
FLEHS IV (2016-2020): **BLOOTSTELLING-** **EFFECT ASSOCIATIES**

Tussentijds rapport
Bisfenolen, pesticiden,
perfluorverbindingen, zware metalen en
spoorelementen
22.12.2022

VITO Unit Health: Veerle J. Verheyen, Sylvie Remy, Natasha Wauters, Eva Govarts, Greet Schoeters, Ann Colles
Project in opdracht van het Vlaams Planbureau Omgeving van de Vlaamse overheid

INHOUD

1	Situering en doelstelling	3
2	Studiedesign en methode.....	4
3	Resultaten.....	7
3.1	Bisfenolen	7
3.1.1	Achtergrond	7
3.1.2	Materiaal en methode	9
3.1.3	Resultaten en discussie	9
3.1.4	Besluit	13
3.2	Pesticiden met huidig gebruik	13
3.2.1	Achtergrond	13
3.2.2	Materiaal en methode	15
3.2.3	Resultaten	15
3.2.4	Besluit	19
3.3	Perfluorverbindingen	19
3.3.1	Achtergrond	19
3.3.2	Materiaal en methode	20
3.3.3	Resultaten	21
3.3.4	Besluit	25
3.4	Zware metalen en spoorelementen	26
3.4.1	Achtergrond	26
3.4.2	Materiaal en methode	30
3.4.3	Resultaten	30
3.4.4	Besluit	36
4	Conclusies en aanbevelingen	38
	Executive summary	41
	Samenvatting	43
	Referenties.....	45

Voor deze studie werden vier stofgroepen geselecteerd als prioritair voor toekomstig HBM-onderzoek in Vlaanderen en voor beleidsondersteuning:

- Bisfenolen
- Pesticiden met huidig gebruik
- Perfluorverbindingen
- Zware metalen en spoorelementen

De resultaten van blootstelling-effect associaties in deze stofgroepen worden in dit rapport toegelicht. Ook de resultaten in het kader van Europese projecten zoals HBM4EU en GOLIATH waarin FLEHS IV data voor deze prioritaire stofgroepen opgenomen werd, worden kort beschreven. In HBM4EU, Human Biomonitoring for Europe (2017-2021) werkten 30 Europese landen, het Europese Milieu Agentschap en de Europese commissie hebben samen. Het doel van het project was het coördineren en verder uitbouwen van humane biomonitoring in Europa, waarbij de gegeneerdere kennis het beleid rond blootstelling aan chemische stoffen kan onderbouwen [6]. Belangrijk om te vermelden is dat de HBM4EU analyses gebeurden op een subset van de data van 300 FLEHS IV deelnemers van de referentiecampagne. In de selectie van de subset werd rekening gehouden met enkele criteria voorgeschreven voor HBM4EU: gelijke verdeling van geslacht, graad van urbanisatie (doel minstens 10% in elk van de 3 categorieën), opleidingsniveau van het gezin (doel minstens 10% van elk van de 3 categorieën), seizoen van staalname (doel gelijke verdeling over de seizoenen). De focus in HBM4EU lag op de analyse van astma en allergiegerelateerde effecten en seksuele ontwikkeling in relatie tot PFAS, ftalaten, en DINCH. Waar mogelijk, zijnde bij voldoende overeenkomst tussen de variabelen, werden data van andere EU-studies samen geanalyseerd. De finale resultaten worden momenteel gebundeld in manuscripten, die in 2023 zullen worden ingediend bij wetenschappelijke tijdschriften. GOLIATH is een H2020 project, hierin worden effecten van metabole verstoorders in experimentele systemen vergeleken met reële responses in humane cohorten [7]. Voor FLEHS IV werd nagegaan welke componenten uit het blootstellingsmengsel effecten op metabole uitkomsten aandrijven en werden ook enkelvoudige blootstelling-effect associaties geanalyseerd. Een manuscript is momenteel in voorbereiding. In het project worden verder -omics data verzameld van 300 FLEHS IV deelnemers uit de referentiecampagne en de FLEHSI opvolgstudie (metabolomics en lipidomics), de analyse van deze data is voorzien in 2023. De selectie van de stalen werd gebaseerd op beschikbaarheid in de biobank, waar het aantal resterende aliquots en volume serum per deelnemer werd gemaximaliseerd om de beschikbaarheid van niet eerder ontdoode stalen voor volgende studies te verzekeren. De bevindingen van deze studie kunnen bijdragen aan een beter inzicht in de milieudruk van chemische stoffen en de gezondheidsimpact in Vlaanderen, de vroege preventie van aandoeningen, het stellen van beleidsprioriteiten en de ontwikkeling van adequate strategieën en maatregelen om de effecten van chemische stoffen op de volksgezondheid te voorkomen.

2 STUDIEDESIGN EN METHODE

In het schooljaar 2017-2018 werden in de 4^e cyclus van het Vlaamse humane-biomonitoringsprogramma **610 jongeren** van 14 of 15 jaar oud gerekruteerd en onderzocht. Via scholen werden 428 jongeren opgenomen in de studie als referentiepopulatie. De deelnemers aan de referentiecampagne van deze biomonitoringsstudie werden evenredig aan het aantal 14-15-jarige inwoners gerekruteerd in de vijf Vlaamse provincies.

De onderzochte jongeren gaven een bloed-, urine-, en haarstaal; gewicht, lengte, buikomtrek, bloeddruk en polsslag werden gemeten en neurologische computertesten uitgevoerd; stikstofoxide (NO) in ademlucht werd gemeten als maat voor luchtwegontstekingen.

Tabel 1. Overzicht FLEHS IV effect biomerkers en gezondheidseffecten

Effectmerker	Betekenis
Genotoxiciteit	
8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG)	Oxidatieve stress en DNA-herstelprocessen
Komeetttest	DNA schade in perifere bloedcellen
Relatieve telomeerlengte in leukocyten	DNA-proteïne structuren aan de uiteinden van elk chromosoom, biomarker van DNA-schade en cellulaire veroudering
Immuunrespons	
Totaal aantal leukocyten	Witte bloedcellen, actief in het aangeboren en adaptief immuunsysteem, algemeen beeld immuunrespons
Aantallen neutrofielen, monocyt, lymfocyten, basofielen, eosinofielen	Types leukocyten met elk specifieke functies in immuunrespons, balans tussen verschillende types is nodig voor een efficiënte immuunrespons
Neutrofiel-lymfocyt ratio	Merker voor verstoorde immuunrespons, inflammatie
Uitgeademd stikstofoxide (eNO)	Merker voor inflammatie luchtwegen
Immuungerelateerde aandoening	
Allergie	Allergie voor voedingsmiddelen, geneesmiddelen of insectenbeten
Allergie combinatie	Allergie voor voeding, geneesmiddelen, insectenbeten, metaal, verzorgingsproducten, huishoud- en onderhoudsproducten, en/of dieren; het ooit gehad hebben van rhinitis
Astma dokter	Astma vastgesteld door een dokter
Astma huidig	Het hebben van astma in de laatste 12 maanden
Astma ooit	Het ooit gehad hebben van astma
Medicatie astma	Het nemen van medicatie tegen astma in de laatste 12 maanden
Hooikoorts ooit	Het ooit gehad hebben van rhinitis
Medicatie hooikoorts	Het nemen van medicatie tegen rhinitis in de laatste 12 maanden
Medicatie eczeem	Het nemen van medicatie tegen eczeem
Cardiovasculaire en metabole parameters	
Cholesterol	Bloedvetten
Triglyceriden	Bloedvetten
Body Mass Index (BMI)	Indicatie onder- of overgewicht
Buikomtrek	Indicatie onder- of overgewicht
Risico abdominale obesitas	Verhouding buikomtrek op lengte > 0,5
Bloeddruk	Belasting hart en vatenstelsel
Polsslag	Belasting hart en vatenstelsel
Endocriene verstoring	
Cortisol in haar	Chronische endocriene stress
Schildklierhormonen (TSH, FT3, FT4)	Schildklierwerking
Leeftijd menarche, late menarche	Puberteitsontwikkeling meisjes
Tanner stadia	Puberteitsontwikkeling (genitale, borst en pubisbehaaring)

Met behulp van blootstelling-effect relaties was het vervolgens mogelijk om de associaties tussen een bepaalde blootstellingsmerker en een effect te bestuderen, dit gebeurt na correctie voor mogelijk beïnvloedende factoren (confounders en covariaten). De identificatie van confounders en covariaten was gebaseerd op wetenschappelijke gegevens uit andere studies.

De gevonden relaties gelden binnen de gemeten ranges van zowel de blootstellingsmerkers als de effectmerkers en zijn dus relevant voor het Vlaamse beleid. Voor sommige biomerkers lag een hoog percentage van de waardes onder de kwantificeringslimiet of detectielimiet. Voor biomerkers met een detectiefrequentie <60% werden binaire variabelen berekend indien waarden onder en boven de kwantificeringslimiet of detectielimiet (LOQ, LOD). Deze biomerkers werden voor de analyses van de blootstelling-effect relaties opgesplitst in binaire variabelen: één categorie met alle waarden onder de detectielimiet en één categorie met alle waarden boven de detectielimiet. Voor deze binaire blootstellingsmerkers werd gerekend met de proporties. Biomerkers met een detectiefrequentie >60% verder meegenomen als continue variabelen. Voor biomerker concentraties onder de LOQ/LOD werd een willekeurige waarde geïmputeerd tussen 0 en de LOQ/LOD [23]. Concentraties van urinaire biomerkers werden genormaliseerd voor soortelijk gewicht (SG) van de urine om de urinaire verdunning weer te geven [24]. Alle gemeten biomerkers werden logaritmische (ln) getransformeerd. Meervoudige regressiemodellen (lineair voor continue effecten, logistisch voor binaire effecten) werden geanalyseerd met blootstellingsmerkers als onafhankelijke variabelen en effect biomerkers als afhankelijke variabele. We specificerden twee modellen met verschillende niveaus van correctie voor *a priori* gedefinieerde potentiële confounders, gebaseerd op de literatuur. Model I werd gecorrigeerd voor geslacht en leeftijd. Voor urinaire biomerkers werd SG als onafhankelijke variabele opgenomen in alle modellen om rekening te houden met variatie in urinaire verdunningsgraad [24,25]. De correctie van model II werd afgestemd op de specifieke blootstelling-effect associaties. Alle aannames voor lineaire regressieanalyse werden gecontroleerd. Het statistisch significante niveau voor associaties werd vastgesteld op een *p-waarde* $\leq 0,05$ (tweezijdig), de verandering in de effectmerker wordt aangegeven als positief of negatief. In dit rapport worden alle blootstelling-effect relaties significant op het 5% niveau gerapporteerd, zonder een correctie voor meervoudig toetsen door te voeren. Omdat de relatie tussen biologische factoren en chemische stoffen bij jongens en meisjes kan verschillen, onderzochten we de effectmodificatie door geslacht [26]. Een interactieterm van blootstelling en geslacht werd daartoe opgenomen in de regressiemodellen. Het statistisch significante interactieniveau werd vastgesteld op *p-waarde* $\leq 0,20$ (tweezijdig). In de resultatentabellen wordt een overzicht gegeven van richting (positief, negatief) en significantie (*) van de blootstelling-effect relaties bij FLEHS IV adolescenten. Negatief houdt statistisch een daling in effectmerker in bij stijging in blootstelling, positief houdt een stijging in effectmerker in bij stijging in blootstelling. Deze positieve en negatieve associaties zijn statistische relaties en zijn geen indicatie voor een positieve of negatieve invloed op de gezondheid.

3 RESULTATEN

3.1 BISFENOLEN

3.1.1 Achtergrond

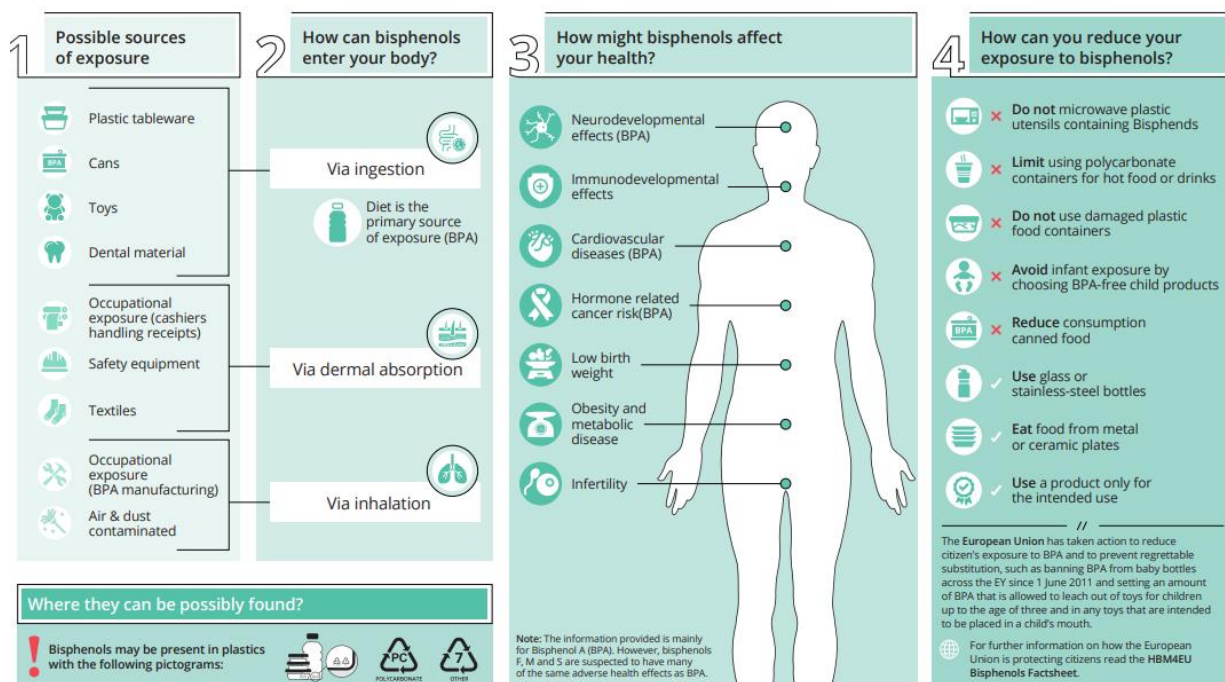
Bisfenolen worden wereldwijd in grote volumes geproduceerd voor gebruik in kunststoffen, epoxyharsen en als additieven in andere toepassingen. Bisfenolen zijn aanwezig in talrijke consumentenproducten zoals voeding in blik, plastic flessen, voedselcontainers, speelgoed, thermisch papier en medische apparatuur [27]. Humane biomonitoring (HBM) studies hebben wereldwijde blootstelling van de mens aan bisfenolen aangetoond [8,27,28]. Bisfenolen worden op korte termijn (uren tot dagen) gemetaboliseerd en uitgescheiden, ze worden vanwege hun korte biologische halfwaardetijd geclassificeerd als niet of gedeeltelijk niet-persistent. Vanwege de continue blootstelling via ingestie, inademen of huidcontact, worden bisfenolen echter vaak als pseudo-persistent beschouwd [29].



In juni 2017 werd bisfenol A (BPA) door het Europees Agentschap voor chemische stoffen (ECHA) beschreven als hormoonverstorend bij de mens [30]. BPA was al opgenomen als zeer zorgwekkende stof (substance of very high concern of SVHC) onder de Europese verordening inzake registratie, evaluatie, autorisatie en beperking van chemische stoffen (REACH) wegens de negatieve impact op de vruchtbaarheid. Een overzicht van potentiële bronnen van bisfenolen, blootstellingsroutes en hun mogelijke gevolgen voor de gezondheid wordt gepresenteerd in **Error! Reference source not found.** [31].

Experimentele en epidemiologische studies ondersteunen de negatieve impact van BPA op het endocriene en het immuun systeem [32]. Daarnaast wijzen talrijke studies naar BPA als metabole verstoorder [33]. Epidemiologische studies hebben positieve correlaties vastgesteld van blootstelling aan BPA met obesitas en de prevalentie van hart- en vaatziekten [34]. Op moleculair niveau werd BPA reeds geassocieerd met epigenetische wijzigingen en oxidatieve stress, mechanismen die de effecten van BPA op verschillende gezondheidseindpunten gedeeltelijk zouden kunnen verklaren [32,35]. Als gevolg van de wettelijke beperkingen op het gebruik van BPA in Europa is het gebruik van alternatieve bisfenolen, zoals bisfenol S (BPS) en bisfenol F (BPF) de laatste jaren toegenomen [8,27]. ECHA merkt op dat de vervanging van BPA door alternatieve bisfenol-congeneren zorgwekkend is [36]. De bisfenol congenen BPF, BPS, BPAF, BPZ en BPB worden eveneens in verband gebracht met hormoon-, immuun- en metabole verstoring [37,38]. Toch is er momenteel weinig bekend over de mogelijke schadelijke effecten van deze steeds vaker gebruikte alternatieve bisfenolen [34].

HBM studies zijn een belangrijk beleidsondersteunend instrument om de blootstelling van de algemene bevolking aan gereguleerde bisfenolen en alternatieven op te volgen en de daarmee gepaard gaande gezondheidseffecten in kaart te brengen [2,8,27].



Figuur 1. HBM4EU bisfenolen infografiek [31]

Als onderdeel van de vierde cyclus van het Vlaams humane-biomonitoring project, FLEHS IV (2016-2020), werd de interne blootstelling aan zes bisfenolen (BPA, BPS, BPF, BPAF, BPB, BPZ) gemonitord in urinemonsters van 423 Vlaamse adolescenten (14-15 jaar) [2,8].

Alle gemeten bisfenolen werden gedetecteerd in de studiepopulatie, waarbij BPA, BPF en BPS een detectiefrequenties >50% vertoonden en mediaan gehalten van BPA (1,05 ng/ml) hoger waren dan die van BPF en BPS (0,14 ng/ml en 0,12 ng/ml). Het urinaire BPA geometrisch gemiddelde daalde significant bij Vlaamse adolescenten in vergelijking met de tweede cyclus van FLEHS (2008-2009) [8]. Dit suggereert dat de vervanging van BPA door zijn alternatieven ook in Vlaanderen aan de gang is. De bij Vlaamse adolescenten gemeten concentraties van bisfenolen lagen in dezelfde grootteorde als recente studies wereldwijd [2,39]. Uit een voorlopige risicobeoordeling in deze studie bleek dat geen van de geschatte dagelijkse innames (EDI's) van BPA de toelaatbare dagelijkse inname overschreed van 4 µg/kg lichaamsgewicht/dag die in 2015 door de Europese Autoriteit voor Voedselveiligheid (EFSA) bepaald werd [8]. Voor alternatieve bisfenolen waren geen op de gezondheid gebaseerde richtwaarden beschikbaar, maar in overeenstemming met de gemeten urinaire niveaus waren hun EDI's lager dan die van BPA.

Een belangrijke onderzoeks- en beleidsvraag is of de overschakeling van BPA naar zijn alternatieve bisfenolen al dan niet veilig is voor de mens [40]. HBM-studies zoals FLEHS IV kunnen de inschatting van het gezondheidsrisico van bisfenolen mee onderbouwen door associaties te onderzoeken tussen interne blootstelling aan bisfenolen en vroege gezondheidseffecten. Daarbij is van belang dat de adolescentie een ontwikkelingsfase is met een verhoogde gevoeligheid van het endocriene, cardiovasculaire en immuunsysteem voor milieublootstellingen [41]. Daarom beoogt deze studie associaties te onderzoeken tussen interne blootstelling aan bisfenolen en potentiële biologische mechanismen zoals oxidatieve stress, genotoxiciteit, immuunverstoring en endocriene parameters bij een algemene populatie van Vlaamse adolescenten.

3.1.2 Materiaal en methode

De analyse van bisfenolen BPA, BPS, BPF, BPAF, BPB, BPZ en de effect biomerkers werden eerder in detail beschreven [2,8,16,21,42]. BPAF werd slechts bij een zeer klein deel van de deelnemers gedetecteerd (12%) en werd van verdere statistische analyse uitgesloten. Voor BPB en BPZ, bisfenolen met een detectiefrequentie <60% (respectievelijk 57% en 37%), werden binaire variabelen berekend als waarden onder en boven de kwantificeringslimiet (LOQ). Bisfenolen met een detectiefrequentie >60% (BPA, BPF en BPS) werden verder meegenomen als continue variabelen. Voor BPA-, BPS- en BPF-concentraties onder de LOQ werd een willekeurige waarde geïmputeerd tussen 0 en de LOQ [23]. We specificerden twee meervoudige regressiemodellen modellen (lineair voor continue effecten, logistisch voor binaire effecten) met verschillende niveaus van correctie voor *a priori* gedefinieerde potentiële confounders, gebaseerd op de literatuur. Model I was voor alle associaties gecorrigeerd voor soortelijk gewicht van de urine, geslacht en leeftijd. Model II was daarnaast verder gecorrigeerd voor bijkomende factoren, specifiek voor de bestudeerde associatie zoals BMI, socio-economische status (SES) van het huishouden, seizoen van staalname, actief en passief roken.

3.1.3 Resultaten en discussie

Een overzicht van de richting en significantie van blootstelling-effect associaties in FLEHS IV associaties wordt gepresenteerd in Tabel 2

Tabel 2. Overzicht van richting en significantie van blootstelling-effect associaties voor bisfenolen in FLEHS IV.

	BPA	BPF	BPS	BPB (bin)	BPZ (bin)
8-oxodG	POS*	POS	NEG	POS*	POS
Telomeerlengte	NEG	POS	NEG	POS	POS
Komeetttest	POS	NEG	POS	NEG	POS
Leukocyten aantal	NEG	POS	NEG	POS	NEG
Neutrofielen aantal	NEG	POS	NEG	POS	NEG
Lymfocyten aantal	NEG	NEG	POS	POS	POS
Neutrofiel-lymfocyt ratio	NEG	POS	NEG	POS	NEG
Eosinofielen aantal	POS	POS	POS	POS*	POS
Monocyten aantal	NEG	POS	NEG	POS	POS
Basofielen aantal	POS	POS	POS	NEG	NEG
eNO	POS	NEG	POS	POS	POS
Allergie	NEG	POS	POS	NEG	POS
Allergie combinatie	NEG	NEG	POS	NEG	POS
Astma dokter	POS	POS	POS	NEG	POS
Astma huidig	NEG	POS	NEG	POS	NEG
Astma ooit	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
Medicatie astma	NEG	POS	NEG	NEG	POS
Hooikoorts ooit	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
Medicatie hooikoorts	POS	NEG	NEG	POS	POS
Medicatie eczeem	NEG	POS	NEG	POS	POS
BMI (z-score)	POS	POS*	POS*	NEG	NEG
Ratio Buikomtrek en lengte	POS*	POS*	POS*	NEG	NEG
Risico abdominale obesitas	POS	POS	POS	NEG	NEG
Bloedvet	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Cholesterol	NEG	NEG	POS	NEG	POS
Triglyceriden	NEG	POS	NEG	POS	NEG
Diastolische bloeddruk	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG*
Systolische bloeddruk	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
Hartritme	POS	NEG	NEG	NEG	POS
Cortisol	NEG	POS	NEG	NEG	POS
Menarche laat	POS	POS	POS	POS	NEG
Tanner stadium borstontwikkeling meisjes	POS	NEG	NEG*	NEG	NEG
Tanner stadium genitale ontwikkeling jongens	NEG	POS	POS	NEG	POS
Tanner stadium pubis haar jongens	NEG	POS	POS	NEG	POS
Tanner stadium pubis haar meisjes	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
Schildklier stimulerend hormoon (TSH)	POS	POS	NEG	NEG	NEG
Vrij thyroxine (FT4)	NEG	NEG	NEG	POS	POS*
Vrij tri-joodthyronine (FT3)	POS	POS	NEG	NEG	NEG

NEG: daling in effectmerker bij stijging in bisfenol concentratie

POS: stijging in effectmerker bij stijging in bisfenol concentratie

*Blootstelling-effect associatie is significant ($p \leq 0,05$)

BP: bisfenol, bin: binaire variabele, eNO: uitgeademd stikstofdioxide, 8-oxodG: 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine

3.1.3.1 Genotoxiciteit in relatie tot interne blootstelling aan bisfenolen

Bij de FLEHS IV jongeren waren hogere urinaire concentraties van BPA (n = 392) significant geassocieerd met hogere urinaire concentraties van de oxidatieve stress biomarker 8-oxodG na correctie voor urinaire dichtheid, geslacht en leeftijd, BMI, socio-economische status (SES) van het huishouden, seizoen van staalname, actief en passief roken. Daarnaast hadden deelnemers met detecteerbare urinaire niveaus van BPB significant hogere niveaus van oxidatieve stress na correctie voor bovengenoemde factoren.

Deze bevindingen zijn in overeenstemming met uitgebreid onderzoek naar BPA en oxidatieve stress in het afgelopen decennium [35,43], waaronder ook epidemiologische studies bij adolescenten [44,45]. Ook bij de jongeren van het 2de Steunpunt Milieu en Gezondheid (2007-2011) was hogere blootstelling aan BPA geassocieerd met meer oxidatieve stress [46], enkel BPA werd toen gemeten. BPB heeft een sterke structurele gelijkenis met BPA en de literatuur suggereert dat de biologische activiteit van BPB vergelijkbaar is met die van BPA [47]. Experimentele studies tonen dat BPB oxidatieve stress veroorzaakt [40]. Het humane onderzoek naar de toxiciteit van BPB is echter nog beperkt en voornamelijk gericht op hormoonverstoring [48]. Verhoogde niveaus van oxidatieve stress worden in verband gebracht met immuunverstoring, cellulaire veroudering en hart- en vaatziekten [49]. De resultaten van deze studie kunnen daarom relevant zijn voor de gezondheid van Vlaamse adolescenten.

