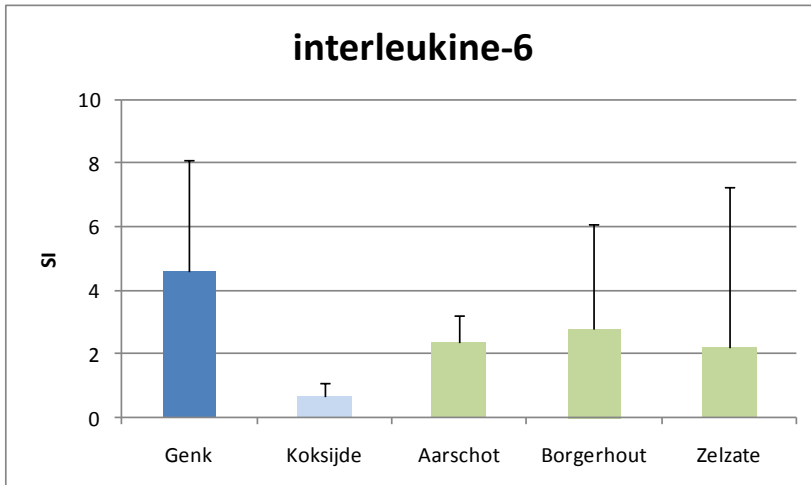
In tegenstelling tot de huidige studie werd in het pilootproject een significant negatieve correlatie aangetoond tussen het cytotoxisch effect van de partikels en de temperatuur. In de pilootstudie was het cytotoxisch karakter geassocieerd met de aanwezigheid van bodemstof (Si, Al, Ca). Deze elementen werden in deze studie niet geanalyseerd.



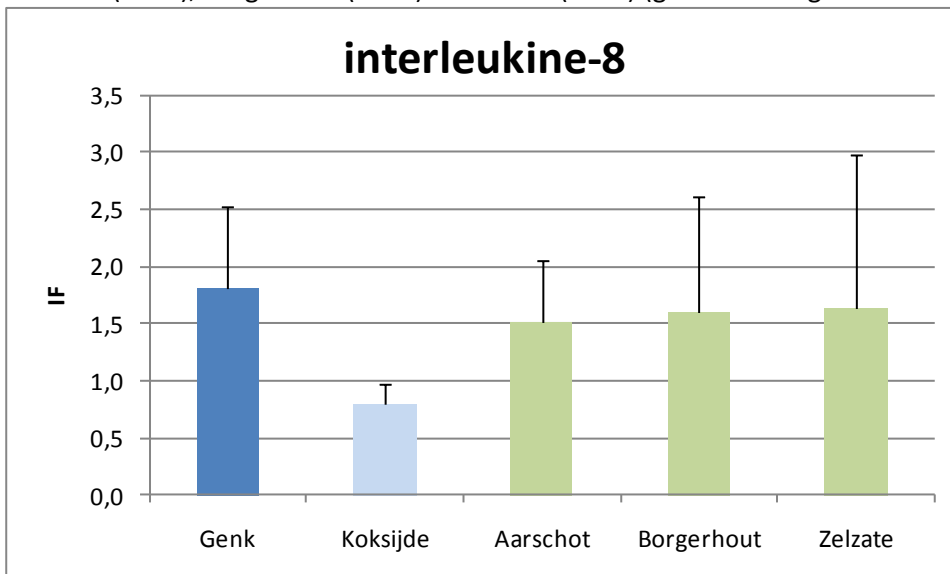
Figuur 62: Cytotoxiciteit van de partikels afkomstig van Genk (n=6), Koksijde (n=5), Aarschot (n=12), Borgerhout (n=12) en Zelzate (n=15). (gemiddelde \pm 95% CL)

7.3. INFLAMMATIE: IL-6 EN IL-8 PRODUCTIE IN BEAS-2B

Na blootstelling van de Beas-2B cellen werd de productie van il-6 en il-8 gemeten in het supernatans. Om beide studies te vergelijken werden de cytokine meetwaarden (pg/ml) uitgedrukt relatief tov de negatieve controle (SI= stimulatie index) (Figuur 63 en Figuur 64). De SI in beide studies werd vergeleken bij een blootstellingconcentratie van PM die een vergelijkbare cytotoxiciteit teweeg brengen (100µg PM10 en 25µg TSP). De SI van de verschillende locaties werden vergeleken in een Kruskal-Wallis test. Il-6 en il-8 inductie is significant verhoogd in Genk in vergelijking met Koksijde ($p < 0.05$). De il-6 verhoging tov van de andere locaties is niet significant. Il-8 inductie is vergelijkbaar tussen Genk, Aarschot, Borgerhout en Zelzate.