Er waren geen significante associaties van bisfenolen gehalten met de resultaten van de komeettest of de telomeerlengte in perifere leukocyten. Eerder onderzoek naar genotoxiciteit in relatie tot chemische blootstelling in FLEHS-studies bij adolescenten identificeerde eveneens 8-oxodG als een gevoeliger eindpunt van aan chemische blootstelling gerelateerde genotoxiciteit dan de komeettest [50]. Er waren bij jongens en meisjes geen verschillen in de significante verbanden tussen bisfenolen en genotoxiciteitsmarkers.

3.1.3.2 Immune biomarkers en immune effecten in relatie tot interne blootstelling aan bisfenolen

Er waren geen significante verbanden tussen de urinaire concentraties van bisfenolen en het totale aantal leukocyten in perifere bloed (n = 385). Wat betreft de aantallen van leukocyten subtypes, waren hogere concentraties BPS, maar niet BPA of BPF, significant geassocieerd met lagere aantallen monoccyten bij meisjes. Deelnemers met detecteerbare BPB-concentraties vertoonden hogere aantallen eosinofielen. Eosinofielen spelen een rol in het initiëren van allergische reacties en astma [51]. De literatuur geeft aan dat blootstelling aan bisfenolen de immuunrespons kan beïnvloeden en allergische reacties en astma kan bevorderen [52]. Epidemiologische studies over de impact van BPB en BPS op de immuunrespons zijn echter nog heel beperkt [32]. Onderzoek toonde eerder aan dat blootstelling aan BPA het aantal eosinofielen verhoogt in modellen van luchtwegallergie, en bij volwassen muizen [53,54]. Hogere BPS-niveaus in de urine waren in FLEHS IV alleen bij meisjes significant geassocieerd met een lagere aantal monoccyten. Verschil tussen jongens en meisjes in associaties van endocriene verstoorders, waaronder bisfenolen, met immuunparameters zijn reeds eerder beschreven [26,55]. *In vivo* bezit BPS een immunotoxisch potentieel dat vergelijkbaar is met dat van BPA [56]. Immune modulerende effecten van BPS werden onderzocht in experimentele studies [57]. Bij blootstelling aan BPS werden genen die betrokken zijn bij het aangeboren immuunsysteem bij zebrafissen down gereguleerd; terwijl bij muizen de transcriptniveaus van pro-inflammatoire cytokines geïnduceerd werden [57]. Experimentele studies hebben eerder ook necrose en apoptose in monoccyten gerapporteerd als gevolg van blootstelling aan BPA [58]. De resultaten ondersteunen de bevindingen in de literatuur dat de alternatieve bisfenolen mogelijk de immuunrespons wijzigen, wat kan bijdragen aan de ontwikkeling en de ernst van inflammatoire aandoeningen [52,54]. Deze studie toonde geen significante associaties van bisfenolen met uitgedemd NO als merker van luchtweginflammatie. Ook de associaties tussen de gemeten bisfenolen en astma- en allergie gerelateerde uitkomsten waren niet significant en er werden geen verschillen tussen de geslachten geobserveerd.

Het significant verband tussen bisfenolen en de aantallen van verschillende types immuuncellen als vroege, gevoelige biomarkers van de immuunrespons bij Vlaamse jongeren is van belang omdat de goede werking van het immuunsysteem een belangrijke determinant is van de gezondheid gedurende het hele leven, met de adolescentie daarbij als een kwetsbare ontwikkelingsperiode voor het immuunsysteem [41].



3.1.3.3 Cardiometabole biomerkers en effecten in relatie tot interne blootstelling aan bisfenolen

Er was geen consistent verband tussen bisfenolen en **cardiovasculaire effecten** (diastolische bloeddruk, systolische bloeddruk en hartritme) (n = 407). Er werd enkel een significante associatie vastgesteld tussen BPZ-concentraties boven de LOQ en een lagere diastolische bloeddruk. De overige geteste associaties waren niet significant.

In analyses van afzonderlijke verontreinigende stoffen met **metabole parameters** was de buikomtrek (n = 405) positief geassocieerd met BPA, BPF en BPS. In overeenstemming daarmee was BMI (z-score) (n = 407) positief geassocieerd met BPF en BPS. De modellen werden gecorrigeerd voor geslacht, leeftijd, seizoen van staalname, SES en SG.

Bovendien bleek uit mengselanalyses dat BMI z-score stijgt in relatie tot een stijging in de concentratie aan bisfenolen, waarbij de associatie voornamelijk gedreven wordt door BPS. Wat betreft het risico op abdominale obesitas, geeft de mengsel analyse een niet monotone relatie aan voor BPF, met een negatieve associatie bij lagere concentraties en een positieve associatie bij hogere concentraties.

De associaties met het risico op abdominale obesitas (afgeleid van de buikomtrek) waren daarentegen niet significant. De resultaten zijn in lijn met bevindingen bij 1831 kinderen en adolescenten in de National Health and Nutrition Examination Survey NHANES (2013-2016), waar een positieve associatie werd gerapporteerd tussen abdominale obesitas en BPF en BPS, een positieve associatie tussen obesitas en BPS, en een positieve associatie tussen BMI Z-score en BPF [59]. Er werden geen significante relaties gerapporteerd voor BMI en obesitas gerelateerde effecten met BPA in NHANES.

3.1.3.4 Endocriene biomerkers in relatie tot interne blootstelling aan bisfenolen

De resultaten toonden geen significante associaties van bisfenolen met **cortisol** concentraties in haar (HCC) als biomarker van chronische endocriene stress in de gehele onderzoekspopulatie (n = 395). De associaties van BPS met HCC verschilden echter significant per geslacht. Hogere urinaire BPS-gehalten waren borderline significant geassocieerd met lagere HCC bij meisjes, maar niet bij jongens. Hoewel *in vitro* modellen aantonen dat BPA de hypothalamus-hypofyse-bijnier as (HPA) kan verstoren, is er opvallend weinig epidemiologische informatie over cortisol concentraties in relatie tot blootstelling aan bisfenolen [32]. Een studie bij Spaanse pre-adolescenten, die uitsluitend jongens betrof, meldde verlaagde serum cortisolniveaus in relatie tot blootstelling aan BPA [60]. De biologische plausibiliteit van geslacht-specifieke veranderingen in de functie van de HPA-as bij blootstelling aan bisfenolen wordt ondersteund door resultaten in knaagdiermodellen [61]. Meer experimenteel en epidemiologisch onderzoek is nodig om de effecten van bisfenolen op de HPA-as op te helderen.

Wat betreft **schildklierhormonen** was een hogere FT4 concentratie significant geassocieerd met een detecteerbare BPZ-concentratie (n = 239). Voor de andere bisfenolen werden geen significante associaties vastgesteld, noch voor TSH en FT3. De modellen werden gecorrigeerd voor leeftijd, geslacht, BMI en SG. De effecten van bisfenolen op schildklierfunctie werden recent gereviewed, voor FT4 werden bij volwassenen voornamelijk negatieve associaties gerapporteerd [62]. Een review van studies naar de impact van BPA op schildklierfunctie bij kinderen en jongeren wijst er echter op dat naast een antagonistische werking bij hogere blootstelling, bij lage dosis BPA kan werken als een agonist, wat een niet-monotone dosisrespons suggereert [63].

De data van FLEHS IV tonen een zwakke indicatie voor een associatie tussen bisfenolen en **puberteitsontwikkeling**, waarbij enkel een significante associatie wordt gerapporteerd tussen een hogere BPS concentratie en vertraagde borstontwikkeling (n = 196). De modellen werden gecorrigeerd voor leeftijd, BMI, seizoen van staalname, SES, passief roken en SG.



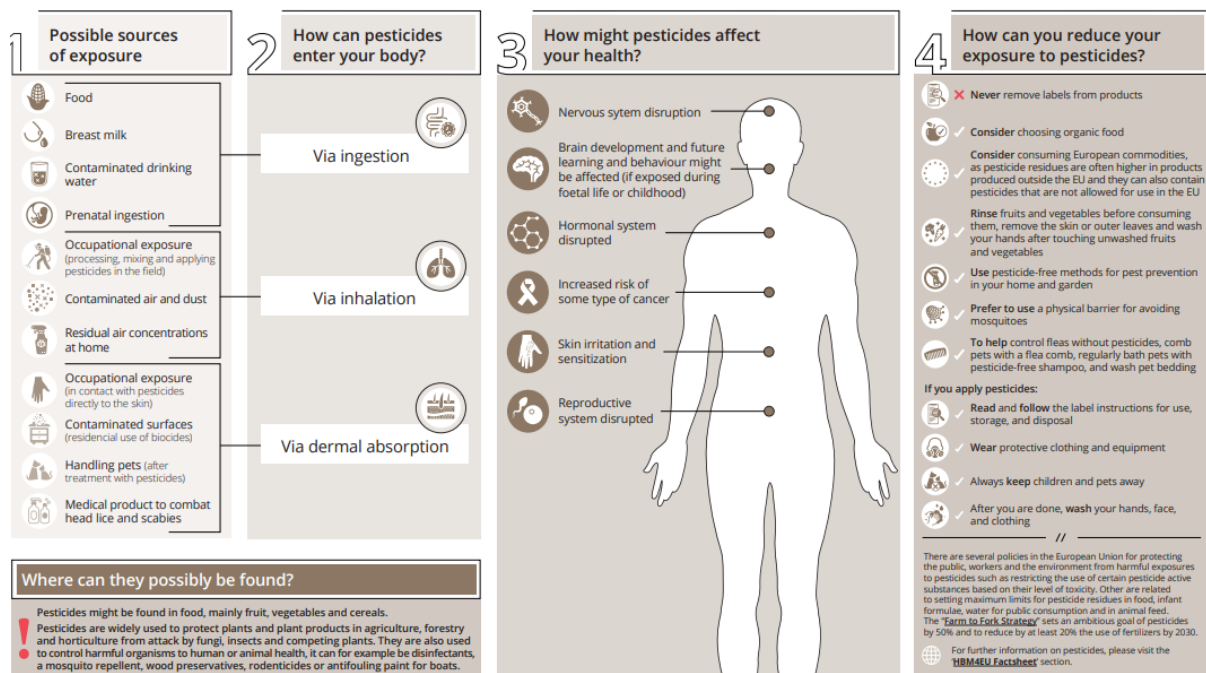
3.1.4 Besluit

De alomtegenwoordigheid van bisfenolen in het milieu maakt blootstelling gedurende het hele leven, met inbegrip van de adolescentie, onvermijdelijk. Onze bevindingen wijzen erop dat, ondanks het niet overschrijden van de huidige tdi's in deze studiepopulatie, bij de huidige blootstellingsniveaus van zowel BPA als alternatieve bisfenolen een ongunstige invloed kunnen hebben op de oxidatieve stressniveaus van adolescenten en daarnaast de immuunrespons kunnen wijzigen. BPA, BPF en BPS concentraties zijn geassocieerd met ongunstige metabole parameters. Bij meisjes zijn er bovendien aanwijzingen voor een verband tussen blootstelling aan BPS en verstoring van de stress respons. Een langdurige impact van bisfenolen op deze biologische mechanismen tijdens de adolescentie zou kunnen bijdragen aan de ontwikkeling en ernst van inflammatoire aandoeningen. Bij de interpretatie van deze resultaten dient opgemerkt te worden dat een kortdurende blootstelling aan bisfenolen in verband wordt gebracht met lange termijn gezondheidseffecten. Hierbij wordt ervan uitgegaan dat de blootstelling aan bisfenolen continu is. De bevindingen in deze studie zijn in lijn met de bestaande literatuur, die voornamelijk de gezondheidsrisico's van bisfenolen *in vitro* en in experimentele studies beschrijft. Epidemiologische onderzoek naar de gezondheidsimpact van BPA-alternatieven bij jongeren is tot nu toe echter zeer beperkt. FLEHS IV resultaten kunnen bijdragen aan de inschatting van het gezondheidsrisico van de opkomende alternatieve bisfenolen, een belangrijke beleidsmatige vraag. Verder onderzoek naar bisfenol-gerelateerde veranderingen in genotoxische, endocriene en immuun parameters is aangewezen om de biologische mechanismen te identificeren die blootstelling aan bisfenolen koppelen aan de gezondheidsimpact. In dit verband zijn menselijke HBM-studies bij adolescenten een belangrijk beleidsondersteunend instrument voor de risicobeoordelingen van bisfenolen.

3.2 PESTICIDEN MET HUIDIG GEBRUIK

3.2.1 Achtergrond

Pesticiden zijn alomtegenwoordig in het milieu. Hoewel de toepassing van pesticiden belangrijke doelen dient, waaronder bescherming tegen verliezen in de landbouw en tegen vector-gebonden ziekten, bestaat er grote bezorgdheid over de mogelijke toxische effecten van pesticiden op organismen waar ze niet tegen gericht zijn, waaronder de mens [64]. Aanwezigheid van pesticiden in het milieu wordt dan ook gerelateerd aan een negatieve impact op moleculaire mechanismen en ongewenste gezondheidseffecten bij de mens, zoals weergegeven in Figuur 2 [31].



This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 733032

www.hbm4eu.eu



HBMAEU coordinator:
German Environment Agency hbm4eu@uba.de
Knowledge Hub coordinator:
European Environment Agency hbm4eu@eea.europa.eu

Figuur 2. Humane blootstellingsroutes en gezondheidseffecten van pesticiden [31]

Pyrethroïden worden gebruikt om insecten te bestrijden in openbare en commerciële gebouwen, dierenverblijven, magazijnen, en in de landbouw. Pyrethroïden zijn de meest voorkomende werkzame stof in commercieel verkrijgbare insectensprays [65]. Er zijn wereldwijd ongeveer 30 verschillende pyrethroïde pesticiden in gebruik. 3-fenoxybenzoëzuur (3-PBA) is een metaboliet van 6 pyrethroïde pesticiden, en 3-PBA concentraties in urine weerspiegelen de recente blootstelling aan pyrethroïde pesticiden [66]. De voornaamste bron van humane blootstelling aan pyrethroïden is via voeding of huishoudelijk gebruik [1]. Gebruik van hoge doseringen pyrethroïden wordt geassocieerd met schadelijke effecten op het zenuwstelsel en de ontwikkeling van de hersenen [64]. *In vitro* werd aangetoond dat pyrethroïde pesticiden de hormonen en de ontwikkeling van het voortplantingssysteem kunnen verstoren [67]. Verder zijn ze mogelijk genotoxisch en immuunverstorend [68–70]. Ondanks het feit dat pyrethroïden meer dan drie decennia geleden werden geïntroduceerd voor de bestrijding van insectenplagen, zijn de potentiële gezondheidseffecten ervan bij lage omgevings- en voedingsblootstellingsniveaus nog onvoldoende gekend [68].

Chloorpyrifos is één van de meest gebruikte organofosfaatpesticiden [1]. De belangrijkste bronnen van humane blootstelling zijn oraal via voeding en drinkwater, na inademing en via huidcontact bij gebruik van chloorpyrifos [71]. Chloorpyrifos wordt in het lichaam afgebroken tot verschillende metabolieten, waaronder 3,5,6 trichloor-2-pyridinol (TCPy). Deze metaboliet is specifiek voor chloorpyrifos en kan gemeten worden in urine, TCPy gehalten in urine weerspiegelen de blootstelling aan chloorpyrifos van de voorbije 2 dagen [1]. Op basis van dierproefstudies en bevolkingsstudies zijn er aanwijzingen dat chloorpyrifos neurotoxische en hormoonverstorende eigenschappen heeft, het wordt niet als kankerverwekkend beschouwd [71]. In de Europese Unie (EU) is chloorpyrifos niet langer goedgekeurd voor gebruik waardoor verwacht wordt dat de blootstelling zal afnemen [2]. Ook voor chloorpyrifos geldt dat de gezondheidseffecten van bij de lage gehalten die gemeten worden in de algemene bevolking nog onvoldoende gekend zijn [71].

Tabel 3 Overzicht van richting en significantie van blootstelling-effect associaties voor pesticiden in FLEHS IV

	2,4-D	3-PBA	TCPy	AMPA (BIN)	Glyfosaat (BIN)
8-oxodG	POS*	POS*	POS*	POS*	POS
Komeetest	POS	POS	NEG*	POS	NEG
Telomeerlengte	NEG	POS	POS	NEG	NEG
Leukocyten aantal	POS	POS	NEG	POS	POS
Neutrofielen aantal	POS	POS	NEG	NEG	NEG
Lymfocyten aantal	NEG	POS	NEG	POS	POS
Neutrofiel-lymfocyt ratio	POS	POS	NEG	NEG	NEG
Eosinofielen aantal	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
Monocyten aantal	POS	POS*	POS	POS	POS
Basofielen aantal	POS*	POS	POS	NEG	POS
eNO	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
Allergie	POS	POS	NEG	POS	POS
Allergie combinatie	POS	POS	NEG	POS	NEG
Astma dokter	NEG	NEG	POS	POS	POS
Astma huidig	NEG	POS	POS	POS	POS
Astma ooit	NEG	POS	NEG	POS*	POS
Medicatie astma	NEG	NEG	POS	NEG	POS
Hooikoorts ooit	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
Medicatie hooikoorts	POS	POS	NEG	NEG	NEG
Medicatie eczeem	NEG	POS	NEG	POS	POS
BMI (z-score)	NEG	NEG*	NEG*	NEG	NEG
Ratio Buikomtrek en lengte	NEG*	NEG*	NEG*	NEG	NEG
Risico abdominale obesitas	NEG	NEG	NEG*	POS	NEG*
Bloedvet	POS	POS	POS	NEG	NEG
Cholesterol	POS	NEG*	NEG	NEG	NEG
Triglyceriden	POS*	POS	NEG	NEG	NEG
Hartritme	POS	POS	POS	POS	POS
Diastolische bloeddruk	NEG*	POS	POS	NEG	NEG
Systolische bloeddruk	NEG	NEG	NEG	NEG*	NEG
Cortisol	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
Leeftijd menarche	POS	POS	NEG	POS	POS
Menarche laat	NEG	NEG	NEG	POS	POS
Tanner stadium borstontwikkeling meisjes	POS*	POS	POS	POS*	POS
Tanner stadium genitale ontwikkeling jongens	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Tanner stadium pubis haar jongens	POS	NEG	POS	NEG	NEG
Tanner stadium pubis haar meisjes	POS	NEG	NEG	POS	POS
Schildklier stimulerend hormoon (TSH)	POS*	POS	POS	NEG	NEG
Vrij thyroxine (FT4)	POS	POS	NEG	POS	POS
Vrij tri-joodthyronine (FT3)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

NEG: daling in effectmerker bij stijging in bisfenol concentratie

POS: stijging in effectmerker bij stijging in bisfenol concentratie

*Blootstelling-effect associatie is significant ($p \leq 0,05$)

2,4-D: 2,4-dichlorofenoxy-azijnzuur, 3-PBA: 3-fenoxybenzoëzuur, TCPy: 3,5,6 trichloor-2-pyridinol, AMPA: aminomethylfosfonzuur, BIN: binaire variabele, eNO: uitgeademd stikstofdioxide, 8-oxodG: 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine

3.2.3.1 Genotoxiciteit in relatie tot interne blootstelling aan pesticiden

In de volledige FLEHS IV studiepopulatie (n = 397) waren hogere urinaire gehalte van 2,4-D, 3-PBA, TCPy significant geassocieerd met hogere concentraties van de oxidatieve stress biomarker 8-oxodG in urine.

Bij jongens was ook een detecteerbare gehalte AMPA significant geassocieerd met hogere concentraties 8-oxodG in urine. De resultaten voor de komeetttest waren niet éénduidig. Alle modellen werden gecorrigeerd voor urinaire dichtheid, geslacht, leeftijd, BMI, SES, seizoen van staalname, actief en passief roken. De resultaten in FLEHS IV sluiten aan bij de resultaten in de ORGANIKO studie bij 177 Cypriotische kinderen (10-12 jaar), ook hier was 8-oxodG als oxidatieve stress biomarker significant hoger bij hogere urinaire concentraties van 3-PBA, TCPy en AMPA [78]. In FLEHS IV was het verband tussen detectie van AMPA en oxidatieve stress enkel significant bij jongens. Zoals eerder gepubliceerd door De Troeyer et al [10], werden in FLEHS IV hogere AMPA gehalten bij jongens dan bij meisjes geobserveerd, in overeenstemming met de literatuur. De Troeyer et al suggereert dat jongens mogelijk meer tijd buiten spenderen en dat daarom de blootstelling aan glyfosaat en AMPA hoger kan zijn. De hogere concentraties spelen mogelijk ook een rol in het verschil in associatie met oxidatieve stress tussen jongen en meisjes. Eerder onderzoek in FLEHS IV toonde aan dat de urinaire AMPA concentraties in deze studiepopulatie hoger zijn bij meer landbouw in de woonbuurt, ook deze associatie was meer uitgesproken bij jongens [10].

3.2.3.2 Immune biomarkers en immune effecten in relatie tot interne blootstelling aan pesticiden

Bij FLEHS IV jongeren was een hogere concentratie 3-PBA in urine significant geassocieerd met een hogere aantal monocyten (n = 388). Een verhoogde concentratie van 2,4-D was enkel in de jongens significant geassocieerd met een verhoogd aantal basofielen. Bij jongens was daarnaast een detecteerbare gehalte AMPA in urine significant geassocieerd met hogere aantallen eosinofielen. Alle modellen werden gecorrigeerd voor urinaire dichtheid, geslacht, leeftijd, BMI (z-score), SES, seizoen van staalname, actief en passief roken. Monocyten spelen een belangrijke rol in de aangeboren afweer, hoge aantallen monocyten kunnen echter weefselschade veroorzaken [79]. Basofielen spelen een belangrijke rol bij het reguleren van de immunerespons van lymfocyten en hoge aantallen worden geassocieerd met de ontwikkeling van allergische reacties [80]. Eosinofielen zijn immuuncellen die een rol kunnen spelen in het initiëren van allergische reacties en astma [51]. De resultaten in deze studie zijn in lijn met eerder onderzoek waarin het gebruik van pesticiden gerelateerd wordt aan verstoring van de immunerespons [69,81]. Zo was in een recente studie het aantal monocyten bij Braziliaanse landbouwers die beroepsmatig aan een mengsel van pesticiden blootgesteld werden significant hoger dan bij een controlegroep [82]. Uitgebreide onderzoeksresultaten bij niet-beroepsmatige blootstelling of blootstelling bij adolescenten zijn echter beperkt beschikbaar en niet éénduidig [71,83]. Meer onderzoek naar blootstelling aan (mengsels van) huidig gebruikte pesticiden en vroege biomarkers van immuneverstoring is dus aangewezen.

De detectie van AMPA in urine was geassocieerd met een verhoogde kans op het ooit hebben van astma (n = 392). Bij meisjes was een verhoogde concentratie TCPy geassocieerd met een verlaagde kans op het ooit hebben van hooikoorts. Associaties tussen blootstelling aan pesticiden en immunerelateerde aandoeningen waren echter merendeels niet significant. De modellen werden gecorrigeerd voor leeftijd, geslacht, BMI, familiale allergie, passief roken, vocht, schimmel, seizoen van staalname en SES.

3.2.3.3 Cardiometabole biomarkers en effecten in relatie tot interne blootstelling aan pesticiden

Er werden meerdere significante associaties geobserveerd tussen blootstelling aan pesticiden en **cardiometabole** merkers. De modellen werden gecorrigeerd voor geslacht, leeftijd, seizoen van staalname, SES en SG.

Een verhoogde concentratie van 3-PBA in urine was significant geassocieerd met een lagere ratio buikomtrek en lengte (n = 405) en cholesterol (n = 398). In een studie met 87 diabetische jongeren (gemiddelde leeftijd 14.2 jaar) werd een significante associatie tussen 3-PBA en een hoger LDL-cholesterol concentratie en een niet significante associatie met hoger HDL-cholesterol concentratie vastgesteld, een gelijkaardig verband werd vastgesteld voor 2,4-D [84].



Een hogere concentratie 2,4-D was ook significant geassocieerd met een lagere ratio buikomtrek en lengte alsook een lagere diastolische bloeddruk (n = 407) en een hoger serum concentratie aan triglyceriden (n = 398). Een hogere TCPy concentratie was ook significant geassocieerd met een lagere ratio buikomtrek en lengte en een lager risico op abdominale obesitas (n = 405). Detectie van glyfosaat was eveneens geassocieerd aan een lager risico op abdominale obesitas (n = 414). Hogere concentraties 3-PBA en TCPy waren significant geassocieerd met een lager BMI (z-score) (n = 407) in de volledige studiebevolking, maar vanuit de interactie analyse blijkt dat dit effect enkel significant was voor de jongens. De associatie tussen 3-PBA concentratie en BMI werd onderzocht bij 3671 volwassenen van de Korean National Environmental Health Survey (KNEHS) studie [85]. Er werd vastgesteld dat bij lage concentraties een hogere blootstelling geassocieerd was met een hogere BMI, maar dat bij 3-PBA concentraties boven 4 ug 3-PBA/g creatinine de associatie omdraaide. Hoge 3-PBA concentraties waren boven deze concentratie significant geassocieerd met een lagere BMI. Ook experimentele studies bij dieren wijzen erop dat hoge doses pyrethroïden gewichtsverlies veroorzaken [85]. Orale blootstelling aan pyrethroïden werd in de literatuur bij beroepsblootstelling geassocieerd met anorexia (verminderde voedselinname en eetlust) en misselijkheid [86]. Verder waren enkel in de jongens hogere concentraties aan TCPy en 2,4-D respectievelijk geassocieerd met een hogere diastolische bloeddruk en hogere concentratie bloedvet in serum. Een hogere concentratie aan 2,4-D was enkel in de meisjes significant geassocieerd met een lager risico op abdominale obesitas en BMI (z-score). Een detectie van AMPA was significant geassocieerd met een lagere systolische bloeddruk (n = 416).