Figuur 63: Interleukine-6 inductie van de partikels afkomstig van Genk (n=6), Koksijde (n=5), Aarschot (n=12), Borgerhout (n=12) en Zelzate (n=15).(geometrisch gemiddelde ± 95% CL)



Figuur 64: Interleukine-8 inductie van de partikels afkomstig van Genk (n=6), Koksijde (n=5), Aarschot (n=13), Borgerhout (n=12) en Zelzate (n=15).(geometrisch gemiddelde ± 95% CL)

In tegenstelling tot de huidige studie kon de inflammatoire respons in de pilootstudie niet verklaard worden door de aanwezigheid van metalen in de omgevingslucht. Mogelijks is dit verschil te wijten aan de beperktere concentratierange van de metalen in de pilootstudie (Tabel 37). In beide studies kon een significant positieve associatie met de omgevingstemperatuur aangetoond worden.

De geografische ligging van Koksijde heeft ongetwijfeld een invloed op de samenstelling van de PM10 fractie. In het CHEMKAR project (VMM, 2009) werd voor verschillende stations het aandeel van de hoofdbestanddelen van PM10 onderzocht. De ligging van het station Houtem is vergelijkbaar met de ligging van Koksijde uit de huidige studie. Wanneer de gemiddelde samenstelling over alle stations in beschouwen werd genomen, werd vastgesteld dat PM10 vrij heterogeen opgebouwd is. De 5 (qua massa) belangrijkste componenten(groepen) zijn voor alle stations dezelfde, hoewel hun aandeel wel verschilt van plaats tot plaats. Gemiddeld bedroeg hun aandeel:

1. Secundaire anorganische ionen (NO₃⁻, SO₄²⁻ en NH₄⁺) ⇒ 41% (12,6 µg/m³)
2. Organische massa (OM= OC x factor 1,4) ⇒ 20% (6,1 µg/m³)

3. Bodemstof \Rightarrow 14% (4,3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)
4. Zeezout \Rightarrow 8% (2,4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)
5. Elementaire koolstof (roet) \Rightarrow 4% (1,2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)
6. Onbekende fractie

Hoewel de gemiddelde samenstelling voor de verschillende station over het algemeen goed vergelijkbaar was, konden er toch enkele belangrijke verschillen waargenomen worden. Houtem scoorde voor de meeste componenten (aanzienlijk) onder het gemiddelde. Voor zeezout vertoonde het (zoals verwacht) de hoogste concentratie. Het feit dat de onbekende fractie hier het hoogst was, kan te maken hebben met een te lage omrekeningsfactor voor OM en de hoge concentratie aan (hygroscopisch) zout. Ook de lage concentratie van bodemstof in dit landbouwgebied was opmerkelijk.

Tabel 37: Concentratie range van metalen in de pilootstudie en de hotspot Genk studie.

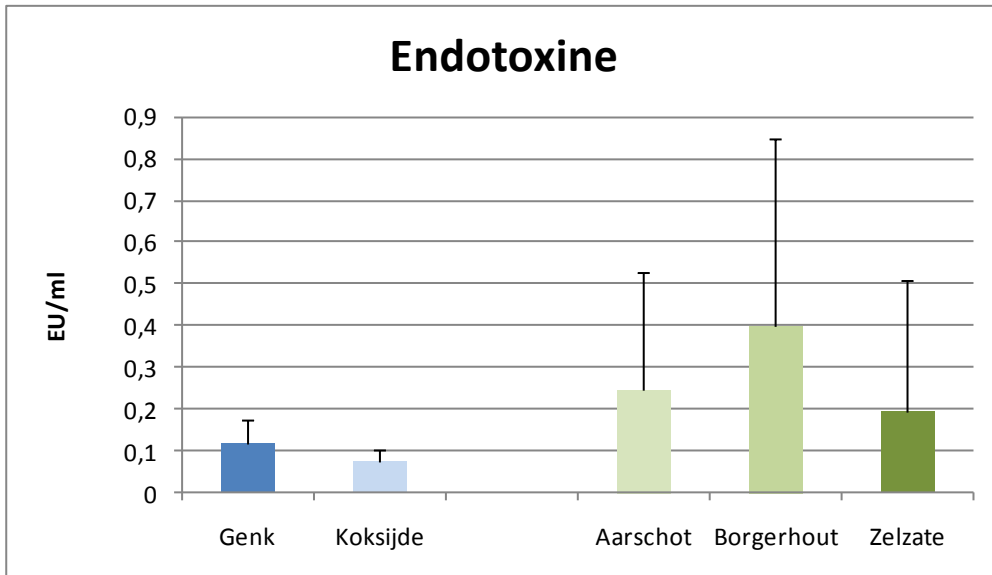
	Pb ng/m ³	Zn ng/m ³	Cu ng/m ³	Ni ng/m ³	As ng/m ³	Mn ng/m ³	Cd ng/m ³	Cr ng/m ³
Hotspot								
min	3,8	3,3	1,6	1,2	0,6	1,2	0,6	1,2
max	153,6	976,0	89,6	276,7	6,0	241,5	73,4	704,7
mediaan	22,7	171,1	13,3	45,7	0,6	17,6	0,6	20,9
Piloot								
min	4,49	1,80	1,0	2,0	0,2	2,5	-	1,2
max	244,18	360,6	48,8	10,7	275,0	58,3	-	14,4
mediaan	16,2	39,6	11,5	4,1	2,0	10,1	-	3,7

7.4. MELN TEST

Met behulp van de MELN assay werden in de pilootstudie en in de huidige studie de aanwezigheid van stoffen met oestrogene activiteit in organische extracten van luchtfilters aangetoond. Door het hoge achtergrondsignaal in de pilootstudie kon niet met de ruwe data van inductie voor oestrogene activiteit per staal gewerkt worden en werd een vorm van normalisatie doorgevoerd. Door deze benadering kan de pilootstudie niet vergeleken worden met de huidige studie in de hotspot Genk-Zuid.

7.5. ENDOTOXINE

De aanwezigheid van endotoxines in het zwevend stof werd bepaald bij de hoogste concentratie van partikels waaraan de Beas-2B werden blootgesteld. In de pilootstudie was dit bij 200 μg TSP en in de huidige studie 100 μg PM10. Door de verschillende partikelconcentraties in beide studies kunnen de resultaten niet vergeleken worden. De gemeten endotoxineconcentraties per locatie worden weergegeven in Figuur 65.



Figuur 65: Endotoxine bepaling van de partikels afkomstig van Genk (n=6), Koksijde (n=5), Aarschot (n=13), Borgerhout (n=12) en Zelzate (n=15).(geometrisch gemiddelde \pm 95%CL)

HOOFDSTUK 8. BESLUIT

Deze studie beoogde het uitwerken en uitvoeren van een project waarin PM10, gecollecteerd op filters in de geselecteerde hot spot Genk-Zuid van het tweede generatie Steunpunt Milieu en Gezondheid, toxicologisch werd gekarakteriseerd door gebruik te maken van biologische testen. Het gelijktijdig uitvoeren van effectgerichte metingen en humane biomonitoring van de plaatselijke bevolking in de geselecteerde hot spot Genk-Zuid en het gelijktijdig gebruik maken van beschikbare fysico-chemische metingen, laat toe een betere relatie te leggen en inschatting te maken van de luchtkwaliteit en de mogelijke gezondheidsrisico's hiervan.

Strategie

In een eerste fase werd een concreet en optimaal geïntegreerde meetstrategie uitgewerkt. Bij de selectie van meetplaatsen, de frequentie en wijze van bemonstering en de keuze van de testen werd rekening gehouden met de strategie die wordt toegepast in de HBM-studie in hotspots. De meetstrategie werd eveneens afgestemd met de lopende fysicochemische metingen in de verschillende VMM-meetnetten. Deze werkwijze laat toe om optimaal gebruik te maken van de beschikbare humane biomerkerresultaten en de fysicochemische data voor de interpretatie van de effectgerichte metingen.

De biomonitoringstrategie in de hotspots bestaat erin de resultaten van de humane biomerkers te vergelijken met de referentiewaarden uit de Vlaamse referentiebiomonitoring die in 2007-2009 werd uitgevoerd. De referentiewaarden dienen als controlewaarde voor de case studies. Omdat we binnen Vlaanderen niet beschikken over 'Vlaamse referentiewaarden' van de luchtkwaliteit die bekomen werden via effectgerichte metingen, werd geopteerd om een meetplaats in Vlaanderen te selecteren die als achtergrondlocatie of landelijk gebied beschouwd wordt in één van de VMM-meetnetten. Concreet betekende dit dat er één meetplaats werd voorzien in de regio Genk-Zuid en één meetplaats in een Vlaams referentiegebied.

Op basis van de inventarisatie van de industrie en op basis van beschikbare milieumeetgegevens vormen zware metalen een belangrijke groep van aandachtspolluenten in de hotspot Genk-Zuid. Daarom werd als achtergrondlocatie in deze studie Koksijde geselecteerd. Koksijde wordt als achtergrondgebied beschouwd in het VMM-meetnet zware metalen in fijn stof (PM10). De keuze van Koksijde is niet optimaal. De geografische ligging aan de kust is niet representatief voor Vlaanderen. De weersomstandigheden zijn verschillend van deze van het binnenland: lagere temperaturen, meer uren zonneschijn, minder neerslag. De samenstelling van zeelucht met verhoogde concentratie van zeezout kan mogelijks ook het toxicologisch profiel van PM10 beïnvloeden.

De frequentie van bemonstering gebeurde in functie van de gezondheidseindpunten die werden gemeten in de HBM-studie in Genk-Zuid. Hiervoor werd een panel van biomerkers voorgesteld dat zowel recente, middellange als levenslange blootstelling meet. Om de luchtkwaliteit van recente blootstelling te kunnen evalueren werd in Genk-Zuid de lucht bemonsterd (24u) de dag voor de onderzoeksdagen van de studiepoulatie. Om een beeld te krijgen van de luchtkwaliteit over een lange termijn werd geopteerd om op regelmatige basis (10 dagen per maand met spreiding in de

tijd) luchtstalen te verzamelen in zowel Genk-Zuid als Koksijde. De bekomen luchtstalen werden per maand gepoold tot één maandstaal).