Mogelijk speelt ook het voedingspatroon (inname van pesticiden via groenten en fruit) van de jongeren een rol in de geobserveerde tussen pesticiden en cardiometabole merkers, dit werd in deze analyse echter niet meegenomen. Een recente review van studies naar de impact van huidig gebruikte pesticiden op de ontwikkeling van obesitas bij kinderen en jongeren wijst op tegenstrijdige resultaten bij zowel mensen als proefdieren [87], mogelijk door verschillen in de duur en dosis van de blootstelling en geslacht en leeftijd van de deelnemers. De review benadrukt ook de noodzaak voor bijkomend onderzoek naar de impact van pesticiden mengsels op metabole parameters.

3.2.3.4 Endocriene biomerkers in relatie tot interne blootstelling aan pesticiden

In deze studie waren er geen significante associaties tussen huidig gebruikte pesticiden en **cortisol concentraties in haar** (HCC) als biomarker van chronische endocriene stress (n = 395).

Blootstelling aan pesticiden werd ook in verband gebracht met effecten op de **puberteitsontwikkeling** (n = 239). Een hogere concentratie 2,4-D (n = 197) en detectie van AMPA (n = 202) waren significant geassocieerd met een versnelde borstontwikkeling bij meisjes. Voor de overige merkers van puberteit werden er geen significant verband vastgesteld. De modellen werden gecorrigeerd voor leeftijd, geslacht, BMI en SG. Een review van studies die de associatie van pesticide blootstelling met puberteitsontwikkeling hebben onderzocht, wees op verschillen in associaties volgens het beschouwde pesticide [88]. In deze review werd een significant verband gerapporteerd tussen blootstelling aan een mengsel van huidig gebruikte pesticiden in de prenatale en kindertijd en een vroegere puberteit bij meisjes. Verdere onderzoek wordt aangeraden naar specifieke klassen van pesticiden en naar pesticiden mengsels [88].

Een hogere concentratie 2,4-D (n = 239) was bovendien significant geassocieerd met een verhoogde concentratie TSH, wat een indicatie van een verstoorde **schildklierwerking** kan zijn. Enkel in de jongens was een detectie van glyfosaat significant geassocieerd met een verlaagde FT3 concentratie, ook dit kan een teken zijn van een verstoorde schildklierwerking. De modellen werden gecorrigeerd voor leeftijd, geslacht, BMI en SG.



3.2.4 Besluit

De FLEHS IV-resultaten tonen de algemene blootstelling van Vlaamse jongeren aan meerdere huidig gebruikte pesticiden (2,4-dichlorofenoxy-azijnzuur, chloorpyrifos en pyrethroïden). Analyses in deze studie wijzen op een toename in oxidatieve stress en verstoring van de vroege immuunrespons bij jongeren in relatie tot blootstelling aan verschillende individuele biomerkers. Het herbicide glyfosaat wordt in minder dan de helft van de urinestalen aangetroffen, detecteerbare gehalten van de metaboliet AMPA zijn evenwel ook gerelateerd aan meer oxidatieve stres bij jongens. De bevindingen in deze studie zijn wat betreft vroege biologische veranderingen in oxidatieve stress en immuunrespons in lijn met de bestaande literatuur, die voornamelijk de gezondheidsrisico's van pesticiden bij beroepsblootstelling beschrijft en recente bevindingen bij Cypriotische kinderen.

Pesticide blootstelling is bij FLEHS IV adolescenten geassocieerd met merkers van cardiometabole gezondheid, in de literatuur is er weinig wetenschappelijk onderzoek gedaan naar deze relatie in adolescenten. Er zijn aanwijzingen dat blootstelling aan pesticiden gerelateerd kan zijn aan verstoring van het cardiometabole systeem. Een gelijkaardige conclusie kan gemaakt worden voor endocriene merkers. De gelimiteerde bestaande literatuur, net zoals de FLEHS IV bevindingen, wijzen op een mogelijk relatie tussen blootstelling aan pesticiden en endocriene verstoring. Meer onderzoek is sterk aangewezen.

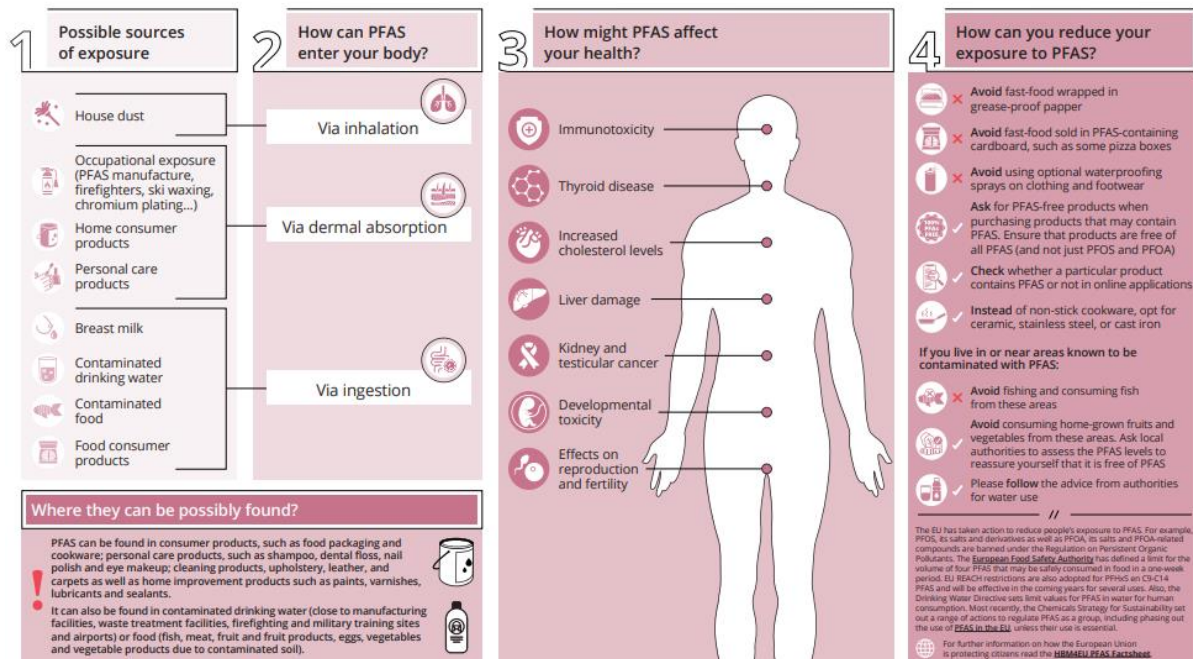
Bij de interpretatie van deze resultaten dient te worden opgemerkt dat een kortdurende blootstelling (voorbije dagen) in verband wordt gebracht met gezondheidseffecten die soms over verschillende jaren lopen. Dit veronderstelt dan dat er een chronische blootstelling is aan deze pesticiden gehalten. De alomtegenwoordigheid van bestrijdingsmiddelen in het Vlaams milieu maakt blootstelling momenteel onvermijdelijk. Bovendien wordt verwacht dat door de klimaatverandering zowel het persoonlijk gebruik van pesticiden als gebruik van pesticiden in de landbouw in West-Europa zal toenemen [89]. Hoewel de beschouwde pesticiden niet persistent zijn, kan de constante en dus langdurige blootstelling aan deze pesticiden tijdens de adolescentie ongunstige gezondheidseffecten hebben, ook later in het leven. Verder onderzoek naar biologische veranderingen en gezondheidseffecten in relatie tot mengsels van pesticiden is aangewezen. FLEHS IV resultaten kunnen bijdragen aan de inschatting van het gezondheidsrisico van huidig gebruikte pesticiden.

3.3 PERFLUORVERBINDINGEN

3.3.1 Achtergrond

PFAS is de verzamelnaam voor meer dan 6000 poly- en perfluoralkylstoffen die gebruikt worden om producten vet-, water- of stofafstotend te maken (vb. antiaanbaklaag in pannen, cosmetica, textiel, brandblusschuim, schoonmaak- en smeermiddelen). Omwille van hun persistentie blijven PFAS lang in de leefomgeving aanwezig en kunnen ze ook accumuleren in het lichaam van mens en dier [90]. De mens neemt PFAS vooral op via de voeding (eigen geteelde voedselproducten kunnen een belangrijke bron van blootstelling zijn), het drinken van (verontreinigd) water en stofingestie. Het belang van de lucht voor PFAS-opname wordt momenteel nog onderzocht. PFAS verspreiden zich na opname over het hele lichaam, met de hoogste gehalten in de lever, nieren en in het bloed [91]. De meest bestudeerde PFAS zijn de verbindingen met lange koolstofketens perfluorooctaansulfonzuur (PFOS), perfluorooctaanzuur (PFOA), perfluornonaanzuur (PFNA) en het iets kortere perfluorhexaansulfonzuur (PFHxS) [90]. De concentratie aan lange koolstofketen PFAS in serum weerspiegelt de blootstelling van de voorbije jaren [1]. Er is nog onvoldoende kennis van de gezondheidseffecten van de vele PFAS [92].

Humane blootstelling aan PFAS wordt in de literatuur gerelateerd aan hormoon- en immuunverstoring, verstoring van de leverfunctie en mogelijk ook aan carcinogene effecten, IARC deelde in 2017 PFOA in bij de groep 2B, mogelijk kankerverwekkend voor de mens [90,93–97]. Gebruik van PFAS in Vlaanderen wordt gereguleerd door de EU-wetgeving [2]. Sinds enkele jaren leeft in Vlaanderen ook maatschappelijk sterk de bezorgdheid rond de aanwezigheid van PFAS in de leefomgeving. De mogelijke blootstellingsroutes en gezondheidseffecten van blootstelling aan PFAS worden weergegeven in Figuur 3 [31].



This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 733032

www.hbm4eu.eu



HBM4EU coordinator:
German Environment Agency hbm4eu@uba.de
Knowledge Hub coordinator:
European Environment Agency hbm4eu@eea.europa.eu

Figuur 3. Humane blootstellingsroutes en gezondheidseffecten van PFAS [31]

In FLEHS IV werden twaalf verschillende, voornamelijk lange koolstofketen, PFAS gemeten, waaronder PFOS, PFOA, PFNA en PFHxS [1,2]. In de referentiepopulatie van FLEHS IV werden PFOS en PFOA in alle serummonsters gekwantificeerd, wat wijst op alomtegenwoordige blootstelling bij Vlaamse adolescenten. PFOS vertoonde de hoogste concentratie, gevolgd door PFOA, terwijl de niveaus van PFNA en PFHxS lager waren. Perfluordecaanzuur (PFDA) kon in 42% van de deelnemers worden gekwantificeerd, terwijl de concentraties van de andere PFAS meestal onder de LOQ lagen. De gemeten concentraties van PFOS, PFOA, PFHxS en PFNA in de FLEHS IV referentiepopulatie jongeren waren vergelijkbaar met recent gepubliceerde internationale HBM-studies. De gezondheidkundige EFSA toetsingswaarde voor de som van PFOS, PFHxS, PFOA en PFNA van 6,9 ng/ml werd overschreden door 15,7% van de jongeren [1].

3.3.2 Materiaal en methode

Bij 583 FLEHS IV jongeren werden twaalf PFAS in serum gemeten: PFOA, PFOS, PFHxS, PFNA, PFDA, perfluoropentaanzuur (PFPeA), perfluorhexaanzuur (PFHxA), perfluorheptaanzuur (PFHpA), perfluorundecaanzuur (PFU(n)DA), perfluordodecaanzuur (PFDoDA), perfluorbutaansulfonzuur (PFBS), perfluorhetpaansulfonzuur (PFHpS).

De analysemethode voor PFAS werd reeds eerder beschreven [2]. PFAS met een detectiefrequentie >60% (PFOS, PFOA, PFHxS, PFNA) werden verder meegenomen als continue variabelen. Voor concentraties onder de LOQ werd een willekeurige waarde geïmputeerd tussen 0 en de LOQ [23]. PFDA met een detectiefrequentie van 42% (< 60%) werd in de verdere analyses als binaire variabele meegenomen, de overige PFAS waarvan het overgrote deel van de resultaten <LOQ lagen werden niet verder meegenomen in de analyses. We specificerden twee meervoudige regressiemodellen (lineair voor continue effecten, logistisch voor binaire effecten) met verschillende niveaus van correctie voor *a priori* gedefinieerde potentiële confounders, gebaseerd op de literatuur. Model I was gecorrigeerd voor geslacht en leeftijd. Model II was daarnaast gecorrigeerd voor associatie-specifieke covariaten.

3.3.3 Resultaten

Een overzicht van de richting en significantie van blootstelling-effect associaties voor PFAS in FLEHS IV wordt gepresenteerd in Tabel 4.

Tabel 4. Overzicht van richting en significantie van blootstelling-effect associaties voor PFAS in FLEHS IV

	PFOA	PFOS	PFHxS	PFNA	PFDA (BIN)
8-oxodG	POS	POS	POS	POS	POS
Komeetest	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
Telomeerlengte	POS	POS	POS	POS	POS
eNO	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
Leukocyten aantal	NEG	NEG	NEG	POS	POS
Neutrofielen aantal	NEG	NEG	NEG	POS	POS
Lymfocyten aantal	POS	POS	POS	POS	POS
Neutrofiel-lymfocyt ratio	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Eosinofielen aantal	POS	POS	POS	POS	POS
Monocyten aantal	NEG	POS	NEG	NEG	POS
Basofielen aantal	POS	NEG	POS	NEG	POS
Allergie	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Allergie combinatie	NEG	NEG*	NEG	NEG*	NEG
Astma dokter	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
Astma huidig	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
Astma ooit	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG*
Medicatie astma	POS	POS	POS	POS	NEG
Hooikoorts ooit	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Medicatie hooikoorts	NEG	NEG	NEG	NEG*	NEG
Medicatie eczeem	NEG	POS	POS	POS	POS
BMI (z-score)	NEG	NEG*	NEG	NEG*	NEG*
Ratio Buikomtrek en lengte	POS	NEG	POS	NEG	NEG
Risico abdominale obesitas	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
Bloedvet	POS	POS	NEG	POS	POS
Cholesterol	POS	POS	POS	POS	POS
Triglyceriden	NEG	POS	NEG	POS	NEG
Diastolische bloeddruk	POS	NEG	NEG	POS	POS
Systolische bloeddruk	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Hartritme	POS	NEG	NEG	POS	POS
Cortisol	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
Leeftijd menarche	POS	NEG	POS	NEG	NEG
Menarche laat	POS	POS	POS	POS	POS
Tanner stadium borstontwikkeling meisjes	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
Tanner stadium genitale ontwikkeling jongens	NEG	NEG	NEG	NEG*	NEG
Tanner stadium pubis haar jongens	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG



	PFOA	PFOS	PFHxS	PFNA	PFDA (BIN)
Tanner stadium pubis haar meisjes	NEG	POS	POS	POS	POS
Schildklier stimulerend hormoon (TSH)	POS*	POS	POS*	POS	POS
Vrij thyroxine (FT4)	NEG	POS*	POS	POS	POS
Vrij tri-joodthyronine (FT3)	NEG	POS	POS	NEG	NEG

NEG: daling in effectmerker bij stijging in bisfenol concentratie

POS: stijging in effectmerker bij stijging in bisfenol concentratie

*Blootstelling-effect associatie is significant

BIN: binaire variabele, eNO: uitgeademd stikstofdioxide, 8-oxodG: 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, PFOA:

perfluorocetaanzuur, PFOS: perfluorocetaansulfonzuur, PFHxS: perfluorhexaansulfonzuur, PFNA: perfluornonaanzuur, PFDA: perfluordecanaanzuur

3.3.3.1 Oxidatieve stress and genotoxiciteit in relatie tot interne blootstelling aan PFAS

In deze studiepopulatie (n = 538) werden geen significante verbanden vastgesteld tussen serum gehalten van PFOA, PFOS, PFHxS, PFNA, detecteerbare serum gehalten aan PFDA en 8-oxodG concentraties in urine in modellen, gecorrigeerd voor leeftijd, geslacht, soortelijk gewicht, BMI, SES, seizoen en roken. Er is echter een significant verschil volgens geslacht in de associatie tussen detecteerbare serum gehalten aan PFDA en 8-oxodG. De associatie is significant bij meisjes, maar niet bij jongens. Voor de overige PFAS is dit verschil in het verband met oxidatieve stress volgens geslacht er niet. Er waren geen significante associaties tussen voorgenoemde PFAS en de resultaten van de kommeettest na correctie voor leeftijd, geslacht, BMI, SES, seizoen en roken. Ook voor telomeerlengte werden er geen significante associaties met PFAS vastgesteld.

3.3.3.2 Immuun biomerkers en immuun effecten in relatie tot interne blootstelling aan PFAS

In de gehele FLEHS IV studiepopulatie waren er geen significante verbanden tussen serum gehalten van PFOA, PFOS, PFHxS, PFNA, detecteerbare gehalten aan PFDA en de **leukocyten** aantallen (n = 552). De verbanden werden gecorrigeerd voor leeftijd, geslacht, BMI, SES, seizoen en roken.

Er waren echter significante verschillen in de resultaten tussen jongens en meisjes. Significante geslachtsverschillen in associaties tussen PFAS en immuungerelateerde eindpunten, zonder een duidelijk patroon per geslacht, werden eerder gerapporteerd [95,98]. Bij meisjes waren hogere PFOA, PFOS en PFHxS gehalten significant geassocieerd met een lager aantal neutrofielen en een lagere neutrofiel-lymfocyt ratio. Neutrofielen spelen een essentiële rol in de aangeboren afweer, meer bepaald bij rekrutering en differentiatie van macrofagen bij inflammatie, in de angiogenese en de activering van het immuunsysteem bij infecties [79,99,100]. Lymfocyten zijn een diverse groep immuuncellen die zowel deelnemen aan de aangeboren als aan de adaptieve immuniteit [101]. Daarnaast waren hogere PFOS-concentraties bij meisjes significant geassocieerd met hogere aantallen eosinofielen. Eosinofielen kunnen een rol spelen in het initiëren van allergische reacties en astma [51]. Bij jongens waren daarentegen hogere PFOS, PFNA en detecteerbare gehalten PFDA significant geassocieerd met hogere aantallen neutrofielen, een biomarker voor inflammatie [102]. In het subsidieproject Milieu en Gezondheid 2021 [5] (MG2021), was in dezelfde FLEHS IV studiepopulatie de serumconcentratie van het pro-inflammatoire cytokine tumor necrosis factor alfa (TNF- α) enkel significant hoger in relatie tot hogere PFOA-gehalten bij jongens, niet bij meisjes. Daarnaast werden in het MG2021 onderzoek bij zowel meisjes als jongens significant hogere IL-8 concentraties in relatie tot hogere PFOA-gehalten en significant lagere IL-6 concentraties in relatie tot hogere PFOS-gehalten vastgesteld. Tussen de voorgenoemde PFAS en luchtweginflammatie (eNO) werd bij de FLEHS-jongeren geen significant verband vastgesteld.

Associaties van PFAS-blootstelling met **immuungerelateerde aandoeningen** werden gecorrigeerd voor leeftijd, geslacht, BMI, familiale allergie, passief roken, vocht, schimmel, seizoen van staalafname en SES. Hogere PFOS- en PFNA- serumgehalten waren significant geassocieerd met lagere kans op een allergie voor voeding, geneesmiddelen, insectenbeten, metaal, verzorgingsproducten of huishoud- en onderhoudsproducten (n = 546). Voor PFOS werd dit significant verband gedreven door een significante associatie bij de jongens. Detecteerbare gehalte aan PFDA was in de volledige studiepopulatie significant gerelateerd aan een lagere kans om ooit astmatische klachten te hebben gehad (n = 542) en enkel voor de meisjes significant geassocieerd met een lagere kans om van een arts een astma diagnose gekregen te hebben. Hoger PFNA-serumgehalte was significant geassocieerd met een lagere kans op het nemen van hooikoorts medicatie in het afgelopen jaar (n = 545). Hogere PFNA- en PFHxS-concentraties waren enkel voor de jongens significant geassocieerd met een lagere kans op het ooit hebben van hooikoorts. Een hoger PFOS-serum gehalte was significant geassocieerd met een verhoogde kans op het nemen van medicatie voor eczeem, maar enkel voor de jongens.

In de **pre-post studie** is de associatie tussen zowel prenatale als huidige PFAS-blootstelling en allergie gerelateerde aandoeningen onderzocht op de subset van FLEHS IV adolescenten (n = 182), die als pasgeborenen deelnamen aan de FLEHS I studie. Er werd een associatie vastgesteld tussen verhoogde PFAS-blootstelling in navelstrengbloed en verhoogde prevalentie van astma en rhinitis tijdens de adolescentie. Blootstelling aan hogere PFAS-gehalten tijdens adolescentie werd geassocieerd met een lagere prevalentie van allergie en rhinitis in de adolescenten. Dit is in lijn met de resultaten die we hier presenteren.

Ook in eerdere FLEHS-studies was blootstelling aan perfluors (PFOS, PFOA) geassocieerd met verstoring van het immuunsysteem (kans op astma, hooikoorts en allergie), maar zijn de bevindingen niet consistent [46].

Het verband tussen immuun effecten en PFAS-blootstelling wordt ook onderzocht in jongeren van vier Europese cohorten (e.g. Sloveense SLO CRP, Tsjechische Pilot school children en Duitse GERES V), waaronder de FLEHS IV jongeren, in het kader van HBM4EU. Verschillende aandoeningen worden onderzocht: drie astma effectmerkers (e.g. astma laatste jaar, astma ooit en astma dokter), twee hooikoorts effectmerkers (e.g. hooikoorts ooit en hooikoorts dokter), twee eczema effectmerkers (e.g. eczema ooit en eczema dokter) en vier allergie effectmerkers (e.g. dier allergie, metaal allergie, voeding allergie en allergie combinatie). Deze analyses zijn lopende.

Samengenomen wijzen de resultaten in de FLEHS IV jongerenpopulatie op een significante impact van blootstelling aan PFAS op vroege merkers van de immuunrespons en op immuungerelateerde aandoeningen, zoals eveneens aangetoond werd in eerdere studies [90,101,102]. Verschillende studies beschrijven de significante impact van PFAS op vroege merkers van immuunverstoring, zoals leukocyten [95,102]. De literatuur rond de associaties van PFAS met immuungerelateerde aandoeningen zoals astma en allergie is niet eenduidig [95]. Dit is mogelijk deels te wijten aan het cross-sectioneel studieopzet van de meeste studies, longitudinale studies zijn beter geschikt om de ontwikkeling van ziekten te bestuderen vanwege de gelijktijdige evaluatie van blootstelling en ziekten [95]. Vanuit dat opzicht is het vaststellen van een significant verband tussen verhoogde PFAS-waarden in navelstrengbloed en een verhoogde prevalentie van astma en rhinitis tijdens de adolescentie bij FLEHS I jongeren een zeer relevante aanvulling op de cross-sectionele analyses in dit onderzoek. Het interpreteren van bevindingen met betrekking tot immuunrespons, astma en allergie is een uitdaging omwille van de complexiteit en heterogeniteit van de mogelijk onderliggende biologische mechanismes (vb. verschillende endotypes zoals eosinofiele astma, neutrofiele astma) [103]. Verschillen in endotype kunnen een rol spelen in hoe PFAS de ontwikkeling van de ziekte en/of verergering van de ziektesymptomen beïnvloeden [95].

3.3.3.3 Cardiometabole biomerkers en effecten in relatie tot interne blootstelling aan PFAS

In de volledige FLEHS IV studiepopulatie werden er significante verbanden tussen PFAS en **metabole parameters** geobserveerd. De associaties werden gecorrigeerd voor geslacht, leeftijd, seizoen en SES. Er waren echter significante verschillen in associaties tussen jongens en meisjes.



Hogere serumgehalten van PFOS en PFNA en detecteerbare gehalte PFDA waren significant geassocieerd met een lagere BMI (z-score) (n = 407). Voor PFOS en PFDA waren de jongens de drijver van deze associatie. Bij jongens, was een hoger PFOS-serumgehalte significant ook geassocieerd met een lager risico op abdominale obesitas en een lagere ratio buikomtrek en lengte.

In de Veneto-studie, werden 4 PFAS (PFOA, PFOS, PFHxS, PFNA) gemeten bij 6669 adolescenten (14–19 jaar) en 2693 kinderen (8–11 jaar) in een Italiaanse hotspot regio voor PFAS-blootstelling. Hogere PFOS concentraties waren in serum, in lijn met de bevindingen bij FLEHS-jongeren, geassocieerd met een lagere BMI z-score bij adolescenten en kinderen [104]. PFDA werd in de Veneto-studie niet gemeten. In de Veneto-studie was de associatie meer uitgesproken bij adolescente meisjes, er was geen verschil in de associatie volgens geslacht bij kinderen. De associatie tussen PFAS en BMI werd ook in HBM4EU onderzocht bij 1957 adolescenten (12-18 jaar) uit 9 Europese landen, waaronder 300 FLEHS IV jongeren [105]. De resultaten waren in lijn met de bevindingen bij FLEHS IV adolescenten [104,105].