De frequentie van bemonstering (interval van 3 dagen) blijkt representatief te zijn voor een langere periode wanneer de fysico-chemische samenstelling van PM10 en de meteorologische gegevens in beschouwing worden genomen.

In de huidige studie kon geen beroep gedaan worden op bemonsteringstoestellen van de lopende VMM-meetnetten om divers redenen:

- automatische sampling methodes vb PM10
- dagelijkse sampling vb zware metalen in fijn stof
- bemonstering van andere deeltjesgrootte vb. TSP voor PAKs

Hierdoor werden in de meetpost Genk-Zuid en Koksijde de lucht bemonsterd met verschillende bemonsteringstoestellen. De mogelijke effecten van de verschillende toestellen op de effectgerichte metingen is niet gekend. High-volume samplers hebben pompen die een hoog debiet lucht aanzuigen waardoor er warmte vrij kan komen. Hierdoor kunnen meer vluchtige componenten verdampen en kunnen chemische reacties optreden waardoor de chemische karakteristieken van de bemonsterde lucht en als gevolg daarvan ook de toxicologische eigenschappen kunnen veranderen

Effectgerichte metingen

Bij de keuze van de testen werd enerzijds optimaal gebruik gemaakt van de kennis die werd opgebouwd in de studie "Uitwerken en uitvoeren van een pilootproject voor effectgerichte metingen om de luchtkwaliteit in Vlaanderen te kunnen evalueren" (OL200500031). Anderzijds werd de keuze van de testen afgestemd op de lopende HBM-studie in de hotspot Genk-Zuid. Op basis van de vastgestelde milieuvervuiling in de hotspot Genk-Zuid en de mogelijke gezondheidsimpact daarvan werden biomerkers voor carcinogene, immune, endocriene en neurologische effecten geselecteerd. In de huidige studie werd een batterij van testen geselecteerd om het mutageen, inflammatoir, hormoonverstorend en radicaalgenererend karakter van de luchtstalen te bepalen.

De bemonsterde filters werden verdeeld zodat er van dezelfde filters een deel gebruikt werd voor het bekomen van een organisch extract en een deel gebruikt werd voor het verzamelen van de partikels. Beide extracties werden uitgevoerd nadat alle filters gecollecteerd in dezelfde maand werden gepoold tot één staal. Zowel het mutageen als hormoonverstorend karakter van deze organische extracten als het inflammatoir karakter van de partikels werden bepaald.

Het radicaalgenererend vermogen van de partikels werd uitgevoerd op niet-gepoolde stalen afkomstig van Koksijde en op de stalen verzameld op de dag voorafgaand aan de onderzoeksdagen van de HBM in Genk-Zuid.

Het effect van de locatie, tijdstrends, chemische samenstelling en klimatologische omstandigheden werd onderzocht. Daarnaast werd getracht de resultaten van de effectgerichte metingen te toetsen aan de resultaten van humane biomerkers uit de HBM-studie.

Deze studie heeft aangetoond dat gepoolde luchtstalen kunnen gebruikt worden om de luchtkwaliteit te evalueren. Met behulp van de effectgerichte metingen op gepoolde stalen werd PM10 toxicologisch gekarakteriseerd. Door gebruik te maken van een referentiestof voor elke test werd een toxicologisch profiel opgesteld van Genk-Zuid en Koksijde. Het gemeten effect kan deels verklaard worden door de aanwezigheid van chemische stoffen in de omgevingslucht welke in de VMM-meetnetten werden gemeten. Het gezondheidsrisico geassocieerd met de luchtkwaliteit werd met behulp van de effectgerichte metingen goed ingeschat. Het genotoxisch en endocrien verstorend karakter van de omgevingslucht in Genk-Zuid werd bevestigd door de verhoogde

meetwaarden van humane effectmerkers voor genotoxiciteit en endocriene verstoring in de HBM-studie.

Voor elke effectgerichte meting worden de belangrijkste resultaten hieronder weergegeven.

- Genotoxiciteit (Ames test)

Zowel directe als indirecte mutageniciteit kon vastgesteld worden in de organische extracten. De mutagene potentie van de bemonsterde lucht is verhoogd in Genk-Zuid in vergelijking met Koksijde. In beide locaties was de mutageniciteit verhoogd in de wintermaanden februari en maart. De mutagene activiteit kan deels verklaard worden door de hoeveelheid partikels (PM_{2.5}) in de lucht en deels door de PAKs belading van de partikels en de aanwezigheid van zwarte rook in het fijn stof. Het mutageen karakter is verhoogd in maanden met voornamelijk ZW wind. Het genotoxisch profiel van de lucht in Genk-Zuid wordt bevestigd door de resultaten van humane biomerker voor genotoxiciteit in de HBM-studie. De studiepopulatie in Genk-Zuid vertoonde verhoogde komeetwaarden in vergelijking met Vlaamse referentiewaarden.

- Inflammatie (il-6 en il-8 productie in bronchiale epitheel cellen)-

De productie van il-6 en il-8 in de bronchiale epitheelcellijn Beas-2B na blootstelling aan PM₁₀ is een maat voor het inflammatoir karakter van de partikels. Het bemonsterd PM₁₀ in Genk-Zuid had een sterk inflammatoir potentie terwijl het verzamelde PM₁₀ uit Koksijde nauwelijks een inflammatoir effect induceerde. Er was een duidelijk seizoenseffect. Het gemeten effect was het hoogst in de maandstalen van juni en juli gevold door de lentemaanden april en mei. Het gemeten inflammatoir effect was gecorreleerd met de aanwezigheid van metalen in de omgevingslucht. De inflammatoir potentie is tevens positief geassocieerd met de omgevingstemperatuur en negatief met de windsterkte. In hoeverre de temperatuur een effect heeft op de chemische samenstelling van de bemonsterde PM₁₀ is niet gekend. Of er al dan niet pollen aanwezig waren op de filters en wat hun effect is op de inflammatoir merkers is niet geweten. Door gebrek aan relevante humane biomerkers voor long- en luchtwegklachten in de HBM-studie konden de waargenomen inflammatoir effecten niet getoetst worden aan gezondheidseffecten in de hotspot. De effectgerichte meting van de inflammatoir cytokines in bronchiale epitheelcellen geeft een indicatie over het inflammatoir karakter van het testitem en is niet geschikt voor het screenen van het sensibiliserend potentieel (inductie van allergische reactie).

- Endocriene verstoring (MELN test)

Ondanks de filterachtergrond waarvoor gecorrigeerd werd, kon er supplementaire oestrogene activiteit in organisch extracten van luchtfilters gemeten worden zowel in Genk als in Koksijde. Globaal is het signaal in Genk consistent hoger dan in Koksijde. Er zijn geen uitgesproken seizoensverschillen opgemerkt, hoewel er significante verschillen in concentratie-effect responsen tussen verschillende maanden konden vastgesteld worden. De oestrogene potentie kan deels verklaard worden door de aanwezigheid van zwarte rook en metalen in de omgevingslucht. Welke stoffen verder nog bijdragen tot het gemeten oestrogene signaal kan slechts bepaald worden na toxiciteitgestuurde identificatie van organische stoffen in de extracten. Deze effectgerichte waarnemingen tonen aan dat er potentieel endocrien verstorend stoffen aanwezig zijn in de omgevingslucht in Genk-Zuid. In de HBM-studie werden significante verschillen in effectbiomerkers voor endocriene verstoring waargenomen in vergelijking met de referentiepopulatie.

- Oxidatieve stress (radicaalgenererend vermogen)

Het gemeten radicaal generend vermogen van PM10 is significant hoger voor Genk dan voor Koksijde. Er konden geen seizoenseffecten worden vastgesteld. Het gemeten effect wordt deels verklaard door de concentratie fijn stof (PM10 en PM2.5) in de omgevingslucht en door de aanwezigheid van zware metalen op de partikels. Ook de weersomstandigheden hebben een invloed waarbij het gemeten effect hoger is bij lage en hoge temperaturen en afneemt bij sterke wind en neerslag. Er kon een sterke positieve correlatie aangetoond worden tussen het radicaal generend vermogen van de partikels en de inflammatoire potentie van bemonsterde PM10. Het radicaalgenerend vermogen bepaald op de dagstalen voorafgaand aan de onderzoeksdagen in Genk-Zuid verklaart 20% van de variatie in de oxidatieve komeetttest welke een effectmerkers voor oxidatieve stress is die wijst op recente blootstelling.

HOOFDSTUK 9. AANBEVELINGEN

Op basis van de resultaten van deze studie kunnen volgende aanbevelingen worden geformuleerd.

- Deze studie heeft aangetoond dat 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. Doordat de biotesten ook mengseltoxiciteit meten bieden ze een toegevoegde waarde bij de huidige fysisch-chemische monitoring van de luchtkwaliteit.
- De luchtkwaliteit voor een gegeven locatie kan toxicologische worden gekarakteriseerd. Momenteel zijn er echter geen Vlaamse referentiewaarden voor effectgerichte metingen. Het dient aanbeveling om hiervoor een strategie uit te werken. Deze aanpak kan er in bestaan een strategie op te stellen zoals die momenteel gebruikt wordt voor de HBM-studie in de hotspots. Anderzijds kan er overwogen worden om een achtergrondlocatie te definiëren zoals in de VMM-meetnetten .
- 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.
- 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.
- Om beleidsbeslissingen met betrekking tot fijn stof te verbeteren is het determineren van de risico's en de belangrijkste schadelijke componenten aanwezig op het zwevend stof een aandachtspunt. 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 (toxiciteitsgestuurde identificatie van stoffen).
- Het gebruik van verschillende bemonsteringstoestellen en de hieraan verbonden mogelijke staalname-artefacten en het effect hiervan op de effectgerichte metingen dient verder onderzocht te worden.