Bij onderzoek naar verbanden tussen PFAS en **bloedvetten** bij FLEHS IV jongeren waren hogere PFHxS-serumgehalten bij jongens significant geassocieerd met een lager gehalte aan triglyceriden in serum. De Veneto-studie rapporteerde geen significante associaties tussen PFAS en triglyceriden, de niet-significante dalende trend in de associatie PFHxS-triglyceriden was wel in lijn met de FLEHS bevindingen. In de FLEHS IV studiepopulatie werd geen significante associatie tussen PFAS en cholesterol geobserveerd, de niet significante trend van hogere cholesterolwaarden bij hogere blootstelling aan alle gemeten PFAS congenen is in lijn met de literatuur bij jongeren [104,106,107]. In de Veneto-studie werd een significante stijging in serum cholesterol geobserveerd bij een hogere concentratie van de gemeten PFAS congenen [104]. Deze associatie was sterker bij kinderen dan bij jongeren. In het C8 Health Project bij 12 476 Amerikaanse kinderen en adolescenten waren hogere PFOA en PFOS waarden significant geassocieerd met hogere cholesterol concentraties[106]. Een kleine Taiwanese studie bij 225 jongeren (12-15jaar) observeerde eveneens significant hogere triglyceriden concentraties bij hogere PFOS-blootstelling met [107]. De FLEHS IV resultaten vertonen voor de PFOS-triglyceriden associatie eenzelfde trend, alhoewel de associatie niet significant is. Gelijkaardig aan de resultaten in de Veneto-studie [104] , werden in FLEHS IV geen significante effecten vastgesteld voor **systolische en diastolische bloeddruk**.

3.3.3.4 Endocriene biomerkers in relatie tot interne blootstelling aan PFAS

De **cortisol** concentratie in haar in de FLEHS IV studiepopulatie (n = 388) was niet significant gerelateerd aan PFAS in modellen gecorrigeerd voor leeftijd, geslacht, BMI, SES, seizoen en roken. Voor merkers van de **puberteitsontwikkeling** werd er een significant verband vastgesteld tussen een hoger PFNA-serumgehalte en een vertraagde genitale ontwikkeling bij jongens (n = 257), wat kan wijzen op een vertraagde puberteit. De modellen werden gecorrigeerd voor leeftijd, BMI, seizoen van staalname, SES en passief roken. Een gelijkaardig verband tussen prenatale blootstelling aan PFNA en vertraagde genitale ontwikkeling in jongens werd in de Danish National Birth Cohort DNBC puberteit cohort vastgesteld [108].

Het C8 Health Project observeerde in een studie bij 2931 meisjes (8-18 jaar) een associatie tussen hogere concentraties van PFOA en PFOS en een grotere kans op een verlate start van de maandstonden [109]. Die trend werd ook geobserveerd bij FLEHS IV adolescenten. De associatie is evenwel niet significant, mogelijk wegens de kleinere studiepopulatie. De bestaande literatuur rapporteert verschillende, niet-monotone relaties tussen blootstelling aan verschillende PFAS congenen en puberteitsontwikkeling [109,110]. Zowel vroegtijdige of vertraagde puberteit kunnen worden beschouwd als een belangrijke indicator van endocriene verstoring, en zijn in verband gebracht met een verhoogd risico van ziekten op volwassen leeftijd: diabetes mellitus, hartziekten, botoandoeningen, drugsmisbruik en astma [110].

Er werden significante verbanden vastgesteld tussen serumgehalte PFAS en **schildklierhormonen** (n = 239). De modellen werden gecorrigeerd voor leeftijd, geslacht en BMI. Een hogere serumgehalten PFOA en PFHxS waren significant geassocieerd met hoger concentratie TSH. Een hoger gehalte PFOS was significant geassocieerd met een hoger FT4 waarde. Beide kunnen wijzen op een verstoorde schildklierwerking. Er werden geen significante verschillen vastgesteld tussen de geslachten. In de literatuur worden zowel positieve als negatieve associaties van PFAS met TSH en schildklierhormonen gerapporteerd [110,111].

3.3.4 Besluit

Hoewel de cross-sectioneel geobserveerde associaties tussen PFAS en immuunparameters verschillen volgens de individuele PFAS en volgens geslacht, wijzen de resultaten in de FLEHS IV jongerenpopulatie op een significante impact van blootstelling aan PFAS op vroege merkers van zowel de aangeboren als adaptieve immuunrespons.

Ook voor schildklierhormonen werden er significante associaties met verschillende PFAS geobserveerd. De verscheidenheid in bevindingen rond de impact van PFAS op immuunrespons en schildklier werd eerder reeds aangetoond in experimentele en epidemiologische studies. Gezien de bioaccumulatie van PFAS, de gelijktijdige blootstelling aan meerdere PFAS en de kwetsbaarheid van het ontwikkelend endocriene systeem en immuunsysteem tijdens de adolescentie, zijn deze resultaten relevant voor de gezondheid van Vlaamse jongeren. Het verband tussen verhoogde intra-uteriene PFAS-blootstelling en een hogere prevalentie van astma en rhinitis tijdens de adolescentie bevestigt de immuunversturende lange termijn impact van PFAS-blootstelling tijdens belangrijke ontwikkelingsfases en toont daarmee het belang van longitudinaal onderzoek aan. Ook voor schildklierhormonen werden er significante associaties met verschillende PFAS geobserveerd. De verscheidenheid in bevindingen rond de impact van PFAS op immuunrespons en schildklier werd eerder reeds aangetoond in experimentele en epidemiologische studies. Gezien de bioaccumulatie van PFAS, de gelijktijdige blootstelling aan meerdere PFAS en de kwetsbaarheid van het ontwikkelend endocriene systeem en immuunsysteem tijdens de adolescentie, zijn deze resultaten relevant voor de gezondheid van Vlaamse jongeren.

De geobserveerde associaties tussen PFAS-blootstelling en lagere BMI (z-score) worden door verschillende andere studies bevestigd, daarnaast ondersteunt de literatuur de trend van hogere cholesterol bij hogere PFOS-blootstelling. Andere epidemiologische studies rapporteren ook evidentie van niet-monotone en tegengestelde verbanden, ook worden er verschillen in associaties per PFAS-congeneer gerapporteerd. De resultaten bij FLEHS IV adolescenten vertonen eveneens tegengesteld associaties, afhankelijk van de PFAS-congeneer. Gelijkaardige bevindingen worden geobserveerd bij PFAS-blootstelling in relatie tot puberteitsontwikkeling. Zowel de associaties vastgesteld in de FLEHS IV adolescenten als de literatuur wijzen op tegengestelde associaties.

In deze studie werd bovendien slechts een fractie gemeten van de PFAS die op de markt zijn. Veel van de alternatieve PFAS die nu de aan beperkingen onderworpen stoffen zoals PFOS en PFOA vervangen werden in deze studie niet gemeten. Meer HBM-onderzoek naar de vroege gezondheidsimpact van blootstelling aan een uitgebreidere set van PFAS, met aandacht voor mogelijke verschillen in verbanden volgens geslacht en PFAS-mengsel, is dus zowel onderzoeksmatig als beleidsmatig aangewezen.



3.4 ZWARE METALEN EN SPOORELEMENTEN

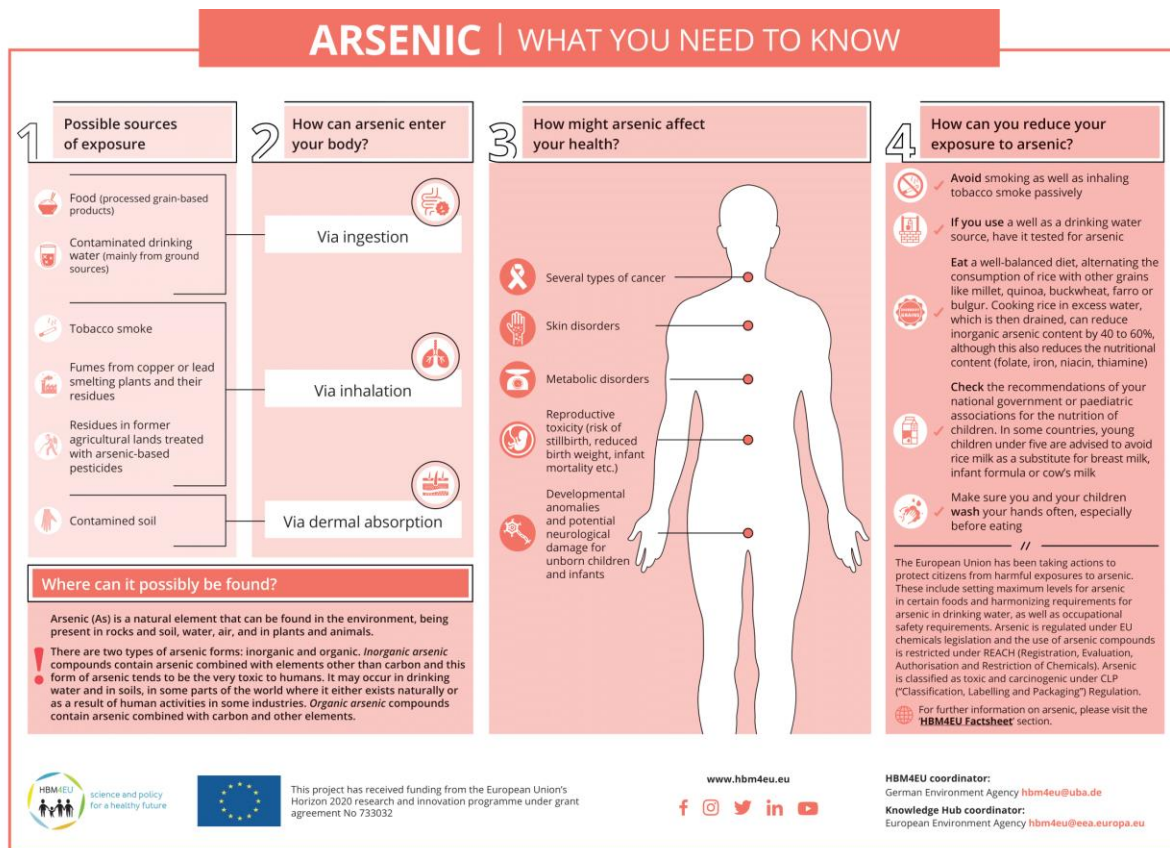
3.4.1 Achtergrond

Vlaanderen is een regio met veel industrieën die metalen gebruiken en uitstoten [112]. Historisch is industriële vervuiling in Vlaanderen dus een belangrijke oorzaak van te hoge concentraties van zware metalen in de leefomgeving [113]. Het grootste deel van de gekende verontreiniging met zware metalen is ontstaan op bedrijfsterreinen van de non-ferro industrie [113]. Door opwaaiend stof en atmosferische depositie is een grote hoeveelheid metalen vanuit de bedrijfsterreinen in de omgeving terechtgekomen, door uitloging komen zware metalen ook terecht in het grondwater.

In FLEHS IV werden naast arseen (As), cadmium (Cd), lood (Pb), thallium (Tl) ook de sporelementen koper (Cu), mangaan (Mn) en zink (Zn) gemeten. In het subsidieproject Milieu en Gezondheid 2021 werden reeds eerder een aantal blootstelling-effect associaties gerapporteerd voor metalen [5].

Arseen (As)

Arseen kan in sommige streken in o.a. Azië van nature in hoge concentraties voorkomen in de bodem en in het grondwater [114]. In Vlaanderen is historische vervuiling een belangrijke oorzaak van te hoge concentraties van As in de leefomgeving [113]. Belangrijke humane blootstellingwegen voor anorganisch As-species (As III, As V), de meest toxische vormen, zijn drinkwater, voeding (rijst, granen, vlees, vis en gevogelte), en ook in mindere mate inademing o.a. van stofdeeltjes (bodem, lucht) [115]. De minder toxische organische vorm arsenobetaine is voornamelijk afkomstig van visconsumptie. Anorganisch arseen wordt in het lichaam gemetaboliseerd tot organische verbindingen, waaronder monomethyl arseen (MMA) en dimethyl arseen (DMA). De som van As III, As V, MMA en DMA in urine is een maat voor toxisch relevant arseen (TRA) van de voorbije 1-2 dagen. Anorganisch arseen wordt geklasseerd als kankerverwekkend voor de mens (IARC groep 1); chronische blootstelling via voeding en drinkwater wordt geassocieerd met gastro-intestinale effecten, perifere neuropathie, cardiovasculaire ziekten, hypertensie, en diabetes [116]. Er zijn ook aanwijzingen dat As hormoon- en immuunverstorende eigenschappen heeft [114,115]. De biologische mechanismen die een rol kunnen spelen in de negatieve gezondheidsimpact van arseen zijn onvoldoende gekend; in de literatuur worden genotoxiciteit, inductie van oxidatieve stress, veranderingen in de DNA methylatie en immuunverstoring gesuggereerd [114,116]. Een overzicht van de mogelijke blootstellingsroutes en gezondheidseffecten van blootstelling aan As worden weergegeven in Figuur 4 [31].

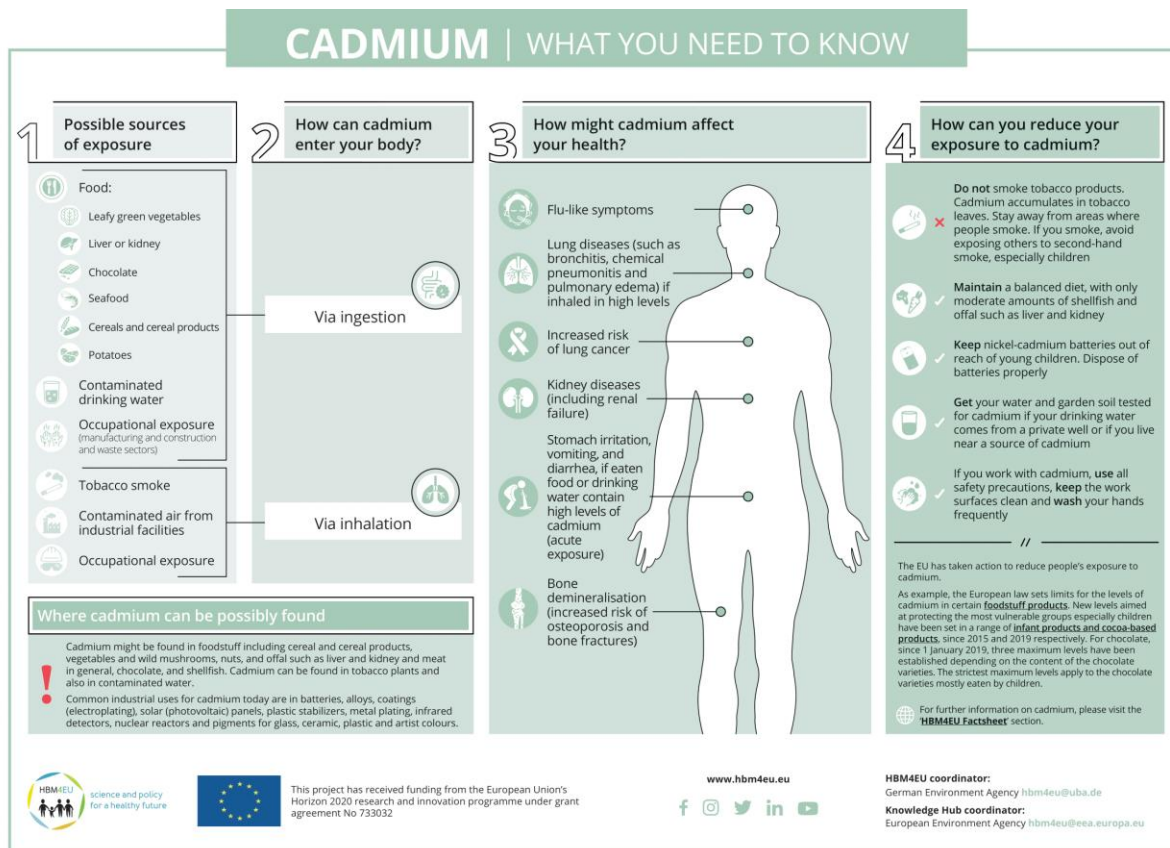


Figuur 4. Humane blootstellingsroutes en gezondheidseffecten van arseen [31]

De gemiddelde TRA concentraties bij Vlaamse jongeren bleven stabiel in FLEHS IV ten opzichte van FLEHS III [2]. De gezondheidkundige toetsingswaarde van 6,4 µg/l werd overschreden bij 25% van de FLEHS IV jongeren waarbij arseen gemeten werd (n = 194)[2,117]. FLEHS IV geometrische gemiddelde TRA niveaus bij jongeren zijn vergelijkbaar met gerapporteerd door US-CDC [2].

Cadmium (Cd)

Cadmium is een zwaar metaal dat van nature in heel lage concentraties in de bodem aanwezig is, maar ook in de industrie en metaalnijverheid gebruikt wordt. Naast industrie zijn meststoffen, geproduceerd uit fosfaatertsen een belangrijke bron van Cd in de leefomgeving. Humane blootstelling aan Cd verloopt via voeding en drinkwater en via het inademen van tabaksrook. Voor niet-rokers is de voeding de belangrijkste blootstellingsweg. Cd bioaccumuleert in verschillende organen en weefsels [118]. Cadmium wordt gemeten in bloed en urine. De meting in bloed geeft de recente blootstelling (2 tot 3 maanden) aan Cd weer en de meting in urine geeft een idee over de levenslange blootstelling. Cd wordt door IARC geklasseerd als kankerverwekkend voor de mens (groep 1) [119]. Cd blootstelling wordt ook geassocieerd met verstoorde nierwerking, verstoorde botvorming, hormoon- en immuunverstoring en verhoogde bloeddruk [12,118,120–122]. Een overzicht van de mogelijke blootstellingsroutes en gezondheidseffecten van blootstelling aan Cd worden weergegeven in Figuur 5 [31].

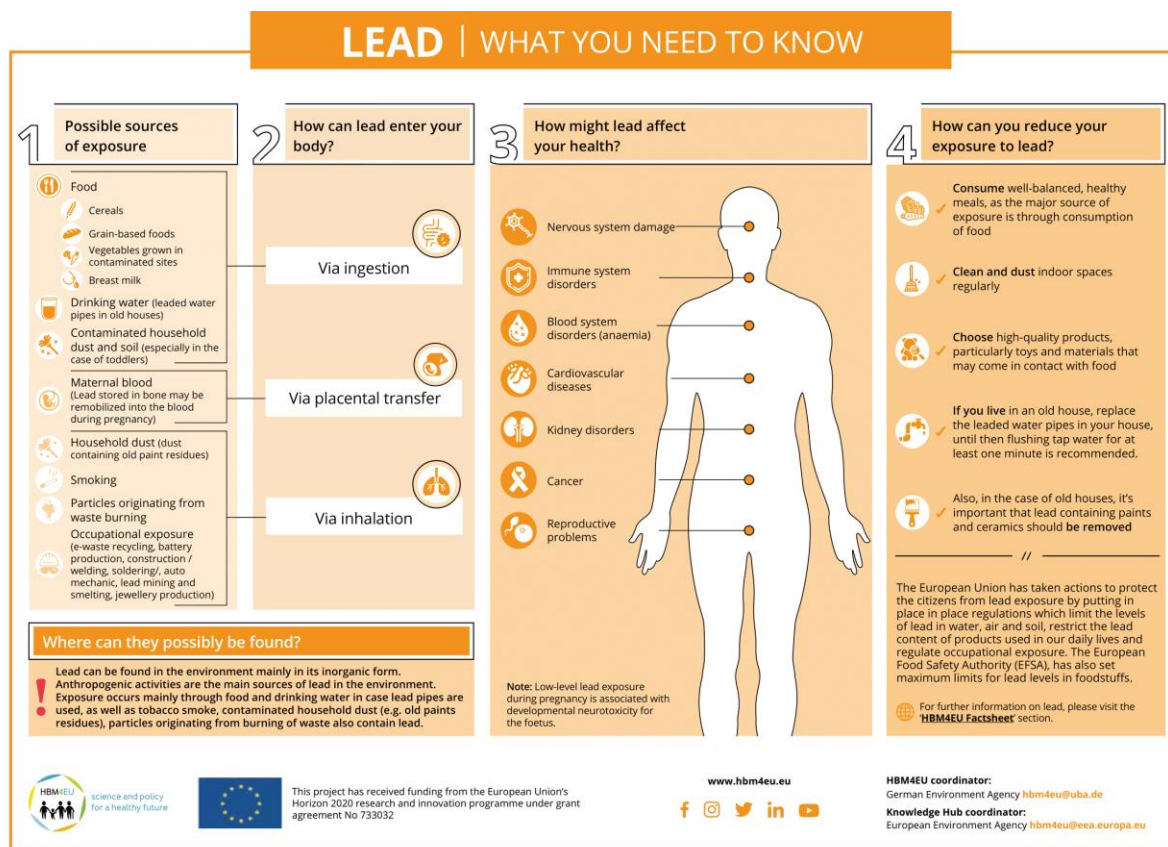


Figuur 5. Humane blootstellingsroutes en gezondheidseffecten van cadmium [31]

De gemiddelde concentraties van Cd in bloed bleven stabiel in FLEHS IV ten opzichte van FLEHS III [2]. De gezondheidskundige toetsingswaarde van 0,2 µg/g creatinine in urine werd overschreden door 39,5% van de studiepopulatie (n = 415) [2,123]. FLEHS IV geometrische gemiddelde concentraties van Cd in bloed zijn hoger dan gerapporteerd door US-CDC en Health Canada voor bemonstering in dezelfde periode (>2015) in een vergelijkbare leeftijdsgroep (12-19 jaar) [2].

Lood (Pb)

Het zware metaal, lood, is van nature in heel lage concentraties in de bodem aanwezig maar is ook historisch aanwezig in de omgeving van de non-ferro industrie en dichtbij drukke verkeersassen, in oude verflagen, oude loden waterleidingen. Door voortdurende circulatie van stof en water blijft lood aanwezig in de leefomgeving. Humane blootstelling aan lood verloopt via voeding, drinkwater, inname bodem- en stofdeeltjes en inademing van stofdeeltjes (lucht, bodem). Lood bioaccumuleert in het menselijk lichaam en wordt gemeten in bloed [124]. Lood als totale groep wordt geklasseerd als mogelijk kankerverwekkend (2B), anorganisch lood wordt geklasseerd door IARC (2006) als waarschijnlijk kankerverwekkend (groep 2A), organisch lood is niet te klasseren (groep 3) [125]. Chronische blootstelling aan Pb kan leiden tot bloedarmoede, nierfunctiestoornissen, stoornissen van vitamine D metabolisme, neurotoxiciteit, immuun- en hormoon verstoring [124,126]. Een overzicht van de mogelijke blootstellingsroutes en gezondheidseffecten van blootstelling aan Pb worden weergegeven in Figuur 6 [31].



Figuur 6. Humane blootstellingsroutes en gezondheidseffecten van Pb [31]

De niveaus van Pb in bloed zijn in FLEHS IV lager dan in de vorige FLEHS-studies [2]. De gezondheidkundige toetsingswaarde van 12 µg/l lood in bloed werd overschreden door 12% van de FLEHS IV jongeren (n= 419) [2]. FLEHS IV geometrische gemiddelde concentraties van Pb zijn hoger dan gerapporteerd door US-CDC en Health Canada voor bemonstering in dezelfde periode (>2015) in een vergelijkbare leeftijdsgroep (12-19 jaar) [2].

Thallium (Tl)

Thallium is een zwaar metaal dat van nature in heel lage concentraties in de bodem aanwezig is, maar door emissies van de industrie en historisch door gebruik van rattenvergift ook in de leefomgeving aanwezig is. Humane blootstelling verloopt voornamelijk via voeding, maar ook via drinkwater en via de lucht. Tl wordt gemeten in bloed en urine, de metingen geven een idee van de blootstelling op korte termijn (dagen of weken) [127]. Het internationale agentschap voor onderzoek naar kanker (IARC) heeft thallium niet aangeduid als zijnde kankerverwekkend [128]. Inname van een hoge dosis Tl kan leiden tot haarverlies, misselijkheid en braken, schade aan de zenuwbanen, orgaan falen [127,129]. Inname van een zeer hoge dosissen thallium kan dodelijk zijn. Gezondheidseffecten die geassocieerd worden met blootstelling aan lage concentraties thallium zijn onvoldoende gekend, het aantal humane studies is zeer beperkt [130]. De concentratie van Tl in urine nam licht toe in FLEHS IV ten opzichte van de vorige FLEHS-studie [2]. De gezondheidkundige toetsingswaarde van 5µg/l voor thallium in urine werd door geen enkele FLEHS IV jongere overschreden (n = 415) [2].