- Op basis van de resultaten van deze studie en het pilootproject kan een basisset van testen worden voorgesteld om het schadelijk karakter van de bemonsterde lucht in kaart te brengen: Ames-test (genotoxiciteit), il-6/il-8 in Beas-2B (luchtweginflammatie), radicaalgenerend vermogen (oxidatieve stress), MELN-test (endocriene verstoring). Ames- en MELN-test moeten worden uitgevoerd op extracten van partikels. De partikelfase kan gebruikt worden om het inflammatoir karakter en het radicaalgenererend vermogen te bepalen. Voor de testen op de extracten is er veel materiaal nodig. Hiervoor is bemonstering met een high-volume sampler aangewezen of dienen er verschillende filters voor gebruik in de low-volume samplers gepoold te worden. Low-volume samplers geven voldoende materiaal voor het uitvoeren van de inflammatietest en het bepalen van het radicaalgenererend vermogen van PM.
- De effectgerichte meting van de inflammatoire cytokines in bronchiale epitheelcellen geeft een indicatie over het inflammatoir karakter van het testitem en is niet geschikt voor het screenen van het sensitiserend potentieel (inductie van allergische reactie). Deze studie leert ons enerzijds dat er in de toekomst best een specifieke bevraging gebeurt van de studiepopulatie naar luchtwegklachten (vb bronchitis). Anderzijds moet de optie om een *in vitro* test voor het opsporen van sensiterende stoffen mee te nemen in de batterij van effectgerichte metingen overwogen worden.
- Met behulp van de MELN test werd voor de tweede keer aangetoond dat er stoffen met oestrogene activiteit aanwezig zijn in de omgevingslucht. De keuze van het filtermateriaal is belangrijk voor de MELN test om achtergrondsignaal te vermijden. Verdere optimalisatie (filter keuze) is aanbevolen voor deze test.
- Bepalen van welke chemische determinanten (vb organische metaalverbindingen) weerhouden worden in de organische extracten en verantwoordelijk zijn voor de waargenomen responsen zou verder onderzocht kunnen worden.
- Om de seizoensvariatie in de inflammatoire respons te verklaren is verder onderzoek naar de aanwezigheid van pollen korrels op de beladen filters en de aanwezigheid van pollenallergenen op fijn stof en het effect hiervan op het inflammatoir karakter van fijn stof aangewezen. De effectgerichte meetresultaten voor inflammatie in relatie tot pollenconcentraties in de omgevingslucht kan verder onderzocht worden.
- Om effectgerichte metingen kostenefficiënter te maken kan gedacht worden aan de optimalisatie van nieuwe bemonsteringstechnieken en extracties (vb actieve sampling van PM10 bemonstering op PDMS/Tenax sorbens, passieve sampling) welke momenteel aangewend worden voor de chemische karakterisatie van zwevend stof, om in te zetten voor effectgericht metingen. Daarnaast zouden nieuwe bemonsteringstechnieken van de omgevingslucht een meer gepersonaliseerde blootstelling kunnen weergegeven ten gunste van een betere inschatting van mogelijke gezondheidsrisico's van de luchtkwaliteit via effectgerichte metingen.

LITERATUURLIJST

- Aeby P., Ashikaga T., Bessou-Touya S., Schepky A., Gerberick F., Kern P., Marrec-Fairley M., Maxwell G., Ovigne J-M., Sakaguchi H., Reisinger K., Tzailhardat M., Martinozzi –Teisser S., Winkler P. (2010). Identifying and characterizing chemical skin sensitizers without animal testing: Colipa's research and method development program. *Toxicology in Vitro* 24, 1465-1473.
- Bal W., Protas A.M., Kasprzak K.S. (2011). Genotoxicity of metal ions: chemical insights. *Met Ions Life Sci.* 8, 319-373.
- Ball N., Cagen S., Carrillo J-C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: Integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* (in press).
- 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., Witters H (2007). Screening of endocrine disrupting chemicals with MELN cells, an ER-transactivation assay combined with cytotoxicity assessment. *Toxicology in vitro* 21, 1262-1267
- Bhowmik A. Seemungal T.A.R., Donaldson G.C. , Wedzicha J.A. (2005). Effects of exacerbations and seasonality on exhaled nitric oxide in COPD. *Eur Respir J* 26, 1009-1015.
- 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.
- 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.
- Carfi M., Gennari A., Malerba I., Corsini E., Pallardy M., Pieters R., Van Loveren H., Vohr H.W., Hartung T., Gribaldo I. (2007). *In vitro* tests to evaluate immunotoxicity: A preliminary study. *Toxicology* 229, 11-22.
- 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.
- 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.
- 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.
- D'Amato G., Cecchi L. D'Amato M., Liccardi G. (2010). Urban air pollution and climate change as environmental risk factors of respiratory allergy: an update. *J Invest Allergol Clin Immunol* 20(2), 95-102.
- Danielsen P.H., Møller P., Jensen K.A., Sharma A.K., Wallin H., Bossi R., Autrup H., Mølhav L., Ravanat J-L., Briedé J.J., de Kok T.M., Loft S. (2011). Oxidative stress, DNA damage, and inflammation induced by ambient air and wood smoke particulate matter in human A549 and THP-1 cell lines. *Chem. Res. Toxicol.* 24,168-184.
- De Castro B.R., Korrick S.A., Spengler J.D., Soto A.M.(2006). Estrogenic activity of polychlorinated biphenyls present in human tissue and the environment. *Environ Sci Technol.* 15; 40 (8), 2819-25.
- 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.
- 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.
- 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.
- EPA, Preliminary cumulative risk assessment of the organophosphorus pesticides, Report nr: Office of Pesticide Programs, office of prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington D.C., 2001.
- Hetland R.B., Cassee F.R., Lag M., Refsnes M., Dybing E., Schwarze P.E. (2005) Cytokine release from alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter: heterogeneity in relation to size, city and season. *Part Fibre Toxicol* 17, 2-4.
- Huang S-L., Hsu M-K., Chan C-C. (2003). Effects of submicrometer particle compositions on cytokine production and lipid peroxidation of human bronchial epithelial cells. *Environmental Health Perspectives* 111(4), 478-482.
- Kennedy K. Macova M., Leushc F., Barkow M.E., Hawker D.W., Zhao B., Denison M.S., Mueller J.F. (2009). Assessing indoor air exposures using passive sampling with bioanalytical methods for estrogenicity and aryl hydrocarbon receptor activity. *Anal Bioanal Chem.* 394 (5), 1413-1421.
- Kocbach A., Namork E., Schwarze P.E. (2008). Pro-inflammatory potential of wood smoke and traffic-derived particles in a monocytic cell line. *Toxicology* 247, 123-132.

- Li N., Wang M., Bramble L., Schmitz D., Schauer J., Sioutas C., Harkema J., Nel A. (2009). The adjuvant effect of ambient particulate matter is closely reflected by the particulate oxidant potential. *Environmental Health Perspectives* 117, 1116-1123.
- Madsen A.M. (2006). Airborne endotoxin in different background environments and seasons. *Ann Agric Environ Med* 13, 81-86.
- Matsumoto H., Adachi S., Suzuki Y. (2005) Bisphenol A in ambient air particulates responsible for the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells and its concentration changes over 6 months. *Arch Environ Contam Toxicol* 48(4), 459-466.
- Møller P., Jacobsen N.R., Folkmann J.K., Danielsen P.H., Mikkelsen L., Hemmingsen J.G., Vesterdal L.K., Forchhammer L., Wallin H., Loft S. (2010). Role of oxidative damage in toxicity of particulates. *Free Radical Research* 44(1), 1-46.
- Nelen V., Bruckers L., Van De Mierop E, Thys G. Gezondheidsenquête Genk-Zuid 2007 : Bilzen Diepenbeek, Genk, Zutendaal. (2007) <http://www.limburg.be/eCache/35495/Milieugezondheidsenquete.html?lbl=gezondheid>
- Øvrevik J., Låg M., Holme J.A., Schwarze P.E., Refsnes M. (2009). Cytokine and chemokine expression patterns in lung epithelial cells exposed to components characteristic of particulate air pollution. *Toxicology* 259, 46-53.
- Roponen M., Seuri M., Nevalainen A., Randell J., Hirvonen M-R. (2003). Nasal lavage method in the monitoring of upper airway inflammation: seasonal and individual variation. *Inhalation Toxicology* 15, 649-661.
- Schmid M., Zimmermann S., Krug H.F., Sures B. (2007). Influence of platinum, palladium and rhodium as compared with cadmium, nickel and chromium on cell viability and oxidative stress in human bronchial epithelial cells. *Environment International* 33, 385-390.
- 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).
- Shi T., Knaapen A.M., Begerow J., Birmili W., Borm P.J., Schins R.P. (2003). Temporal variation of hydroxyl radical generation and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation by coarse and fine particulate matter. *Occup. Environ.Med.* 60, 315–321.
- Shi T., Duffin R., Borm PJ., Weishaupt C., Schins RP. (2006) Hydroxyl-radical-dependent DNA damage by ambient particulate matter from contrasting sampling locations. *Environ Res* 101, 18-24.
- Spanier A.J., Hornung R.W., Kahn R.S., Lierl M.B., Lanphear B.P. (2008). Seasonal variation and environmental predictors of exhaled nitric oxide in children with asthma. *Pediatr Pulmonol* 43(6), 576-583.
- Steenenbergh, 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. (2006). Relation Between Sources of Particulate Air Pollution and Biological Effect Parameters in Samples from Four European Cities: An Exploratory Study. *Inhalation Toxicology* 18, 333.
- Taggart S.C.O., Custovic A., Francis H.C., Faragher E.B., Yates C.J., Higgins B.G., Woodcock, A. (1996). Asthmatic bronchial hyperresponsiveness varies with ambient levels of summertime air pollution. *Eur Respir J* 9, 1146-1154.
- Tilles S.A., Bardana E.J. Jr (1997). Seasonal variation in bronchial hyperreactivity (BHR) in allergic patients. *Clin Rev Allergy Immunol* 15(2), 169-185.