Spoorelementen koper (Cu), mangaan (Mn), zink (Zn)

Essentiële spoorelementen zijn stoffen die de mens nodig heeft voor zijn groei en ontwikkeling. De inname van spoorelementen via de voeding is wellicht de meest relevante bron van humane blootstelling voor de algemene, niet-beroepsmatige bevolking [131]. Te hoge concentraties spoorelementen kunnen echter toxisch zijn [132]. Koper is één van de meest voorkomende spoorelementen in het menselijk lichaam en speelt een rol bij meerdere lichaamsfuncties, maar kan in overmaat oxidatieve stress veroorzaken [50]. Mangaan dient als cofactor voor verschillende enzymen, maar kan bij hogere concentraties schadelijk zijn voor het zenuwstelsel en de cardiometabole gezondheid [133]. Zink wordt geacht bescherming te bieden tegen oxidatieve stress, er zijn echter mechanistische gegevens die suggereren dat een teveel aan zink de expressie van pro-inflammatoire cytokines kan verhogen en dyslipidemie kan veroorzaken [132].

3.4.2 Materiaal en methode

In FLEHS IV werd arseen (As), cadmium (Cd), thallium (Tl) in urine gemeten. Cd, Tl, lood (Pb), koper (Cu), mangaan (Mn), zink (Zn) werden geanalyseerd in bloed. De analysemethode werd reeds eerder uitgebreid beschreven [2,42].

We specificeerden twee meervoudige regressiemodellen (lineair voor continue effecten, logistisch voor binaire effecten) met verschillende niveaus van correctie voor *a priori* gedefinieerde potentiële confounders, gebaseerd op de literatuur. Model I was gecorrigeerd voor geslacht en leeftijd. Model II was daarnaast gecorrigeerd voor associatie-specifieke covariaten.

3.4.3 Resultaten

Een overzicht van de richting en significantie van blootstelling-effect associaties voor metalen in FLEHS IV wordt gepresenteerd in Tabel 5 en Tabel 6.

Tabel 5. Overzicht van richting en significantie van blootstelling-effect associaties voor metalen in urine in FLEHS IV

Metalen in urine	Asbet	As III	As V (BIN)	MMA	DMA	TRA	Cd	Tl
8-oxodG	NEG	POS	POS	POS*	POS	POS	POS*	POS*
Komeetest	NEG	NEG	POS	NEG	NEG*	NEG*	NEG	POS
Telomeerlengte	POS	POS*	NEG	POS	POS	POS	POS	POS
eNO	NEG*	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG
Leukocyten aantal	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	POS
Neutrofielen aantal	NEG	POS	POS	POS*	POS	POS	POS	POS
Lymfocyten aantal	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG*	NEG
Neutrofiel-lymfocyt ratio	NEG	POS*	POS*	POS*	POS	POS	POS*	POS
Eosinofielen aantal	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
Monocyten aantal	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG	POS
Basofielen aantal	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG	POS
Allergie	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS
Allergie combinatie	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS
Astma dokter	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	POS	POS
Astma huidig	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	POS
Astma ooit	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS
Medicatie astma	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	POS	POS
Hooikoorts ooit	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG*
Medicatie hooikoorts	NEG	NEG	NEG	NEG*	NEG	NEG	POS	NEG*
Medicatie eczeem	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
BMI (z-score)	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG*	POS
Ratio Buikomtrek en lengte	NEG	NEG	NEG	NEG*	NEG*	NEG*	NEG*	POS*

Metalen in urine	Asbet	As III	As V (BIN)	MMA	DMA	TRA	Cd	Tl
Risico abdominale obesitas	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG*	POS
Diastolische bloeddruk	NEG	NEG*	NEG	NEG	NEG*	NEG*	NEG*	NEG
Systolische bloeddruk	NEG	NEG	NEG	POS	NEG*	NEG*	NEG*	POS
Hartritm	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG
Bloedvet	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG	POS
Cholesterol	POS	NEG	POS	NEG	POS	POS	NEG	POS
Triglyceriden	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG	POS
Cortisol	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Leeftijd menarche	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
Menarche laat	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
Tanner stadium borstontwikkeling meisjes	POS	NEG	POS	NEG	POS	POS	POS	POS
Tanner stadium genitale ontwikkeling jongens	NEG	POS*	POS*	POS*	NEG	POS	NEG	NEG
Tanner stadium pubis haar jongens	NEG	POS*	POS*	POS*	NEG	POS	NEG	NEG
Tanner stadium pubis haar meisjes	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	NEG
TSH	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS
Vrij thyroxine (FT4)	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS*
Vrij tri-joodthyronine (FT3)	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS

NEG: daling in effectmerker bij stijging in bisfenol concentratie

POS: stijging in effectmerker bij stijging in bisfenol concentratie

*Blootstelling-effect associatie is significant

BIN: binaire variabele, eNO: uitgedemd stikstofdioxide, 8-oxodG: 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, Asbet: arsenobetaine; As: arseen, TRA: toxisch relevant arseen (molaire som), TSH: Schildklier stimulerend hormoon, toxisch relevant arseen, MMA: monomethylarseen, DMA: dimethylarseen, Cd: cadmium, Tl: thallium

Tabel 6. Overzicht van richting en significantie van blootstelling-effect associaties voor metalen in bloed in FLEHS IV

Metalen in bloed	Cd	Cu	Mn	Pb	Tl	Zn
8-oxodG	POS*	NEG	NEG	POS	POS*	POS
Komeettest	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG
Telomeerlengte	NEG	POS	POS	NEG	POS	NEG
eNO	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS
Leukocyten aantal	NEG	POS*	POS	POS	NEG	POS
Neutrofielen aantal	NEG	POS*	NEG	POS	NEG	POS
Lymfocyten aantal	NEG	POS*	POS	POS*	NEG	POS
Neutrofiel-lymfocyt ratio	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS
Eosinofielen aantal	NEG	POS	POS	POS*	NEG	POS
Monocyten aantal	NEG	POS*	POS*	POS	NEG	POS*
Basofielen aantal	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	POS
Allergie	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG
Allergie combinatie	POS	NEG	POS	NEG	POS	POS
Astma dokter	POS	POS	POS	POS	POS	POS*
Astma huidig	POS	POS*	POS	NEG	NEG	POS
Astma ooit	NEG	POS	POS	POS	NEG	POS*
Medicatie astma	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS*
Hooikoorts ooit	POS*	POS	NEG	NEG	POS	NEG
Medicatie hooikoorts	POS*	POS	NEG	NEG*	POS	NEG
Medicatie eczeem	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG*
BMI (z-score)	NEG	POS*	POS	NEG*	POS	NEG
Ratio Buikomtrek en lengte	NEG	POS*	POS	POS	POS	NEG

Metalen in bloed	Cd	Cu	Mn	Pb	Tl	Zn
Risico abdominale obesitas	NEG*	POS*	POS	NEG	POS	POS
Diastolische bloeddruk	NEG*	POS	NEG	POS	POS	POS
Systolische bloeddruk	NEG	POS	POS	POS	POS	POS
Hartritme	NEG	POS*	NEG	POS	NEG*	POS
Bloedvet	NEG	POS*	POS	POS	NEG*	POS
Cholesterol	NEG	POS*	POS	POS	POS	POS*
Triglyceriden	NEG	POS*	POS	POS	NEG*	POS
Cortisol	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG*
Leeftijd menarche	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Menarche laat	POS	NEG*	POS	POS	NEG	NEG*
Tanner stadium borstontwikkeling meisjes	POS	POS	NEG	POS	NEG	POS
Tanner stadium genitale ontwikkeling jongens	POS	NEG*	NEG	POS	POS	POS*
Tanner stadium pubis haar jongens	POS	NEG*	NEG	POS	POS	POS
Tanner stadium pubis haar meisjes	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
Schildklier stimulerend hormoon (TSH)	NEG	POS	NEG	POS	POS	NEG
Vrij thyroxine (FT4)	NEG	NEG	NEG	POS*	POS	NEG
Vrij tri-joodthyronine (FT3)	POS	POS	POS	POS	POS	NEG

NEG: daling in effectmerker bij stijging in bisfenol concentratie

POS: stijging in effectmerker bij stijging in bisfenol concentratie

*Blootstelling-effect associatie is significant

BIN: binaire variabele, eNO: uitgeademd stikstofdioxide, 8-oxodG: 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, Cd: cadmium, Cu: koper, Mn: mangaan, Pb: lood, Tl: thallium, Zn: zink

3.4.3.1 Oxidatieve stress and genotoxiciteit in relatie tot interne blootstelling aan zware metalen en spoorelementen

In bloed waren hogere Cd- en Tl-concentraties in deze studiepopulatie (n = 547) geassocieerd met hogere concentraties van de oxidatieve stress biomarker 8-oxodG. In urine waren Cd- en Tl-concentraties enkel bij meisjes positief geassocieerd met 8-oxodG in urine. De urinaire concentraties van 8-oxodG waren tevens significant hoger bij hogere gehalten van de arseen metaboliet MMA in urine (n = 219). Alle associaties werden gecorrigeerd voor leeftijd, geslacht, BMI, SES, seizoen en roken. Voor urinaire biomerkers werd bijkomend gecorrigeerd voor SG. Een review van de internationale literatuur rond toxiciteit van arseen rapporteerde eerder significante associaties tussen humane blootstelling aan lage gehalten thallium, biologische veranderingen en ongunstige gezondheidseffecten [130]. Ook bij Chinese jongeren werd een significante toename van oxidatieve stress vastgesteld bij hogere thallium gehalten in urine [134].

Significante verbanden tussen Cd en As blootstelling en oxidatieve stress werd eveneens eerder in verschillende leeftijdsgroepen gerapporteerd [118,135,136], waaronder ook epidemiologische studies bij Italiaanse jongeren [137] en Vlaamse jongeren in FLEHS-studies [16,50]. Er werden geen consistente associaties met de resultaten van de komeetttest vastgesteld in deze studiepopulatie.

Blootstelling aan zware metalen heeft een significante impact op cellulaire oxidatieve DNA-schade en -herstel bij Vlaamse jongeren. Verhoogde oxidatieve stress wordt in verband gebracht met celschade, celdood, een verstoorde immuunrespons, inflammatie en de ontwikkeling van chronische aandoeningen [138]. De resultaten van deze studie kunnen daarom relevant zijn voor de gezondheid van Vlaamse jongeren.

3.4.3.2 Immuun biomerkers en immuun effecten in relatie tot interne blootstelling aan zware metalen en spoorelementen

Alle associaties werden gecorrigeerd voor leeftijd, geslacht, BMI, SES, seizoen en roken. Voor urinaire biomerkers werd bijkomend gecorrigeerd voor SG. Het totaal aantal **leukocyten** en ook de aantallen neutrofielen, lymfocyten en monoccyten waren significant hoger in relatie tot hogere Cu gehalten in bloed (n = 559).

De neutrofielen aantallen waren eveneens significant hoger bij hogere urinaire concentraties van de As-metaboliet MMA (n = 217). De eosinofielen aantallen waren significant hoger bij hogere Pb gehalten in bloed bij alle jongeren, bij jongens waren ook de aantallen leukocyten, lymfocyten en monocytten significant hoger. Hogere Cd-gehalten in urine waren significant geassocieerd met lagere lymfocytenaantallen. Deze associaties zijn mogelijk indicatief voor immuunverstoring en een inflammatoire immuunrespons [102,139]. Urinair Cd was daarnaast ook positief geassocieerd met een hogere neutrofiel-lymfocyt ratio (NLR), net als de As-species AS III, AS V en MMA. De associatie van Cu in bloed met NLR was significant na correctie voor leeftijd en geslacht, de associatie was niet meer significant na bijkomende correctie voor BMI, seizoen, SES en roken. De NLR is een klinische biomarker voor inflammatie en een verhoogd risico op een ernstig verloop van infecties [19,140].

Cd, As, Pb worden in de literatuur als immunotoxisch beschouwd, significante associaties tussen deze zware metalen en aantallen leukocyten en subpopulatie werden eerder gerapporteerd [135,138,141,142]. Blootstelling aan zware metalen heeft een significante impact op de immuunrespons bij Vlaamse jongeren. Een verstoorde immuunrespons tijdens de puberteit kan een negatieve invloed hebben op de gezondheid van jongeren in het latere leven [41].

Er werden in de volledige FLEHS IV studiepopulatie significante associaties vastgesteld tussen zware metalen, zowel in urine als bloed, en **immuungerelateerde aandoeningen**. De verbanden werden gecorrigeerd voor leeftijd, geslacht, BMI (z-score), familiale allergie, blootstelling roken, vocht, schimmel, seizoen van staalname, SES en SG voor de urinaire merkers. In urine waren hogere gehalten aan MMA (n = 212) en TI (n = 551) significant geassocieerd met een lagere kans op het nemen van medicatie voor hooikoorts. Een hoger urinair gehalte aan TI was daarnaast ook nog significant geassocieerd met een lagere kans op het ooit hebben van hooikoorts (n = 552).

In bloed was een hoger gehalte aan Cd significant geassocieerd met een hogere kans op het ooit hebben van hooikoorts (n = 555) en hogere kans op het nemen van hooikoorts medicatie (n = 554). Een hoger Pb gehalte in bloed daarentegen was significant geassocieerd met een lagere kans op het nemen van hooikoorts medicatie (n = 554). In de literatuur worden er zowel associaties tussen hogere concentraties aan zware metalen en lager en hogere kans op hooikoorts geassocieerd. In de Korean National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES 2005-2016) werd bij volwassenen met een hoger bloedcadmium significant meer kans hadden op hooikoorts vastgesteld [143]. In de Taiwan Maternal and Infant Cohort Study was blootstelling aan arseen tijdens de kinderjaren (urinair (iAs + MMA + DMA) significant geassocieerd met een verhoogde kans op het ontwikkelen van hooikoorts op 14 jaar (n = 358) [144]. Een hoger bloedgehalte aan Cu was significant geassocieerd met een hogere kans op het huidig hebben van astma (n = 553). Een review over blootstelling aan metalen (e.g. Cu, Hg en Pb) en allergische ziekte bij kinderen beschrijft meerdere studies die een significante associatie tussen een hogere Cu concentratie en een hogere kans op he hebben van astma rapporteren [145]. Een hoger bloedgehalte aan Zn was significant geassocieerd met een hoger kans op een dokter diagnose van astma (n = 554), het ooit hebben van astma (n = 551) en het nemen van astmamedicatie (n = 555), maar een lagere kans op het nemen van eczeemmedicatie (n = 555). Het eerste bewijs voor een mogelijke rol van blootstelling aan zink bij astma kwam van meldingen van blootstelling aan zinkoxide als oorzaak van beroepsastma bij personen die met zink werken, dierstudies hebben daarnaast aangetoond dat zink in fijnstof de ernst van allergische aandoeningen van de luchtwegen bij knaagdieren vergroot [146]. Bij 3702 kinderen van de Nederlandse PIAMA geboortecohorte was incidentie van astma en de prevalentie van astmasymptomen hoger bij hogere jaargemiddelde zinkgehalten in fijnstof op het geboorteadres [147]. Enkel in de jongens is een hoger gehalte aan mangaan in het bloed significant geassocieerd met een hogere kans op allergie. Enkel in de meisjes is een hoger gehalte aan mangaan in het bloed significant geassocieerd met een hogere kans op het huidig hebben van astma en het nemen van astmamedicatie. In een studie bij 247 kleuters was een hogere Mn concentratie significant geassocieerd was met bronchiale astma [148].



3.4.3.3 Cardiometabole biomerkers en effecten in relatie tot interne blootstelling aan zware metalen en spoorelementen

Er werden verschillende significante associaties vastgesteld tussen het gehalte aan zware metalen en spoorelementen in zowel urine als bloed en **cardiometabole merkers**. De verbanden werden gecorrigeerd voor geslacht, leeftijd, seizoen van staalname, SES en SG voor de urinaire merkers. Weinig studies hebben al het verband tussen zware metalen en spoorelementen en cardiometabole merkers in adolescenten onderzocht. De bestaande literatuur is dus gelimiteerd en bovendien verdeeld.

Een hoger urinair cadmium en bloedlood gehalte was bij FLEHS IV jongeren significant geassocieerd met een lagere BMI (z-score). Bij kinderen en adolescenten (3-19 jaar) van de NHANES-studie (1999-2006) was een hogere concentratie aan bloedlood eveneens geassocieerd met een lagere BMI (z-score) [149]. In de literatuur worden zowel associaties gerapporteerd tussen Cd-concentraties in zowel urine en bloed en verlaagde en verhoogde merkers van obesitas [150]. Mogelijk spelen verschillen in associaties volgens leeftijd, dosis en duur van de blootstelling hierbij een rol.

Hogere MMA-, DMA-, TRA-waarden waren bij FLEHS IV jongeren significant geassocieerd met een lagere ratio tussen buikomtrek en lengte (n = 195), net als Cd-gehalten in urine (n = 526). Hierbij aansluitend waren hogere Cd-gehalten in zowel urine als bloed ook significant geassocieerd met een lager risico op abdominale obesitas (n = 526). In de Strong Heart Family Study, een studie waarin blootstelling aan arseen in relatie met kenmerken van het metabool syndroom werd onderzocht in 1047 volwassenen, waren een hogere concentratie aan MMA en lagere DMA-concentratie significant geassocieerd met kleinere buikomtrek [151].

Hogere urinaire TI-gehalten waren significant geassocieerd met een hogere ratio buikomtrek en lengte bij jongens. Ook in de NHANES-studie (1999-2002, 6-60 jaar) was hogere TI blootstelling geassocieerd met hogere buikomtrek en BMI [152].

Een hoger gehalte van het spoorelement koper in bloed was eveneens significant geassocieerd met een hogere BMI, en tevens een verhoogde kans op abdominale obesitas en hogere ratio buikomtrek en lengte (z-score) (n = 585). Hogere Cu-gehalte in bloed waren eveneens significant geassocieerd met hoger gehalte aan bloedvet, cholesterol en triglyceriden (n = 582) en een hoger hartritme (n = 585). Bij kinderen en adolescenten in NHANES (2011-2016) waren hogere bloedkoper gehalten significant geassocieerd met hogere BMI en buikomtrek, een hogere kans op overgewicht/totale obesitas en centrale obesitas bij kinderen en adolescenten [153]. Een studie bij 437 volwassenen in Qatar rapporteerde eveneens een significante associatie van een hogere concentratie bloedkoper met een hogere BMI, verhoogd hartritme en totaal cholesterol [154].

Een hoger urinair gehalte aan As III en bloedcadmium was significant geassocieerd met een lagere diastolische bloeddruk (n = 230). Ook hogere urinaire gehalten aan DMA, TRA (n = 230) en Cd (n = 585) in urine waren geassocieerd met een lagere diastolische en systolische bloeddruk. De associatie tussen urinair Cd en systolische bloeddruk werd gedreven door de jongens. Hoger urinair cadmium was bij jongeren in de NHANES-studie (2007-2016, 8-17-jarigen) geassocieerd met een lagere diastolische en systolische bloeddruk, de associatie werd eveneens gedreven door jongens. Voor bloed cadmium was dit verband in NHANES (2007-2016) enkel significant bij een subpopulatie van Hispanics [155]. Daarnaast was er bij mengsel-analyse in dezelfde studie ook een significante associatie tussen hogere concentraties van het mengsel van lood, kwik, arseen, cadmium met een lagere diastolische bloeddruk [156]. Een studie op de INMA-cohort bij 133 jongens (15-17 jaar) daarentegen, vond associaties tussen een hogere concentratie urinair Cd en As en een verhoogde systolische en diastolische bloeddruk [157]. Detectie van As, Cd en Pb in urine waren geassocieerd met een verhoogde systolische bloeddruk [157]. Deze verbanden zijn tegengesteld met de bevindingen in FLEHS IV.



Een hoger gehalte aan TI in bloed was significant geassocieerd met een lager hartritme (n = 585) en lagere gehalten aan bloedvet en triglyceriden (n = 582). Een hoger gehalte aan cholesterol was gerelateerd aan een hoger Zn-gehalte in bloed (n = 582). Een studie van 3544 Chinese volwassenen (>30 jaar) rapporteerde een significante associatie tussen een hoger gehalte aan Zn en dyslipidemie [158].

De analyse van effect modificatie door geslacht toont verschillen aan tussen jongens en meisjes

Volgende associaties zijn enkel bij jongens significant:

- Een hogere BMI (z-score) bij hogere gehalten aan TI in urine
- Een lagere kans op abdominale obesitas bij hogere urinaire gehalten MMA
- Een hogere gehalten aan bloedvet, cholesterol en triglyceriden bij hogere gehalten aan TRA in urine
- Hogere gehalten aan bloedvet en triglyceriden bij hogere gehalten aan DMA in urine
- Een grotere ratio tussen buikomtrek en lengte bij hogere gehalten aan Mn in bloed
- Een lager hartritme bij hogere gehalten aan Cd in bloed

Volgende associaties zijn enkel bij meisjes significant:

- Een daling in BMI (z-score) bij hogere gehalten aan TRA en Cd in urine
- Een stijging in BMI (z-score) bij hoger gehalte TI in bloed

De literatuur ondersteunt de verschillen in gezondheidsimpact van metalen volgens geslacht [159–161]. Er zijn aanwijzingen dat cadmiumgerelateerde gezondheidseffecten vaker voorkomen bij vrouwen dan bij mannen [160]. Ook voor Arseen toxiciteit werden verschillen volgens geslacht beschreven [159]. Mogelijk is dit te wijten aan verschillen in kinetiek, metabolisatie, interacties met geslachtshormonen.

3.4.3.4 Endocriene biomerkers in relatie tot interne blootstelling aan zware metalen en spoorelementen

Er zijn steeds meer aanwijzingen dat verschillende metalen hormoonverstorende stoffen (EDC's) zijn en dat de adolescentie een kritiek moment van gevoeligheid is voor blootstelling aan EDC's [162].

Uit de analyses bij FLEHS IV jongeren komen geen significante associaties tussen blootstelling aan zware metalen en **haar cortisol concentraties** (HCC) naar voor. Hogere concentraties van het spoorelement Zn zijn significant geassocieerd met lager HCC (n = 399). Alle verbanden werden gecorrigeerd voor leeftijd, geslacht, BMI, SES, seizoen en roken. Voor urinaire biomerkers werd bijkomend gecorrigeerd voor SG. Zn is een essentieel spoorelement dat in de literatuur in verband wordt gebracht met een goede immuun functie en verminderde chronische stress [163]. Bij Canadese kinderen (n = 339) was een hogere HCC significant eveneens geassocieerd met een lagere Zn concentratie in haar, een lange termijn biomarker voor de Zn-status [164], een studie bij jongeren in Laos vond geen significant verband tussen het dagelijks innemen van een Zn supplement en HCC [163]. Verder onderzoek is aangewezen.

Blootstelling aan zware metalen was bij FLEHS IV jongeren significant geassocieerd met merkers voor **puberteitsontwikkeling**. Modellen werden gecorrigeerd voor leeftijd, BMI, seizoen van staalname, SES, passief roken en SG voor de urinaire merkers. Hogere concentraties As III en MMA (n = 101) en detectie van As V (n = 105) in urine waren geassocieerd met een versnelde genitale ontwikkeling en pubisbehaving bij jongens. Een studie waarin prenatale en peripubertale blootstelling aan zware metalen in relatie tot puberteitsmerkers in 118 jongens (10-18 jaar) werd onderzocht, vond significante associaties tussen hogere prenatale As blootstelling en tragere genitale ontwikkeling. Ook werd er een borderline significant verband vastgesteld tussen hogere peripubertale blootstelling aan As en vertraagde ontwikkeling van pubisbehaving [162].



Dit is tegengesteld aan de FLEHS IV bevindingen. Een hogere concentratie aan zink in het bloed was bij FLEHS IV jongeren geassocieerd met een hoger stadium van genitale ontwikkeling (n = 263). Bij een hogere concentratie aan koper en zink (n = 298) was bij meisjes significant minder kans op late menarche. Hogere concentraties aan bloedkoper was daarentegen geassocieerd met een latere genitale ontwikkeling en pubisbehaaring (n = 263). In een studie naar het verband tussen zink status en puberteitsontwikkeling (108 jongens, 97 meisjes), werd er vastgesteld dat jongens in een hoger stadium van ontwikkeling, hogere zink concentratie hadden dan de jongens in een lager stadium van ontwikkeling en dat meisjes die reeds de menarche zijn begonnen, een hogere zink concentratie hebben dan de meisjes premenarche.[165].

Een studie waarin prenatale en peripubertale blootstelling metalen in relatie tot puberteitsmerkers in 132 meisjes (14-18 jaar) werd onderzocht, vond geen associaties tussen koper en zink concentratie en menarche merkers [162].

Studies die puberteitsontwikkeling in relatie tot blootstelling tijdens de puberteit onderzoeken zijn gelimiteerd. Bij de interpretatie van de resultaten dient opgemerkt te worden dat een cross-sectionele studie zoals FLEHS IV enkel verbanden tussen blootstelling en gezondheidseffecten onderzoekt op één tijdstip. Voorzichtigheid is bovendien geboden bij de interpretatie van de resultaten aangezien de tijdsvensters van blootstelling en puberteitsontwikkeling niet optimaal op elkaar zijn afgestemd: puberteitsontwikkeling is een proces dat over jaren loopt.

Van bepaalde metalen is aangetoond dat zij de **schildklierfunctie** bij beroepsmatig blootgestelde personen beïnvloeden, maar er zijn weinig studies uitgevoerd bij de algemene bevolking en bij adolescenten. Associaties van zware metalen met schildklierhormonen werden gecorrigeerd voor leeftijd, geslacht, BMI en SG voor de urinaire merkers. Hogere concentraties thallium in urine en lood in bloed waren geassocieerd met een hoger gehalte aan FT4 (n = 239). De associatie tussen bloedlood en FT4 werd gedreven door de jongens in de studiepopulatie. Bij jongens was een hogere bloedthallium concentratie bijkomend geassocieerd met een verhoogd gehalte aan FT3. Bij FLEHS III jongeren waren hogere concentraties bloedlood en thallium in bloed significant geassocieerd met hogere concentraties FT3, maar niet FT4. In FLEHS I en II werden eveneens positieve associaties tussen bloed thallium en bloed lood en FT3 gevonden. Blootstelling aan lood wordt in de literatuur in verband gebracht met verstoring van de endocriene hypofyse-schildklier-as, de studies geven echter geen éénduidig beeld [166]. In de NHANES studie (2007-2008), werden er zowel bij adolescenten als volwassenen geen significante associaties tussen bloedlood en schildklierhormonen vastgesteld, hogere urinaire TI concentraties waren geassocieerd met verlaagde T4 concentratie [167,168]. Bij adolescenten die in een werkplaats lange tijd blootgesteld werden aan lage concentraties lood, was bloedlood geassocieerd was met een verlaagd FT4-niveau, zonder significante veranderingen in TSH- en FT3-niveaus [169]. In de literatuur worden zowel niet-correlaties, significante stijgingen als dalingen van schildklierhormonen in relatie tot bloedlood gerapporteerd [170,171]. Meer onderzoek naar endocriene verstoring bij jongeren in relatie tot metalen en spoorelementen is aangewezen.

3.4.4 Besluit

Zware metalen en spoorelementen zijn alomtegenwoordig in het milieu, humane blootstelling is dus onvermijdelijk. Hoewel de emissies van zware metalen gestaag afnemen, worden er bij de huidige blootstellingsniveaus Vlaamse jongeren nog steeds significante associaties met vroege biologische veranderingen en gezondheidseffecten vastgesteld. Metalen en spoorelementen zijn zeer reactief, ze genereren oxidatieve stress, reageren met biologische systemen en vitale macromoleculen. Resultaten in deze studie sluiten aan bij deze reactieve eigenschappen van metalen en bevestigen ook de literatuur rond verschillen in blootstelling-effect associaties volgens geslacht. Analyses in deze studie wijzen op een toename in oxidatieve stress en verstoring van de immuunrespons bij jongeren in relatie tot blootstelling aan metalen (Cd, As, Pb, Tl, Cu).



De bevindingen in deze studie zijn in lijn met de internationale literatuur rond genotoxiciteit en immuunverstoring bij blootstelling aan zware metalen en bevestigen resultaten in eerdere FLEHS-studies.

Naast de hier beschreven associaties voor gereguleerde zware metalen stelde onderzoek in het subsidieproject Milieu en Gezondheid 2021 in een subpopulatie van FLEHS IV deelnemers (n = 84) eveneens significante verbanden vast tussen metalen en metalloïden die kunnen aanzien worden als opkomende polluenten en de hier beschreven effectmerkers. Gezien de kwetsbaarheid van het immuunsysteem tijdens deze adolescentie en de implicaties van immuunverstoring op de gezondheid in het latere leven, is een goed inzicht in de gezondheidsimpact van zowel historische als opkomende elementen van groot belang voor preventie en voor opvolging van beleid.

Blootstelling aan zware metalen is bij FLEHS IV adolescenten gerelateerd aan merkers van cardiometabole en endocriene verstoring. De associaties die vastgesteld worden in FLEHS IV worden niet altijd bevestigd door de andere studies, mogelijk spelen verschillen in leeftijd van de deelnemers, dosis en duur van de blootstelling hierbij een rol. Zowel de FLEHS bevindingen en de bestaande literatuur suggereren een verband tussen blootstelling aan zware metalen en sporelementen en cardiometabole en endocriene verstoring.



4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

De resultaten in deze studie geven aan dat blootstelling aan bisfenolen, pesticiden met huidig gebruik, PFAS en zware metalen geassocieerd is met significante biologische veranderingen en gezondheidseffecten bij jongeren. De waargenomen associaties voor gekende en gereguleerde polluenten liggen in lijn met wetenschappelijke inzichten over de biologische werkingsmechanismen van deze milieupolluenten en bevestigen vaak eerdere bevindingen in FLEHS-studies. De gevonden relaties gelden binnen de gemeten ranges van zowel de blootstellingsmerkers als de effectmerkers in de algemene bevolking en zijn dus relevant voor het Vlaamse beleid. Zelfs na regulering van polluenten worden blootstelling-effect relaties vastgesteld. Dit inzicht is belangrijk als onderbouwing voor verdere preventieve maatregelen en beleidsprioriteiten. Dit rapport bevestigt opnieuw dat HBM een beleidsrelevant instrument is in de beoordeling van gezondheidsrisico's van chemische stoffen.

De verschillende stofgroepen die in dit rapport bestudeerd worden zijn gekende of vermoedelijke verstoorders van het endocriene en immuunsysteem. Een goede werking van het endocriene systeem en het immuunsysteem is een belangrijke determinant van de gezondheid gedurende het hele leven, met de adolescentie daarbij als een kwetsbare ontwikkelingsperiode. Om vroege biologische veranderingen in deze leeftijdsgroep goed te kunnen evalueren, is de selectie van geschikte, gevalideerde effectmerkers van groot belang. Een goed inzicht in vroege biologische veranderingen in relatie tot chemische blootstelling bij jongeren maakt immers preventieve maatregelen mogelijk, voor het optreden van ziekte. Resultaten in deze studie en in eerder onderzoek bij jongeren tonen dat veranderingen in de populatie leukocyten gevoelige merkers zijn om vroege immuunverstoring bij jongeren in relatie tot chemische blootstelling te onderzoeken. Dit geldt eveneens voor schildklierhormonen en haarcortisol als biomerkers voor vroege endocriene verstoring bij jongeren. In deze studie worden ook verschillende biomerkers voor genotoxiciteit bij jongeren bestudeerd. Uit deze studie blijkt dat bij jongeren de oxidatieve stress biomarker 8-oxodG het meest gevoelige eindpunt voor onderzoek naar genotoxiciteit in relatie tot chemische stoffen is. Oxidatieve schade is vaak herstelbaar maar langdurige verhoogde oxidatieve schade is intermediair voor tal van aandoeningen zoals diabetes, luchtwegaandoeningen en kanker. Bij de jongeren waren merkers voor meer permanente DNA-schade zoals de komeetttest en micronucleustest echter niet verhoogd in relatie tot de gemeten polluenten.



Deze bevindingen sluiten aan bij een eerdere evaluatie van FLEHS-jongerenstudies die aangaf dat 8-oxodG als merker van oxidatieve DNA-schade en herstel bij jongeren geschikt is om vroege genotoxiciteit van milieupolluenten te onderzoeken [50]. De kommeettest en micronucleustest zijn zowel in deze studie als in de evaluatie minder gevoelig eindpunten voor genotoxiciteit bij jongeren. Deze bevindingen zullen meegenomen worden in de selectie van effect biomerkers in de komende FLEHS-studie.

Enkele aandachtspunten bij het studieopzet en de interpretatie van de resultaten:

- Een cross-sectioneel HBM-onderzoek bij adolescenten maakt het enkel mogelijk om de verbanden tussen blootstelling en gezondheidseffecten te onderzoeken op één tijdstip. Gezien ziekte zich vaak pas manifesteert na de blootstelling, is dit een beperkende factor die het ontbreken van éénduidige verbanden tussen chemische stoffen en ziekte mogelijk mee kan verklaren. Longitudinaal onderzoek kan in dit opzicht bijdragen aan een beter inzicht. Het verband bij FLEHS I jongeren tussen verhoogde intra-uteriene PFAS blootstelling en een hogere prevalentie van astma en rhinitis tijdens de adolescentie bevestigt het belang van longitudinaal onderzoek. Mogelijkheden naar verder longitudinaal onderzoek kunnen in het kader van het Europees Partnerschap voor de risicobeoordeling van chemische stoffen (PARC) mogelijk geëxploreerd worden. De inbedding van Vlaamse HBM-studies in PARC, biedt tevens mogelijkheden om de relatie tussen chemische blootstelling en ziekten te onderzoeken bij een groter aantal deelnemers, wat meer aangewezen is. In FLEHS-5 zal ernaar gestreefd worden om het onderzoek maximaal aan te laten sluiten bij het PARC-project en andere Europese onderzoeksinitiatieven.
- In deze studie worden associaties gerapporteerd tussen korte termijn blootstellingsmerkers en lange termijn (chronische) gezondheidseffecten, zoals allergie en astma. Voorzichtigheid is dus geboden bij de interpretatie van de blootstellings-effect associaties. Wanneer de blootstelling aan kortlevende stoffen echter alomtegenwoordig en dus continu is, zoals voor huidig gebruikte pesticiden en bisfenolen geldt, kan dit beschouwd als een continue en dus lange termijn blootstelling.
- De weergegeven resultaten zijn voornamelijk verbanden tussen één blootstellingsmerker en één gezondheidseffect. Mensen worden echter blootgesteld aan een mengsel van chemische stoffen, die elk gelijkaardig of verschillend kunnen inwerken op dezelfde eindpunten. Door de samenhang tussen de gehalten van 1 blootstellingsmerkers en een effectmerkers te bekijken, kan het resultaat een onder- of overschatting zijn van het werkelijke effect van een chemische stof vermits sommige stoffen een tegengestelde werking hebben. Het is dus aangewezen de individuele associaties tussen blootstelling en effect voorzichtig te interpreteren. Een verdere uitbreiding naar mengsel analyses en exposoom-gericht onderzoek is daarom in de toekomst aangewezen en zal binnen de volgende Vlaamse HBM (FLEHS-5) en PARC verder uitgewerkt worden.

Er worden in deze jongerenstudie associaties gerapporteerd bij concentraties onder de huidige toetsingswaarden of advieswaarden voor o.a. bisfenolen (BPA), huidig gebruikte pesticiden (TCPy, 2,4-D) en zware metalen (TI). Bovendien is de jongeren populatie een leeftijdsgroep die extra kwetsbaar is voor gezondheidseffecten. Hoewel de emissies van zware metalen gestaag afnemen, worden er bij de huidige blootstellingsniveaus Vlaamse jongeren nog steeds significante associaties met vroege biologische veranderingen en gezondheidseffecten vastgesteld. Dus zelfs al worden de toetsingswaarden gerespecteerd en neemt de blootstelling af, toch blijven preventieve maatregelen relevant. Ook voor stoffen waarvan een deel van de jongeren de toetsingswaarde overschreed, zijn er significante associaties vastgesteld (PFAS, pesticide 3-PBA, zware metalen As, Cd, Pb).



Ook voor de vervangstoffen van gereguleerde stoffen zoals de bisfenolen BPS en BPF en alternatieve PFAS worden significante associaties met biologische veranderingen en gezondheidseffecten bij jongeren gerapporteerd. De waargenomen associaties voor nieuwere polluenten, waarvoor epidemiologisch onderzoek vaak nog ontbreekt, dragen bij aan de wetenschappelijke inzichten in de humane gezondheidssimpact van deze nog niet-gereguleerde polluenten. De bevindingen in dit onderzoek bij een referentiepopulatie jongeren kunnen bijdragen aan de wetenschappelijke onderbouwing van milieupreventie en beleidsmaatregelen.

Concrete beleidsmatige aandachtspunten die uit deze studie volgen zijn o.a.

- de opvolging en relevantie van preventieve beleidsmaatregelen van gereguleerde polluenten zoals BPA en PFAS, waarbij blootstelling voor de meeste jongeren onder de huidige toetsingswaarden of advieswaarden ligt maar waarvan blootstelling gerelateerd is aan biologische veranderingen en gezondheidseffecten;
- verder onderzoek naar de gezondheidssimpact van de alternatieven voor gereguleerde polluenten aangezien epidemiologische onderzoek nog schaars is;
- de opvolging en remediëring in het milieu van historische polluenten, zoals de zware metalen cadmium, lood en arseen waarvoor een aanzienlijk deel van de jongeren nog steeds de gezondheidkundige toetsingswaarde overschrijdt en waarvoor blootstelling ook geassocieerd wordt met biologische veranderingen en gezondheidseffecten bij jongeren.
- Vertalen van de gezondheidseffecten naar DALY's en verwachte economische winst van reductie van blootstelling.



EXECUTIVE SUMMARY

This report describes the results of exposure-effect associations for bisphenols, currently used pesticides, perfluorinated compounds (PFAS), heavy metals and trace elements in adolescents (14-15 years old) in the 4th cycle of the Flemish human biomonitoring study (FLEHS IV, 2016-2020). Research results in the European Human Biomonitoring projects HBM4EU and GOLIATH, which included FLEHS IV data for these substance groups, are also briefly described. Adolescence is a vulnerable developmental period for the impact of chemicals on biological mechanisms and health. In this report, the biological mechanisms and health effects that are related to the aforementioned substance groups are 1) genotoxicity and oxidative stress, 2) disruption of the immune response and immune-related disorders, 3) cardiovascular and metabolic parameters, 4) endocrine disruption. To date, scientific literature on exposure-effect associations in general population of adolescents is limited. The observed associations that are described in this report are largely in line with scientific insights on the biological mechanisms of action of these environmental pollutants and previous findings in FLEHS studies.

Bisphenols: In Flemish adolescents, exposure to the regulated bisphenol A (BPA) and to alternative bisphenols (BPS, BPF, BPB, BPZ) is associated with oxidative stress and disruption of the immune response. Higher levels of BPA, BPF and BPS are also associated with unfavorable metabolic outcomes. Results were obtained despite not exceeding the current tdi's in this study population. Although bisphenols are short-lived pollutants, long-term, constant exposure to bisphenols may contribute to the development and severity of inflammatory diseases in adolescents, potentially through the aforementioned biological mechanisms. The findings in this study are in line with existing literature. However, epidemiological research on the health impact of BPA alternatives in adolescents is very limited. FLEHS IV results may contribute to the estimation of the health risk of emerging alternative bisphenols. Further monitoring of exposure to BPA and (mixtures of) alternative bisphenols and related early biological changes in adolescents is warranted.

Currently used pesticides: Flemish adolescents are simultaneously exposed to several pesticides (2,4-dichlorophenoxy-acetic acid, chlorpyrifos and pyrethroids). The analyses in adolescents indicate a pesticide-related increase in oxidative stress (2,4-D, 3-PBA, TCPy, AMPA) and disruption of immune and endocrine responses (2,4-D, 3-PBA, AMPA). These findings are in line with the existing literature; but also here, epidemiological studies in adolescents are still limited. AMPA in urine is also associated with a higher incidence of asthma. Results on pesticide exposure and cardiometabolic parameters are inconclusive. Although the considered pesticides are not persistent, constant, long-term, exposure to them during adolescence may have adverse health effects, also later in life. Further research on biological changes and health effects in relation to mixtures of regulated and non-regulated pesticides is thus appropriate.

PFAS: Flemish adolescents are exposed to multiple PFAS at the same time. Results of this study indicate PFAS-related (PFOS, PFOA, PFHxS, PFNA, PFDA) disruption of immune and endocrine responses. In line with literature, the associations differ by sex and by the individual component. The association between increased intrauterine PFAS exposure and more asthma and rhinitis during adolescence confirms the immune-disruptive long-term impact of PFAS exposure and demonstrates the added value of longitudinal studies. The FLEHS IV findings also suggest disruption of cardiometabolic response. In line with literature, in the FLEHS IV adolescents, higher PFAS concentrations (PFOS, PFNA, PFDA > LOQ) were associated with lower BMI (z-scores).



Many of the recently developed alternative PFAS were not measured in this study, they should be optimally included in future studies. Given the concurrent exposure to a large group of PFAS and the persistence of many PFAS, further investigation is warranted, both research-wise as policy-wise.

Heavy metals and trace elements: Although heavy metal emissions are steadily decreasing, significant associations of heavy metals and trace elements with early biological changes and health effects are still observed in Flemish adolescents. Analyses in this study indicate an increase in oxidative stress and immune disruption in adolescents in relation to exposure to Cd, As, Pb, Tl, Cu. Given the vulnerability of the immune system during this adolescence and the implications of immune disruption on health in later life, a good understanding of the health impact of both historical and emerging metals is needed. In line with other studies, the observed associations between heavy metal concentration and cardiometabolic and endocrine markers are not unequivocal.

Investigation of early biological changes in relation to chemical exposure in Flemish HBM studies, as described in this report, contributes to the scientific substantiation of links between chemical exposure and effect and also provides opportunities for preventive measures. Future HBM research should include mixture analyses and exposome-oriented research, this is an objective within both FLEHS-5 and the European Partnership on the Assessment of Risks from Chemicals PARC. Optimal alignment of FLEHS-5 with PARC will allow to investigate adverse outcome pathways from exposure to (mixtures of) chemicals via the internal exposome to the occurrence of diseases, which requires a large number of study participants.

The scientific findings of this study can contribute to a better understanding of the environmental pressure of chemicals and their impact on health in Flanders. Thus, the study contributes to a solid scientific basis for preventive policies and strategies to reduce the effects of chemicals on public health.



SAMENVATTING

Dit rapport beschrijft de resultaten van blootstelling-effect associaties voor bisfenolen, huidig gebruikte pesticiden, perfluorverbindingen (PFAS), zware metalen en spoorelementen bij jongeren (14-15 jarigen) in de 4^e cyclus van het Vlaamse humane-biomonitoringsprogramma (FLEHS IV, 2016-2020). Ook bevindingen in de Europese Humane-biomonitoringprojecten HBM4EU en GOLIATH, waarin FLEHS IV data voor deze stofgroepen opgenomen werd, worden kort beschreven. Jongeren zijn tijdens hun ontwikkeling extra kwetsbaar voor de impact van chemische stoffen op biologische mechanismen en gezondheid. De biologische mechanismen en gezondheidseffecten die in dit rapport gerelateerd worden aan de voorgenoemde stofgroepen zijn 1) genotoxiciteit en oxidatieve stress, 2) verstoring van de immuunrespons en immuungerelateerde aandoeningen, 3) cardiovasculaire en metabole parameters, 4) endocriene verstoring. Wetenschappelijke literatuur i.v.m. blootstelling-effect associaties bij jongeren is voor deze polluenten vooralsnog beperkt. De waargenomen associaties liggen grotendeels in lijn met wetenschappelijke inzichten over de biologische werkingsmechanismen van deze milieupolluenten en eerdere bevindingen in FLEHS-studies.

Bisfenolen: Blootstelling aan het gereguleerde bisfenol A (BPA) en aan alternatieve bisfenolen (BPS, BPF, BPB, BPZ) is bij Vlaamse jongeren geassocieerd met oxidatieve stress en verstoring van de immuunrespons. Hogere gehalten BPA, BPF en BPS zijn ook geassocieerd met een hogere BMI, een ongunstige cardiometabole parameter. Dit ondanks het niet overschrijden van de huidige tdi's in deze studiebevolking. Hoewel bisfenolen kortlevende polluenten zijn, kan een langdurige, constante blootstelling aan bisfenolen op deze biologische mechanismen bijdragen aan de ontwikkeling en ernst van inflammatoire aandoeningen bij jongeren. De bevindingen in deze studie zijn in lijn met de bestaande literatuur. Epidemiologisch onderzoek naar de gezondheidsimpact van BPA-alternatieven bij jongeren is tot nu toe echter zeer beperkt. FLEHS IV resultaten kunnen bijdragen aan de inschatting van het gezondheidsrisico van de opkomende alternatieve bisfenolen. Verdere opvolging van de blootstelling aan BPA en (mengsels van) alternatieve bisfenolen en daaraan gerelateerde vroege biologische veranderingen bij jongeren is aangewezen.

Pesticiden met huidig gebruik: Vlaamse jongeren worden gelijktijdig aan meerdere pesticiden (2,4-dichlorofenoxy-azijnzuur, chloorpyrifos en pyrethroïden) blootgesteld. De analyses bij jongeren wijzen op een toename in oxidatieve stress (2,4-D, 3-PBA, TCPy, AMPA) en verstoring van de immuun- en endocriene respons (2,4-D, 3-PBA, AMPA). Deze bevindingen zijn in lijn met de bestaande literatuur, epidemiologisch onderzoek bij jongeren is echter nog beperkt. Daarnaast is AMPA in urine ook geassocieerd met een hogere incidentie van astma. De resultaten rond blootstelling aan pesticiden en cardiometabole parameters zijn niet éénduidig. Hoewel de beschouwde pesticiden niet persistent zijn, kan de constante, langdurige, blootstelling aan deze pesticiden tijdens de adolescentie ongunstige gezondheidseffecten hebben, ook later in het leven. Verder onderzoek naar biologische veranderingen en gezondheidseffecten in relatie tot mengsels van pesticiden is dus aangewezen.

PFAS: De resultaten in deze studie bij jongeren rond PFAS (PFOS, PFOA, PFHxS, PFNA, PFDA) wijzen op een PFAS-gerelateerde verstoring van de immuun- en endocriene respons. De associaties verschillen volgens geslacht en volgens individuele component. De verscheidenheid in bevindingen rond de impact van PFAS op immuunrespons en schildklier werd eerder reeds aangetoond in experimentele en epidemiologische studies. Het verband tussen verhoogde intra-uteriene PFAS blootstelling en meer astma en rhinitis tijdens de adolescentie bevestigt de immuunverstorende lange termijn impact van PFAS blootstelling en toont de meerwaarde van longitudinaal onderzoek aan. De FLEHS IV bevindingen wijzen ook op een verstoring van de cardiometabole respons.



In lijn met de literatuur werd in de FLEHS IV adolescenten een hogere PFAS concentratie (PFOS, PFNA, PFDA > LOQ) gerelateerd aan een lagere BMI (z-score). Veel van de recent ontwikkelde alternatieve PFAS zijn in deze studie niet gemeten. Gezien de gelijktijdige blootstelling aan een grote groep PFAS en de persistentie van vele PFAS, is verder onderzoek zowel onderzoeksmatig als beleidsmatig aangewezen.

Zware metalen en spoorelementen: Hoewel de emissies van zware metalen gestaag afnemen, worden er bij Vlaamse jongeren nog steeds significante associaties van zware metalen met vroege biologische veranderingen en gezondheidseffecten vastgesteld. Analyses in deze studie wijzen op een toename in oxidatieve stress en immuunverstoring bij jongeren in relatie tot blootstelling aan Cd, As, Pb, Tl, Cu. Gezien de kwetsbaarheid van het immuunsysteem tijdens deze adolescentie en de implicaties van immuunverstoring op de gezondheid in het latere leven, is een goed inzicht in de gezondheidsimpact van zowel historische als opkomende metalen aangewezen. In lijn met de literatuur werden in deze studies tegengestelde associaties gevonden tussen concentraties van zware metalen en immuungerelateerde aandoeningen. Ondanks de literatuur niet eenduidig is over het verband tussen blootstelling aan zware metalen en immuungerelateerde aandoeningen, zijn er aanwijzingen om aan te nemen dat blootstelling aan zware metalen een mogelijke rol speelt. De geobserveerde associaties tussen concentratie aan zware metalen en cardiometabole en endocriene markers zijn, in lijn met andere studies, niet éénduidig.

Onderzoek naar vroege biologische veranderingen in relatie tot chemische blootstelling in een Vlaamse HBM campagne, zoals beschreven in dit rapport, draagt bij aan het wetenschappelijk onderbouwen van verbanden tussen blootstelling en effect en biedt tevens opportuniteiten voor preventieve maatregelen. Een verdere uitbreiding van HBM-onderzoek naar mengsel analyses en exposoom-gericht onderzoek is in de toekomst aangewezen, dit is een doelstelling binnen zowel FLEHS-5 als PARC. De inbedding van FLEHS-5 binnen het Europese HBM-project PARC, maakt het in de toekomst mogelijk om de relatie tussen (mengsels van) chemische stoffen, het intern exposoom en het optreden van ziekten te onderzoeken, waarvoor een groot aantal deelnemers nodig is. De wetenschappelijke bevindingen van deze studie kunnen bijdragen aan een beter inzicht in de milieudruk van chemische stoffen en de gezondheidsimpact in Vlaanderen en de onderbouwing van preventieve beleidsmaatregelen en strategieën om de effecten van chemische stoffen op de volksgezondheid te beperken.