- Vahlkist S., Sinding M., Skamstrup K., Bisgaard H. (2006). Daily home measurements of exhaled nitric oxide in asthmatic children during natural birch pollen exposure. *J Allergy Clin Immunol* 117, 1272-1276.
- Van den berg M., Birnbaum L., Denison M., De Vito M., Farland W., Feeley M., Fiedler H., Hakansson H., Hanberg A., Haws L., Rose M., Safe S., Schrenk D., Tohyama C., Tritscher A., Tuomisto J., Tysklind M., Walker N., Peterson R. (2006) The 2005 World Health Organization Reevaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-Like Compounds. *Toxicological Sciences* 93(2), 223-241.
- Van Den Heuvel R., Witters H., Schoeters G., Nobels I., Vanparys C., De Coen W. and Robbens J. (2008). Uitwerken en uitvoeren van een pilootproject voor effectgerichte metingen om de luchtkwaliteit in Vlaanderen te kunnen evalueren eindrapport. Vlaamse Overheid, Departement Leefmilieu, natuur en Energie (LNE). Overheidsopdracht DTG/OL200500031/5170/M&G. 170 p.
- Van Klaveren J., Noordam M., Boon P., van Donkersgoed G., Ossendorp B., van Raaij M., van der Roest J. (2006) Trends in normoverschrijdingen, overschrijdingen van de acute referentiewaarde en gesommeerde blootstelling-Tussenevaluatie nota Duurzame gewasbescherming-deelpapport Voedselveiligheid. Rikilt rapportnummer 2006.011.
- Veranth J.M., Moss T.A., Chow J.C., Labban R., Nichols W.K., Walton J.C., Watson J.G., Yost G.S. (2006). Correlation of *in vitro* cytokine responses with chemical composition of soil-derived particulate matter. *Environmental Health perspectives* 114(3), 341-349.
- Verstraelen S., Nelissen I., Hooyberghs J., Witters H., Schoeters G., Van Cauwenberge P., Van Den Heuvel R., (2009) Gene profiles of a human bronchial epithelial cell line after *in vitro* exposure to respiratory (non-)sensitizing chemicals: identification of discriminating genetic markers and pathway analysis. *Toxicology* 255 (2009), p151-159.
- VGR (Vlaamse Gezondheidsraad) 2005, Jaarverslag 2005, .Advies inzake biomonitoring, 64-69
- VMM 2008, Luchtkwaliteit in het Vlaamse Gewest, Jaarverslag immissiemeetnetten Kalenderjaar 2007.
- VMM 2009, Luchtkwaliteit in het Vlaamse Gewest, Jaarverslag immissiemeetnetten Kalenderjaar 2008.
- VMM 2009, Chemkar PM10: Chemische karakterisatie van fijn stof in Vlaanderen, 2006-2007
- VMM 2010, Luchtkwaliteit in het Vlaamse Gewest, Jaarverslag immissiemeetnetten Kalenderjaar 2009.
- von Goetz N., Wormuth M., Scheringer M., Hungerbühler K. (2010). Bisphenol a: how the most relevant exposure sources contribute to total consumer exposure. *Risk Anal.* 30 (3),473-87.
- Watterson T., Hamilton B., Martin R., Coulombe R. (2009). Urban particulate matter causes ER stress and the unfolded protein response in human lung cells. *Toxicological Sciences* 112(1), 111-122.
- Wenger D, Gerecke AC, Heeb NV, Schmid P, Hueglin C, Naegeli H, Zenobi R.(2009). In vitro estrogenicity of ambient particulate matter: contribution of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Appl Toxicol.* 29(3), 223-32.
- Witters H, Freyberger A, Smits K, Vangenechten C, Lofink W, Weimer M, Bremer S, Ahr PH, Berckmans P. (2010). The assessment of estrogenic or anti-estrogenic activity of chemicals by the human stably transfected estrogen sensitive MELN cell line: results of test performance and transferability. *Reprod Toxicol.* 30 (1), 60-72.

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.