REFERENTIES

1. Steunpunt Milieu en Gezondheid *Vlaamse Humane-Biomonitoringsprogramma 2016-2020, referentiewaarden bij jongeren*; 2020;
2. Schoeters, G.; Verheyen, V.J.; Colles, A.; Remy, S.; Martin, L.R.; Govarts, E.; Nelen, V.; Den Hond, E.; De Decker, A.; Franken, C.; et al. Internal exposure of Flemish teenagers to environmental pollutants: Results of the Flemish Environment and Health Study 2016–2020 (FLEHS IV). *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2022**, *242*, 113972, doi:10.1016/j.ijheh.2022.113972.
3. Steunpunt Milieu en gezondheid *Resultatenrapport jongerencampagne deel II*; 2020;
4. Verheyen, V.J.; Bijmens, E.M.; Vos, S.; Koppen, G.; Coertjens, D.; Morrens, B.; Colles, A.; Govarts, E.; Remy, S.; Ooms, D.; et al. *Onderzoek naar de relatie tussen ruimtegebruik en gezondheid met specifieke aandacht voor het gebruik van humane biomonitoring en ruimtelijke aspecten, uitgevoerd in opdracht van het Vlaams Planbureau voor Omgeving.*; Brussel, 2020;
5. Verheyen, V.; Govarts, E.; Loots, I.; Nelen, V.; Den Hond, E.; Bayens, W.; Belova, L.; Bijmens, E.; Braeken, R.; Bruckers, L.; et al. *Eindrappport Milieu en Gezondheid 2021 Subsidieproject, in opdracht van de Vlaamse overheid, Departement Omgeving, Vlaams Planbureau Omgeving*; Brussel, 2022;
6. Gilles, L.; Govarts, E.; Rodriguez Martin, L.; Andersson, A.-M.; Appenzeller, B.M.R.; Barbone, F.; Castaño, A.; Coertjens, D.; Den Hond, E.; Dzhdzheia, V.; et al. Harmonization of Human Biomonitoring Studies in Europe: Characteristics of the HBM4EU-Aligned Studies Participants. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 6787, doi:10.3390/ijerph19116787.
7. Legler, J.; Zalko, D.; Jourdan, F.; Jacobs, M.; Fromenty, B.; Balaguer, P.; Bourguet, W.; Munic Kos, V.; Nadal, A.; Beausoleil, C.; et al. The GOLIATH Project: Towards an Internationally Harmonised Approach for Testing Metabolism Disrupting Compounds. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3480, doi:10.3390/ijms21103480.
8. Gys, C.; Bastiaensen, M.; Bruckers, L.; Colles, A.; Govarts, E.; Martin, L.R.; Verheyen, V.; Koppen, G.; Morrens, B.; Den Hond, E.; et al. Determinants of exposure levels of bisphenols in Flemish adolescents. *Environ. Res.* **2021**, *193*, 110567, doi:10.1016/j.envres.2020.110567.
9. Bastiaensen, M.; Gys, C.; Colles, A.; Malarvannan, G.; Verheyen, V.; Koppen, G.; Govarts, E.; Bruckers, L.; Morrens, B.; Francken, C.; et al. Biomarkers of phthalates and alternative plasticizers in the Flemish Environment and Health Study (FLEHS IV): Time trends and exposure assessment. *Environ. Pollut.* **2021**, *276*, 116724, doi:10.1016/j.envpol.2021.116724.
10. De Troeyer, K.; Casas, L.; Bijmens, E.M.; Bruckers, L.; Covaci, A.; De Henauw, S.; Den Hond, E.; Loots, I.; Nelen, V.; Verheyen, V.J.; et al. Higher proportion of agricultural land use around the residence is associated with higher urinary concentrations of AMPA, a glyphosate metabolite. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2022**, *246*, 114039, doi:10.1016/j.ijheh.2022.114039.
11. Colles, A.; Bruckers, L.; Den Hond, E.; Govarts, E.; Morrens, B.; Schettgen, T.; Buekers, J.; Coertjens, D.; Nawrot, T.; Loots, I.; et al. Perfluorinated substances in the Flemish population (Belgium): Levels and determinants of variability in exposure. *Chemosphere* **2020**, *242*, 125250, doi:10.1016/j.chemosphere.2019.125250.
12. De Craemer, S.; Croes, K.; van Larebeke, N.; De Henauw, S.; Schoeters, G.; Govarts, E.; Loots, I.; Nawrot, T.; Nelen, V.; Den Hond, E.; et al. Metals, hormones and sexual maturation in Flemish adolescents in three cross-sectional studies (2002–2015). *Environ. Int.* **2017**, *102*, 190–199, doi:10.1016/j.envint.2017.02.014.
13. Bastiaensen, M.; Gys, C.; Colles, A.; Verheyen, V.; Koppen, G.; Govarts, E.; Bruckers, L.; Morrens, B.; Loots, I.; De Decker, A.; et al. Exposure levels, determinants and risk assessment of organophosphate flame retardants and plasticizers in adolescents (14–15 years) from the Flemish Environment and Health Study. *Environ. Int.* **2021**, *147*, doi:10.1016/j.envint.2020.106368.
14. Verheyen, V.J.; Remy, S.; Govarts, E.; Colles, A.; Rodriguez Martin, L.; Koppen, G.; Voorspoels, S.; Bruckers, L.; Bijmens, E.M.; Vos, S.; et al. Urinary Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolites Are Associated with Biomarkers of Chronic Endocrine Stress, Oxidative Stress, and Inflammation in Adolescents: FLEHS-4 (2016–2020). *Toxics* **2021**, *9*, 245, doi:10.3390/toxics9100245.
15. Croes, K.; Den Hond, E.; Bruckers, L.; Loots, I.; Morrens, B.; Nelen, V.; Colles, A.; Schoeters, G.; Sioen, I.; Covaci, A.; et al. Monitoring chlorinated persistent organic pollutants in adolescents in Flanders (Belgium): concentrations, trends and dose-effect relationships (FLEHS II). *Environ. Int.* **2014**, *71*, 20–28, doi:10.1016/J.ENVINT.2014.05.022.
16. Franken, C.; Koppen, G.; Lambrechts, N.; Govarts, E.; Bruckers, L.; Den Hond, E.; Loots, I.; Nelen, V.; Sioen, I.; Nawrot, T.S.; et al. Environmental exposure to human carcinogens in teenagers and the association with DNA damage. *Environ. Res.* **2017**, *152*, 165–174, doi:10.1016/j.envres.2016.10.012.

17. Cosemans, C.; Van Larebeke, N.; Janssen, B.G.; Martens, D.S.; Baeyens, W.; Bruckers, L.; Den Hond, E.; Coertjens, D.; Nelen, V.; Schoeters, G.; et al. Glyphosate and AMPA exposure in relation to markers of biological aging in an adult population-based study. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2022**, *240*, doi:10.1016/J.IJHEH.2021.113895.
18. Verheyen, V.J.; Remy, S.; Bijmens, E.M.; Colles, A.; Govarts, E.; Martin, L.R.; Koppen, G.; Bruckers, L.; Nielsen, F.; Vos, S.; et al. Long-term residential exposure to air pollution is associated with hair cortisol concentration and differential leucocyte count in Flemish adolescent boys. *Environ. Res.* **2021**, *201*, 111595, doi:10.1016/j.envres.2021.111595.
19. Bhat, T.; Teli, S.; Rijal, J.; Bhat, H.; Raza, M.; Khoueiry, G.; Meghani, M.; Akhtar, M.; Costantino, T. Neutrophil to lymphocyte ratio and cardiovascular diseases: A review. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **2013**, *11*, 55–59.
20. Brody, D.J.; Zhang, X.; Kit, B.K.; Dillon, C.F. Reference values and factors associated with exhaled nitric oxide: U.S. youth and adults. *Respir. Med.* **2013**, *107*, 1682–1691, doi:10.1016/j.rmed.2013.07.006.
21. Verheyen, V.J.; Remy, S.; Govarts, E.; Colles, A.; Koppen, G.; Martin, L.R.; Nielsen, F.; Bruckers, L.; Bijmens, E.M.; Vos, S.; et al. Determinants of Chronic Biological Stress, Measured as Hair Cortisol Concentration, in a General Population of Adolescents: From Individual and Household Characteristics to Neighborhood Urbanicity. *Front. Public Heal.* **2021**, *9*, 1726, doi:10.3389/FPUBH.2021.669022.
22. Asher, M.I.; Keil, U.; Anderson, H.R.; Beasley, R.; Crane, J.; Martinez, F.; Mitchell, E.A.; Pearce, N.; Sibbald, B.; Stewart, A.W.; et al. International study of asthma and allergies in childhood (ISAAC): rationale and methods. *Eur. Respir. J.* **1995**, *8*, 483–491, doi:10.1183/09031936.95.08030483.
23. Lubin, J.H.; Colt, J.S.; Camann, D.; Davis, S.; Cerhan, J.R.; Severson, R.K.; Bernstein, L.; Hartge, P. Epidemiologic Evaluation of Measurement Data in the Presence of Detection Limits. *Environ. Health Perspect.* **2004**, *112*, 1691, doi:10.1289/EHP.7199.
24. Pearson, M.A.; Lu, C.; Schmotzer, B.J.; Waller, L.A.; Riederer, A.M. Evaluation of physiological measures for correcting variation in urinary output: Implications for assessing environmental chemical exposure in children. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **2009**, *193* **2008**, *19*, 336–342, doi:10.1038/jes.2008.48.
25. O'Brien, K.M.; Upson, K.; Cook, N.R.; Weinberg, C.R. Environmental chemicals in urine and blood: Improving methods for creatinine and lipid adjustment. *Environ. Health Perspect.* **2016**, *124*, 220–227, doi:10.1289/ehp.1509693.
26. Palanza, P.; Paterlini, S.; Brambilla, M.M.; Ramundo, G.; Caviola, G.; Gioiosa, L.; Parmigiani, S.; vom Saal, F.S.; Ponzi, D. Sex-biased impact of endocrine disrupting chemicals on behavioral development and vulnerability to disease: Of mice and children. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2021**, *121*, 29–46, doi:10.1016/j.neubiorev.2020.11.015.
27. Frederiksen, H.; Ljubicic, M.L.; Upners, E.N.; Fischer, M.B.; Busch, A.S.; Hagen, C.P.; Juul, A.; Andersson, A.-M. Benzophenones, bisphenols and other polychlorinated/phenolic substances in Danish infants and their parents – including longitudinal assessments before and after introduction to mixed diet. *Environ. Int.* **2022**, *169*, 107532, doi:10.1016/j.envint.2022.107532.
28. HBM4EU Dashboard HBM4EU_Dashboard, 2022. Dashboard European Human Biomonitoring (HBM4EU) Data for visualisation of aggregated data.
29. Koch, H.M.; Calafat, A.M. Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2009**, *364*, 2063–2078.
30. ECHA MSC unanimously agrees that Bisphenol A is an endocrine disruptor Available online: <https://echa.europa.eu/-/msc-unanimously-agrees-that-bisphenol-a-is-an-endocrine-disruptor> (accessed on Nov 4, 2022).
31. HBM4EU Infographics – HBM4EU – science and policy for a healthy future Available online: <https://www.hbm4eu.eu/citizens-corner/infographics/> (accessed on Dec 2, 2022).
32. Mustieles, V.; D'Cruz, S.C.; Couderq, S.; Rodríguez-Carrillo, A.; Fini, J.B.; Hofer, T.; Steffensen, I.L.; Dirven, H.; Barouki, R.; Olea, N.; et al. Bisphenol A and its analogues: A comprehensive review to identify and prioritize effect biomarkers for human biomonitoring. *Environ. Int.* **2020**, *144*, doi:10.1016/J.ENVINT.2020.105811.
33. Heindel, J.J.; Blumberg, B. Environmental Obesogens: Mechanisms and Controversies. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2019**, *59*, 89–106, doi:10.1146/annurev-pharmtox-010818-021304.
34. Oliviero, F.; Marmugi, A.; Vigié, C.; Gayard, V.; Picard-Hagen, N.; Mselli-Lakhal, L. Are BPA Substitutes as Obesogenic as BPA? *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 4238, doi:10.3390/ijms23084238.
35. Gassman, N.R. Induction of oxidative stress by bisphenol A and its pleiotropic effects. *Environ. Mol. Mutagen.* **2017**, *58*, 60–71.
36. ECHA Bisphenols - ECHA Available online: <https://echa.europa.eu/hot-topics/bisphenols> (accessed on
////////////////////////////////////

Nov 4, 2022).

37. Mesnage, R.; Phedonos, A.; Arno, M.; Balu, S.; Corton, J.C.; Antoniou, M.N. Editor's Highlight: Transcriptome Profiling Reveals Bisphenol A Alternatives Activate Estrogen Receptor Alpha in Human Breast Cancer Cells. *Toxicol. Sci.* **2017**, *158*, 431–443, doi:10.1093/toxsci/kfx101.
38. Liu, B.; Lehmler, H.-J.; Sun, Y.; Xu, G.; Sun, Q.; Snetselaar, L.G.; Wallace, R.B.; Bao, W. Association of Bisphenol A and Its Substitutes, Bisphenol F and Bisphenol S, with Obesity in United States Children and Adolescents. *Diabetes Metab. J.* **2019**, *43*, 59, doi:10.4093/dmj.2018.0045.
39. Caballero-Casero, N.; Castro, G.; Bastiaensen, M.; Gys, C.; van Larebeke, N.; Schoeters, G.; Covaci, A. Identification of chemicals of emerging concern in urine of Flemish adolescents using a new suspect screening workflow for LC-QTOF-MS. *Chemosphere* **2021**, *280*, 130683, doi:10.1016/j.chemosphere.2021.130683.
40. Usman, A.; Ikhlas, S.; Ahmad, M. Occurrence, toxicity and endocrine disrupting potential of Bisphenol-B and Bisphenol-F: A mini-review. *Toxicol. Lett.* **2019**, *312*, 222–227, doi:10.1016/j.toxlet.2019.05.018.
41. Golub, M.S. Adolescent health and the environment. *Environ. Health Perspect.* **2000**, *108*, 355–362, doi:10.1289/ehp.00108355.
42. Steunpunt Milieu en Gezondheid *Vlaamse Humane-Biomonitoringprogramma 2016-2020: Referentiewaarden Bij Jongeren.*; 2020;
43. Steffensen, I.-L.; Dirven, H.; Couderq, S.; David, A.; D'Cruz, S.; Fernández, M.; Mustieles, V.; Rodríguez-Carrillo, A.; Hofer, T. Bisphenols and Oxidative Stress Biomarkers—Associations Found in Human Studies, Evaluation of Methods Used, and Strengths and Weaknesses of the Biomarkers. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 3609, doi:10.3390/ijerph17103609.
44. Bono, R.; Bellisario, V.; Tassinari, R.; Squillacioti, G.; Manetta, T.; Bugiani, M.; Migliore, E.; Piccioni, P. Bisphenol A, Tobacco Smoke, and Age as Predictors of Oxidative Stress in Children and Adolescents. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, 2025, doi:10.3390/ijerph16112025.
45. Rocha, B.A.; Asimakopoulos, A.G.; Honda, M.; da Costa, N.L.; Barbosa, R.M.; Barbosa, F.; Kannan, K. Advanced data mining approaches in the assessment of urinary concentrations of bisphenols, chlorophenols, parabens and benzophenones in Brazilian children and their association to DNA damage. *Environ. Int.* **2018**, *116*, 269–277, doi:10.1016/j.envint.2018.04.023.
46. Colles, A.; Kops, J.; Coertjens, D.; Morrens, B. *Overzichtsdocument hormoonverstorende stoffen in het Vlaamse Humane Biomonitoringprogramma*; 2021;
47. Serra, H.; Beausoleil, C.; Habert, R.; Minier, C.; Picard-Hagen, N.; Michel, C. Evidence for Bisphenol B Endocrine Properties: Scientific and Regulatory Perspectives. *Environ. Health Perspect.* **2019**, *127*, 106001, doi:10.1289/EHP5200.
48. Lucarini, F.; Krasniqi, T.; Bailat Rosset, G.; Roth, N.; Hopf, N.B.; Broillet, M.-C.; Staedler, D. Exposure to New Emerging Bisphenols Among Young Children in Switzerland. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 4793, doi:10.3390/ijerph17134793.
49. Münzel, T.; Sørensen, M.; Gori, T.; Schmidt, F.P.; Rao, X.; Brook, F.R.; Chen, L.C.; Brook, R.D.; Rajagopalan, S. Environmental stressors and cardio-metabolic disease: Part II-mechanistic insights. *Eur. Heart J.* 2017.
50. Koppen, G.; Franken, C.; Den Hond, E.; Plusquin, M.; Reimann, B.; Leermakers, M.; Covaci, A.; Nawrot, T.; Van Larebeke, N.; Schoeters, G.; et al. Pooled analysis of genotoxicity markers in relation to exposure in the Flemish Environment and Health Studies (FLEHS) between 1999 and 2018. *Environ. Res.* **2020**, doi:10.1016/j.envres.2020.110002.
51. Steenhof, M.; Janssen, N.A.H.; Strak, M.; Hoek, G.; Gosens, I.; Mudway, I.S.; Kelly, F.J.; Harrison, R.M.; Pieters, R.H.H.; Cassee, F.R.; et al. Air pollution exposure affects circulating white blood cell counts in healthy subjects: The role of particle composition, oxidative potential and gaseous pollutants-the RAPTES project. *Inhal. Toxicol.* **2014**, *26*, 141–165, doi:10.3109/08958378.2013.861884.
52. Rogers, J.A.; Metz, L.; Yong, V.W. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol. Immunol.* **2013**, *53*, 421–430, doi:10.1016/j.molimm.2012.09.013.
53. He, M.; Ichinose, T.; Yoshida, S.; Takano, H.; Nishikawa, M.; Shibamoto, T.; Sun, G. Exposure to bisphenol A enhanced lung eosinophilia in adult male mice. *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* **2016**, *12*, 1–9, doi:10.1186/s13223-016-0122-4.
54. Nygaard, U.C.; Vinje, N.E.; Samuelson, M.; Andreassen, M.; Groeng, E.-C.; Bølling, A.K.; Becher, R.; Lovik, M.; Bodin, J. Early life exposure to bisphenol A investigated in mouse models of airway allergy, food allergy and oral tolerance. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *83*, 17–25, doi:10.1016/j.fct.2015.05.009.
55. Vaidya, S. V.; Kulkarni, H. Association of Urinary Bisphenol A Concentration with Allergic Asthma: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005–2006. *J. Asthma* **2012**, *49*, 800–806,

doi:10.3109/02770903.2012.721041.

56. Corsini, E.; Avogadro, A.; Galbiati, V.; dell'Agli, M.; Marinovich, M.; Galli, C.L.; Germolec, D.R. In vitro evaluation of the immunotoxic potential of perfluorinated compounds (PFCs). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2011**, *250*, 108–116, doi:10.1016/J.TAAP.2010.11.004.
57. Qiu, W.; Zhan, H.; Hu, J.; Zhang, T.; Xu, H.; Wong, M.; Xu, B.; Zheng, C. The occurrence, potential toxicity, and toxicity mechanism of bisphenol S, a substitute of bisphenol A: A critical review of recent progress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *173*, 192–202, doi:10.1016/j.ecoenv.2019.01.114.
58. Burgos-Aceves, M.A.; Abo-Al-Ela, H.G.; Faggio, C. Physiological and metabolic approach of plastic additive effects: Immune cells responses. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *404*, 124114, doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124114.
59. Jacobson, M.H.; Woodward, M.; Bao, W.; Liu, B.; Trasande, L. Urinary Bisphenols and Obesity Prevalence Among U.S. Children and Adolescents. *J. Endocr. Soc.* **2019**, *3*, 1715–1726, doi:10.1210/je.2019-00201.
60. Mustieles, V.; Ocón-Hernandez, O.; Mínguez-Alarcón, L.; Dávila-Arias, C.; Pérez-Lobato, R.; Calvente, I.; Arrebola, J.P.; Vela-Soria, F.; Rubio, S.; Hauser, R.; et al. Bisphenol A and reproductive hormones and cortisol in peripubertal boys: The INMA-Granada cohort. *Sci. Total Environ.* **2018**, *618*, 1046–1053, doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.093.
61. Giesbrecht, G.F.; Ejaredar, M.; Liu, J.; Thomas, J.; Letourneau, N.; Campbell, T.; Martin, J.W.; Dewey, D. Prenatal bisphenol a exposure and dysregulation of infant hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: findings from the APRON cohort study. *Environ. Heal.* **2017**, *16*, 47, doi:10.1186/s12940-017-0259-8.
62. Kim, M.J.; Park, Y.J. Bisphenols and Thyroid Hormone. *Endocrinol. Metab.* **2019**, *34*, 340, doi:10.3803/EnM.2019.34.4.340.
63. Koutaki, D.; Paltoglou, G.; Vourdoumpa, A.; Charmandari, E. The impact of bisphenol a on thyroid function in neonates and children: A systematic review of the literature. *Nutrients* **2022**, *14*, 168, doi:10.3390/NU14010168/S1.
64. Richardson, J.R.; Fitsanakis, V.; Westerink, R.H.S.; Kanthasamy, A.G. Neurotoxicity of pesticides. *Acta Neuropathol.* **2019**, *138*, 343–362, doi:10.1007/s00401-019-02033-9.
65. CDC Biomonitoring Summary | CDC Available online: https://www.cdc.gov/biomonitoring/Cyhalothrin_Cypermethrin_Deltamethrin_Fenpropathrin_Permethrin_Tralomethrin_BiomonitoringSummary.html (accessed on Nov 21, 2022).
66. Kim, J.H.; Lee, S.; Kim, K.-N.; Hong, Y.-C. Association of urinary 3-phenoxybenzoic acid level with pulmonary function reduction in an urban elderly population with repeated measures data. *Environ. Pollut.* **2019**, *246*, 811–818, doi:10.1016/j.envpol.2018.12.078.
67. Saillenfait, A.-M.; Ndiaye, D.; Sabaté, J.-P. Pyrethroids: Exposure and health effects – An update. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2015**, *218*, 281–292, doi:10.1016/j.ijheh.2015.01.002.
68. HBM4EU Pesticides – HBM4EU – science and policy for a healthy future Available online: <https://www.hbm4eu.eu/hbm4eu-substances/pesticides/> (accessed on Nov 21, 2022).
69. Lee, G.-H.; Choi, K.-C. Adverse effects of pesticides on the functions of immune system. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2020**, *235*, 108789, doi:10.1016/j.cbpc.2020.108789.
70. Ding, G.; Shi, R.; Gao, Y.; Zhang, Y.; Kamijima, M.; Sakai, K.; Wang, G.; Feng, C.; Tian, Y. Pyrethroid Pesticide Exposure and Risk of Childhood Acute Lymphocytic Leukemia in Shanghai. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 13480–13487, doi:10.1021/es303362a.
71. Ubaid ur Rahman, H.; Asghar, W.; Nazir, W.; Sandhu, M.A.; Ahmed, A.; Khalid, N. A comprehensive review on chlorpyrifos toxicity with special reference to endocrine disruption: Evidence of mechanisms, exposures and mitigation strategies. *Sci. Total Environ.* **2021**, *755*, 142649, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142649.
72. Connolly, A.; Coggins, M.A.; Koch, H.M. Human Biomonitoring of Glyphosate Exposures: State-of-the-Art and Future Research Challenges. *Toxics* **2020**, *8*, 60, doi:10.3390/toxics8030060.
73. Peillex, C.; Pelletier, M. The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. *J. Immunotoxicol.* **2020**, *17*, 163–174, doi:10.1080/1547691X.2020.1804492.
74. Steunpunt milieu en gezondheid Wat meten we? (factsheets) - milieu-en-gezondheid.be Available online: <https://www.milieu-en-gezondheid.be/nl/onderzoek/wat-meten-we> (accessed on Dec 15, 2021).
75. Lerro, C.C.; Beane Freeman, L.E.; Portengen, L.; Kang, D.; Lee, K.; Blair, A.; Lynch, C.F.; Bakke, B.; De Roos, A.J.; Vermeulen, R.C.H. A longitudinal study of atrazine and 2,4-D exposure and oxidative stress markers among iowa corn farmers. *Environ. Mol. Mutagen.* **2017**, *58*, 30–38, doi:10.1002/em.22069.
76. Abate Jote, C. A Review of 2,4-D Environmental Fate, Persistence and Toxicity Effects on Living Organisms. *Org. Med. Chem. Int. J.* **2019**, *9*, doi:10.19080/OMCIJ.2019.09.555755.
77. Aylward, L.L.; Irwin, K.; St-Amand, A.; Nong, A.; Hays, S.M. Screening-level Biomonitoring Equivalents for
////////////////////////////////////

- tiered interpretation of urinary 3-phenoxybenzoic acid (3-PBA) in a risk assessment context. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2018**, *92*, 29–38, doi:10.1016/j.yrtph.2017.11.002.
78. Makris, K.C.; Efthymiou, N.; Konstantinou, C.; Anastasi, E.; Schoeters, G.; Kolossa-Gehring, M.; Katsonouri, A. Oxidative stress of glyphosate, AMPA and metabolites of pyrethroids and chlorpyrifos pesticides among primary school children in Cyprus. *Environ. Res.* **2022**, *212*, 113316, doi:10.1016/j.envres.2022.113316.
 79. Kantari, C.; Pederzoli-Ribeil, M.; Witko-Sarsat, V. The Role of Neutrophils and Monocytes in Innate Immunity. In *Trends in Innate Immunity*; KARGER: Basel, 2008; Vol. 15, pp. 118–146 ISBN 9783805585484.
 80. Miyake, K.; Karasuyama, H. Emerging roles of basophils in allergic inflammation. *Allergol. Int.* **2017**, *66*, 382–391, doi:10.1016/j.alit.2017.04.007.
 81. Mokarizadeh, A.; Faryabi, M.R.; Rezvanfar, M.A.; Abdollahi, M. A comprehensive review of pesticides and the immune dysregulation: mechanisms, evidence and consequences. *Toxicol. Mech. Methods* **2015**, *25*, 258–278, doi:10.3109/15376516.2015.1020182.
 82. Jacobsen-Pereira, C.H.; Cardoso, C.C.; Gehlen, T.C.; Regina dos Santos, C.; Santos-Silva, M.C. Immune response of Brazilian farmers exposed to multiple pesticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2020**, *202*, 110912, doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110912.
 83. Gangemi, S.; Gofita, E.; Costa, C.; Teodoro, M.; Briguglio, G.; Nikitovic, D.; Tzanakakis, G.; Tsatsakis, A.M.; Wilks, M.F.; Spandidos, D.A.; et al. Occupational and environmental exposure to pesticides and cytokine pathways in chronic diseases (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2016**, *38*, 1012–1020.
 84. Kaur, N.; Starling, A.P.; Calafat, A.M.; Sjodin, A.; Clouet-Foraison, N.; Dolan, L.M.; Imperatore, G.; Jensen, E.T.; Lawrence, J.M.; Ospina, M.; et al. Longitudinal association of biomarkers of pesticide exposure with cardiovascular disease risk factors in youth with diabetes. *Environ. Res.* **2020**, *181*, 108916, doi:10.1016/j.envres.2019.108916.
 85. Yoo, M.; Lim, Y.-H.; Kim, T.; Lee, D.; Hong, Y.-C. Association between urinary 3-phenoxybenzoic acid and body mass index in Korean adults: 1st Korean National Environmental Health Survey. *Ann. Occup. Environ. Med.* **2016**, *28*, 2, doi:10.1186/s40557-015-0079-7.
 86. Chrustek, A.; Holyńska-Iwan, I.; Dziembowska, I.; Bogusiewicz, J.; Wróblewski, M.; Cwynar, A.; Olszewska-Słonina, D. Current Research on the Safety of Pyrethroids Used as Insecticides. *Medicina (B. Aires)*. **2018**, *54*, 61, doi:10.3390/medicina54040061.
 87. Pinos, H.; Carrillo, B.; Merchán, A.; Biosca-Brull, J.; Pérez-Fernández, C.; Colomina, M.T.; Sánchez-Santed, F.; Martín-Sánchez, F.; Collado, P.; Arias, J.L.; et al. Relationship between Prenatal or Postnatal Exposure to Pesticides and Obesity: A Systematic Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 7170, doi:10.3390/ijerph18137170.
 88. Castiello, F.; Freire, C. Exposure to non-persistent pesticides and puberty timing: a systematic review of the epidemiological evidence. *Eur. J. Endocrinol.* **2021**, *184*, 733–749, doi:10.1530/EJE-20-1038.
 89. Boxall, A.B.A.; Hardy, A.; Beulke, S.; Boucard, T.; Burgin, L.; Falloon, P.D.; Haygarth, P.M.; Hutchinson, T.; Kovats, R.S.; Leonardi, G.; et al. Impacts of Climate Change on Indirect Human Exposure to Pathogens and Chemicals from Agriculture. *Environ. Health Perspect.* **2009**, *117*, 508–514, doi:10.1289/EHP.0800084.
 90. Fenton, S.E.; Ducatman, A.; Boobis, A.; DeWitt, J.C.; Lau, C.; Ng, C.; Smith, J.S.; Roberts, S.M. Per- and Polyfluoroalkyl Substance Toxicity and Human Health Review: Current State of Knowledge and Strategies for Informing Future Research. *Environ. Toxicol. Chem.* **2021**, *40*, 606–630, doi:10.1002/etc.4890.
 91. Pérez, F.; Nadal, M.; Navarro-Ortega, A.; Fàbrega, F.; Domingo, J.L.; Barceló, D.; Farré, M. Accumulation of perfluoroalkyl substances in human tissues. *Environ. Int.* **2013**, *59*, 354–362, doi:10.1016/j.envint.2013.06.004.
 92. Sunderland, E.M.; Hu, X.C.; Dassuncao, C.; Tokranov, A.K.; Wagner, C.C.; Allen, J.G. A review of the pathways of human exposure to poly- and perfluoroalkyl substances (PFASs) and present understanding of health effects. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **2019**, *29*, 131–147, doi:10.1038/s41370-018-0094-1.
 93. Stein, C.R.; McGovern, K.J.; Pajak, A.M.; Maglione, P.J.; Wolff, M.S. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances and indicators of immune function in children aged 12–19 y: National Health and Nutrition Examination Survey. *Pediatr. Res.* **2016**, *79*, 348–357, doi:10.1038/pr.2015.213.
 94. Dalsager, L.; Christensen, N.; Husby, S.; Kyhl, H.; Nielsen, F.; Høst, A.; Grandjean, P.; Jensen, T.K. Association between prenatal exposure to perfluorinated compounds and symptoms of infections at age 1–4 years among 359 children in the Odense Child Cohort. *Environ. Int.* **2016**, *96*, 58–64, doi:10.1016/j.envint.2016.08.026.
 95. Kvalem, H.E.; Nygaard, U.C.; Lødrup Carlsen, K.C.; Carlsen, K.H.; Haug, L.S.; Granum, B. Perfluoroalkyl substances, airways infections, allergy and asthma related health outcomes – implications of gender,

- exposure period and study design. *Environ. Int.* **2020**, *134*, 105259, doi:10.1016/j.envint.2019.105259.
96. Wang, L.Q.; Liu, T.; Yang, S.; Sun, L.; Zhao, Z.Y.; Li, L.Y.; She, Y.C.; Zheng, Y.Y.; Ye, X.Y.; Bao, Q.; et al. Perfluoroalkyl substance pollutants activate the innate immune system through the AIM2 inflammasome. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1–17, doi:10.1038/s41467-021-23201-0.
 97. HBM4EU PFAS - HBM4EU - science and policy for a healthy future Available online: https://www.hbm4eu.eu/wp-content/uploads/2021/11/21041_LOT2_INFOGRAPHIC_PFAS_v05_DL_001.pdf (accessed on Nov 22, 2022).
 98. Pilkerton, C.S.; Hobbs, G.R.; Lilly, C.; Knox, S.S. Rubella immunity and serum perfluoroalkyl substances: Sex and analytic strategy. *PLoS One* **2018**, *13*, e0203330, doi:10.1371/journal.pone.0203330.
 99. Kulaksizoglu, B.; Kulaksizoglu, S. Relationship between neutrophil/lymphocyte ratio with oxidative stress and psychopathology in patients with schizophrenia. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2016**, *12*, 1999–2005, doi:10.2147/NDT.S110484.
 100. Selders, G.S.; Fetz, A.E.; Radic, M.Z.; Bowlin, G.L. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regen. Biomater.* **2017**, *4*, 55–68, doi:10.1093/rb/rbw041.
 101. Corsini, E.; Luebke, R.W.; Germolec, D.R.; DeWitt, J.C. Perfluorinated compounds: Emerging POPs with potential immunotoxicity. *Toxicol. Lett.* **2014**, *230*, 263–270, doi:10.1016/j.toxlet.2014.01.038.
 102. Oulhote, Y.; Shamim, Z.; Kielsen, K.; Weihe, P.; Grandjean, P.; Ryder, L.P.; Heilmann, C. Children’s white blood cell counts in relation to developmental exposures to methylmercury and persistent organic pollutants. *Reprod. Toxicol.* **2017**, doi:10.1016/j.reprotox.2016.08.001.
 103. Kuruvilla, M.E.; Lee, F.E.-H.; Lee, G.B. Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2019**, *56*, 219–233, doi:10.1007/s12016-018-8712-1.
 104. Canova, C.; Di Nisio, A.; Barbieri, G.; Russo, F.; Fletcher, T.; Batzella, E.; Dalla Zuanna, T.; Pitter, G. PFAS Concentrations and Cardiometabolic Traits in Highly Exposed Children and Adolescents. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 12881, doi:10.3390/ijerph182412881.
 105. Schillemans, T.; Iszatt, N.; Remy, S.; Schoeters, G.; Fernández, M.F.; D’Cruz, S.C.; Desalegn, A.; Haug, L.S.; Lignell, S.; Lindroos, A.K.; et al. Cross-sectional associations between exposure to per- and polyfluoroalkyl substances and body mass index among European teenagers in the HBM4EU aligned studies. *Environ. Pollut.* **2023**, *316*, 120566, doi:10.1016/j.envpol.2022.120566.
 106. Frisbee, S.J.; Shankar, A.; Knox, S.S.; Steenland, K.; Savitz, D.A.; Fletcher, T.; Ducatman, A.M. Perfluorooctanoic Acid, Perfluorooctanesulfonate, and Serum Lipids in Children and Adolescents. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **2010**, *164*, 860–869, doi:10.1001/archpediatrics.2010.163.
 107. Zeng, X.-W.; Qian, Z.; Emo, B.; Vaughn, M.; Bao, J.; Qin, X.-D.; Zhu, Y.; Li, J.; Lee, Y.L.; Dong, G.-H. Association of polyfluoroalkyl chemical exposure with serum lipids in children. *Sci. Total Environ.* **2015**, *512–513*, 364–370, doi:10.1016/j.scitotenv.2015.01.042.
 108. Ernst, A.; Brix, N.; Lauridsen, L.L.B.; Olsen, J.; Parner, E.T.; Liew, Z.; Olsen, L.H.; Ramlau-Hansen, C.H. Exposure to Perfluoroalkyl Substances during Fetal Life and Pubertal Development in Boys and Girls from the Danish National Birth Cohort. *Environ. Health Perspect.* **2019**, *127*, 017004, doi:10.1289/EHP3567.
 109. Lopez-Espinosa, M.-J.; Fletcher, T.; Armstrong, B.; Genser, B.; Dhataria, K.; Mondal, D.; Ducatman, A.; Leonardi, G. Association of Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) with Age of Puberty among Children Living near a Chemical Plant. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 8160–8166, doi:10.1021/es1038694.
 110. Rappazzo, K.; Coffman, E.; Hines, E. Exposure to Perfluorinated Alkyl Substances and Health Outcomes in Children: A Systematic Review of the Epidemiologic Literature. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2017**, *14*, 691, doi:10.3390/ijerph14070691.
 111. Babić Leko, M.; Gunjača, I.; Pleić, N.; Zemunik, T. Environmental Factors Affecting Thyroid-Stimulating Hormone and Thyroid Hormone Levels. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6521, doi:10.3390/ijms22126521.
 112. Vrijens, J.; Leermakers, M.; Stalpaert, M.; Schoeters, G.; Den Hond, E.; Bruckers, L.; Colles, A.; Nelen, V.; Van Den Mierop, E.; Van Larebeke, N.; et al. Trace metal concentrations measured in blood and urine of adolescents in Flanders, Belgium: Reference population and case studies Genk-Zuid and Menen. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2014**, *217*, 515–527, doi:10.1016/j.ijheh.2013.10.001.
 113. Vlaamse Milieumaatschappij (VMM) Zware metalen in grondwater Available online: <https://www.vmm.be/water/grondwater/zware-metalen-in-grondwater> (accessed on Nov 30, 2022).
 114. Parvez, F.; Lauer, F.T.; Factor-Litvak, P.; Liu, X.; Santella, R.M.; Islam, T.; Eunos, M.; Alam, N.; Sarwar, G.; Rahman, M.; et al. Assessment of arsenic and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposures on immune function among males in Bangladesh. *PLoS One* **2019**, *14*, e0216662,



doi:10.1371/journal.pone.0216662.

115. Sabir, S.; Akash, M.S.H.; Fiayyaz, F.; Saleem, U.; Mehmood, M.H.; Rehman, K. Role of cadmium and arsenic as endocrine disruptors in the metabolism of carbohydrates: Inserting the association into perspectives. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *114*, 108802, doi:10.1016/j.biopha.2019.108802.
116. Zhou, Q.; Xi, S. A review on arsenic carcinogenesis: Epidemiology, metabolism, genotoxicity and epigenetic changes. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2018**, *99*, 78–88, doi:10.1016/j.yrtph.2018.09.010.
117. Hays, S.M.; Aylward, L.L.; Gagné, M.; Nong, A.; Krishnan, K. Biomonitoring Equivalents for inorganic arsenic. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2010**, *58*, 1–9, doi:10.1016/j.yrtph.2010.06.002.
118. Wang, Z.; Sun, Y.; Yao, W.; Ba, Q.; Wang, H. Effects of Cadmium Exposure on the Immune System and Immunoregulation. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 695484, doi:10.3389/fimmu.2021.695484.
119. IARC CADMIUM AND CADMIUM COMPOUNDS Available online: <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono100C-8.pdf> (accessed on Dec 1, 2022).
120. Genchi, G.; Sinicropi, M.S.; Lauria, G.; Carocci, A.; Catalano, A. The Effects of Cadmium Toxicity. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, doi:10.3390/IJERPH17113782.
121. Van Larebeke, N.; Sioen, I.; Hond, E. Den; Nelen, V.; Van de Mieroop, E.; Nawrot, T.; Bruckers, L.; Schoeters, G.; Baeyens, W. Internal exposure to organochlorine pollutants and cadmium and self-reported health status: A prospective study. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2015**, *218*, 232–245, doi:10.1016/j.ijheh.2014.11.002.
122. Schoeters, G.; Den Hond, E.; Zuurbier, M.; Naginiene, R.; Van Den Hazel, P.; Stilianakis, N.; Ronchetti, R.; Koppe, J. Cadmium and children: Exposure and health effects. *Acta Paediatr.* **2006**, *95*, 50–54, doi:10.1080/08035320600886232.
123. Hays, S.M.; Nordberg, M.; Yager, J.W.; Aylward, L.L. Biomonitoring Equivalents (BE) dossier for cadmium (Cd) (CAS No. 7440-43-9). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2008**, *51*, S49–S56, doi:10.1016/j.yrtph.2008.05.008.
124. Remy, S.; Hambach, R.; Van Sprundel, M.; Teughels, C.; Nawrot, T.S.; Buekers, J.; Cornelis, C.; Bruckers, L.; Schoeters, G. Intelligence gain and social cost savings attributable to environmental lead exposure reduction strategies since the year 2000 in Flanders, Belgium. *Environ. Heal.* **2019**, *18*, 113, doi:10.1186/s12940-019-0548-5.
125. Rousseau, M.-C.; Straif, K.; Siemiatycki, J. IARC Carcinogen Update. *Environ. Health Perspect.* **2005**, *113*, doi:10.1289/ehp.113-1280416.
126. Mitra, P.; Sharma, S.; Purohit, P.; Sharma, P. Clinical and molecular aspects of lead toxicity: An update. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2017**, *54*, 506–528, doi:10.1080/10408363.2017.1408562.
127. Osorio-Rico, L.; Santamaria, A.; Galván-Arzate, S. Thallium Toxicity: General Issues, Neurological Symptoms, and Neurotoxic Mechanisms. In *Advances in neurobiology*; Adv Neurobiol, 2017; Vol. 18, pp. 345–353.
128. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) Thallium | Toxic Substances | Toxic Substance Portal Available online: <https://wwwn.cdc.gov/TSP/substances/ToxSubstance.aspx?toxid=49> (accessed on Dec 1, 2022).
129. Kemnic, T.R.; Coleman, M. Thallium Toxicity. In *StatPearls*; StatPearls Publishing, 2022.
130. Campanella, B.; Colombaioni, L.; Benedetti, E.; Di Ciaula, A.; Ghezzi, L.; Onor, M.; D’Orazio, M.; Giannacchini, R.; Petrini, R.; Bramanti, E. Toxicity of Thallium at Low Doses: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, 4732, doi:10.3390/ijerph16234732.
131. Filippini, T.; Tancredi, S.; Malagoli, C.; Malavolti, M.; Bargellini, A.; Vescovi, L.; Nicolini, F.; Vinceti, M. Dietary Estimated Intake of Trace Elements: Risk Assessment in an Italian Population. *Expo. Heal.* **2020**, *12*, 641–655, doi:10.1007/S12403-019-00324-W/TABLES/4.
132. Bulka, C.M.; Persky, V.W.; Daviglius, M.L.; Durazo-Arvizu, R.A.; Argos, M. Multiple metal exposures and metabolic syndrome: A cross-sectional analysis of the National Health and Nutrition Examination Survey 2011–2014. *Environ. Res.* **2019**, *168*, 397–405, doi:10.1016/j.envres.2018.10.022.
133. Li, Z.; Lewin, M.; Ruiz, P.; Nigra, A.E.; Henderson, N.B.; Jarrett, J.M.; Ward, C.; Zhu, J.; Umans, J.G.; O’Leary, M.; et al. Blood cadmium, lead, manganese, mercury, and selenium levels in American Indian populations: The Strong Heart Study. *Environ. Res.* **2022**, *215*, 114101, doi:10.1016/j.envres.2022.114101.
134. Lu, S.; Ren, L.; Fang, J.; Ji, J.; Liu, G.; Zhang, J.; Zhang, H.; Luo, R.; Lin, K.; Fan, R. Trace elements are associated with urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine level: a case study of college students in Guangzhou, China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 8484–8491, doi:10.1007/s11356-016-6104-8.
135. Jaishankar, M.; Tseten, T.; Anbalagan, N.; Mathew, B.B.; Beeregowda, K.N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip. Toxicol.* **2014**, *7*, 60–72, doi:10.2478/intox-2014-0009.
136. Urbano, T.; Filippini, T.; Wise, L.A.; Lasagni, D.; De Luca, T.; Sucato, S.; Polledri, E.; Malavolti, M.; Rigon, C.; Santachiara, A.; et al. Associations of urinary and dietary cadmium with urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-

- deoxyguanosine and blood biochemical parameters. *Environ. Res.* **2022**, *210*, 112912, doi:10.1016/j.envres.2022.112912.
137. Pizzino, G.; Irrera, N.; Bitto, A.; Pallio, G.; Mannino, F.; Arcoraci, V.; Aliquò, F.; Minutoli, L.; De Ponte, C.; D'andrea, P.; et al. Cadmium-Induced Oxidative Stress Impairs Glycemic Control in Adolescents. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 1–6, doi:10.1155/2017/6341671.
 138. Paithankar, J.G.; Saini, S.; Dwivedi, S.; Sharma, A.; Chowdhuri, D.K. Heavy metal associated health hazards: An interplay of oxidative stress and signal transduction. *Chemosphere* **2021**, *262*, 128350, doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128350.
 139. Rosales, C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 113, doi:10.3389/fphys.2018.00113.
 140. Liu, J.; Liu, Y.; Xiang, P.; Pu, L.; Xiong, H.; Li, C.; Zhang, M.; Tan, J.; Xu, Y.; Song, R.; et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts critical illness patients with 2019 coronavirus disease in the early stage. *J. Transl. Med.* **2020**, doi:10.1186/s12967-020-02374-0.
 141. Gidlow, D.A. Lead toxicity. *Occup. Med. (Chic. Ill.)* **2015**, *65*, 348–356, doi:10.1093/occmed/kqv018.
 142. Xiong, L.; Fan, C.; Song, J.; Wan, Y.; Lin, X.; Su, Z.; Qiu, J.; Wu, W.; He, Z.; Wu, Y.; et al. Associations of long-term cadmium exposure with peripheral white blood cell subtype counts and indices in residents of cadmium-polluted areas. *Chemosphere* **2022**, *308*, 135946, doi:10.1016/j.chemosphere.2022.135946.
 143. Yon, D.K.; Koh, H.Y.; An, J.; Han, M.Y. Association on serum heavy metal concentration with atopic dermatitis, allergic rhinitis, asthma, atopic multimorbidity, and pulmonary function. *World Allergy Organ. J.* **2020**, *13*, 100172, doi:10.1016/j.waojou.2020.100172.
 144. Tsai, T.-L.; Lei, W.-T.; Kuo, C.-C.; Sun, H.-L.; Su, P.-H.; Wang, S.-L. Maternal and childhood exposure to inorganic arsenic and airway allergy – A 15-Year birth cohort follow-up study. *Environ. Int.* **2021**, *146*, 106243, doi:10.1016/j.envint.2020.106243.
 145. Wang, J.; Yin, J.; Hong, X.; Liu, R. Exposure to Heavy Metals and Allergic Outcomes in Children: a Systematic Review and Meta-analysis. *Biol. Trace Elem. Res.* **2022**, *200*, 4615–4631, doi:10.1007/s12011-021-03070-w.
 146. Hirshon, J.M.; Shardell, M.; Alles, S.; Powell, J.L.; Squibb, K.; Ondov, J.; Blaisdell, C.J. Elevated Ambient Air Zinc Increases Pediatric Asthma Morbidity. *Environ. Health Perspect.* **2008**, *116*, 826–831, doi:10.1289/ehp.10759.
 147. Gehring, U.; Beelen, R.; Eeftens, M.; Hoek, G.; de Hoogh, K.; de Jongste, J.C.; Keuken, M.; Koppelman, G.H.; Meliefste, K.; Oldenwening, M.; et al. Particulate Matter Composition and Respiratory Health. *Epidemiology* **2015**, *26*, 300–309, doi:10.1097/EDE.0000000000000264.
 148. Valina, S.L.; Shtina, I.E.; Maklakova, O.A.; Eisefel'd, D.A.; Ustinova, O.Y. Markers showing allergic reactions in children caused by aerogenic exposure to manganese and nickel compounds. *Heal. Risk Anal.* **2020**, 84–91, doi:10.21668/health.risk/2020.4.09.eng.
 149. Scinicariello, F.; Buser, M.C.; Mevissen, M.; Portier, C.J. Blood lead level association with lower body weight in NHANES 1999–2006. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2013**, *273*, 516–523, doi:10.1016/J.TAAP.2013.09.022.
 150. Tinkov, A.A.; Filippini, T.; Ajsuvakova, O.P.; Aaseth, J.; Gluhcheva, Y.G.; Ivanova, J.M.; Bjørklund, G.; Skalnaya, M.G.; Gatiatulina, E.R.; Popova, E. V.; et al. The role of cadmium in obesity and diabetes. *Sci. Total Environ.* **2017**, *601–602*, 741–755, doi:10.1016/j.scitotenv.2017.05.224.
 151. Spratlen, M.J.; Grau-Perez, M.; Best, L.G.; Yracheta, J.; Lazo, M.; Vaidya, D.; Balakrishnan, P.; Gamble, M. V.; Francesconi, K.A.; Goessler, W.; et al. The Association of Arsenic Exposure and Arsenic Metabolism With the Metabolic Syndrome and Its Individual Components: Prospective Evidence From the Strong Heart Family Study. *Am. J. Epidemiol.* **2018**, *187*, 1598–1612, doi:10.1093/aje/kwy048.
 152. Padilla, M.A.; Elobeid, M.; Ruden, D.M.; Allison, D.B. An Examination of the Association of Selected Toxic Metals with Total and Central Obesity Indices: NHANES 99-02. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2010**, *7*, 3332–3347, doi:10.3390/ijerph7093332.
 153. Ge, W.; Liu, W.; Liu, G. The relationships between serum copper levels and overweight/total obesity and central obesity in children and adolescents aged 6-18 years. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2020**, *61*, 126557, doi:10.1016/j.jtemb.2020.126557.
 154. Kerkadi, A.; Alkudsi, D.S.; Hamad, S.; Alkeldi, H.M.; Salih, R.; Agouni, A. The Association between Zinc and Copper Circulating Levels and Cardiometabolic Risk Factors in Adults: A Study of Qatar Biobank Data. *Nutrients* **2021**, *13*, 2729, doi:10.3390/nu13082729.
 155. Yao, B.; Lu, X.; Xu, L.; Wang, Y.; Qu, H.; Zhou, H. Relationship between low-level lead, cadmium and mercury exposures and blood pressure in children and adolescents aged 8–17 years: An exposure-response analysis of NHANES 2007–2016. *Sci. Total Environ.* **2020**, *726*, 138446,



- doi:10.1016/j.scitotenv.2020.138446.
156. Desai, G.; Niu, Z.; Luo, W.; Frndak, S.; Shaver, A.L.; Kordas, K. Low-level exposure to lead, mercury, arsenic, and cadmium, and blood pressure among 8-17-year-old participants of the 2009–2016 National Health and Nutrition Examination Survey. *Environ. Res.* **2021**, *197*, 111086, doi:10.1016/j.envres.2021.111086.
 157. Castiello, F.; Olmedo, P.; Gil, F.; Molina, M.; Mundo, A.; Romero, R.R.; Ruíz, C.; Gómez-Vida, J.; Vela-Soria, F.; Freire, C. Association of urinary metal concentrations with blood pressure and serum hormones in Spanish male adolescents. *Environ. Res.* **2020**, *182*, 108958, doi:10.1016/j.envres.2019.108958.
 158. Luo, T.; Chen, S.; Cai, J.; Liu, Q.; Gou, R.; Mo, X.; Tang, X.; He, K.; Xiao, S.; Wei, Y.; et al. Association between combined exposure to plasma heavy metals and dyslipidemia in a chinese population. *Lipids Health Dis.* **2022**, *21*, 1–12, doi:10.1186/S12944-022-01743-6/FIGURES/3.
 159. Ferrario, D.; Gribaldo, L.; Hartung, T. Arsenic Exposure and Immunotoxicity: a Review Including the Possible Influence of Age and Sex. *Curr. Environ. Heal. Reports* **2016**, *3*, 1–12, doi:10.1007/s40572-016-0082-3.
 160. Fucic, A.; Plavec, D.; Casteleyn, L.; Aerts, D.; Biot, P.; Katsonouri, A.; Cerna, M.; Knudsen, L.E.; Castano, A.; Rudnai, P.; et al. Gender differences in cadmium and cotinine levels in prepubertal children. *Environ. Res.* **2015**, *141*, 125–131, doi:10.1016/j.envres.2014.10.008.
 161. Balali-Mood, M.; Naseri, K.; Tahergorabi, Z.; Khazdair, M.R.; Sadeghi, M. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 643972, doi:10.3389/fphar.2021.643972.
 162. Ashrap, P.; Sánchez, B.N.; Téllez-Rojo, M.M.; Basu, N.; Tamayo-Ortiz, M.; Peterson, K.E.; Meeker, J.D.; Watkins, D.J. In utero and peripubertal metals exposure in relation to reproductive hormones and sexual maturation and progression among girls in Mexico City. *Environ. Res.* **2019**, *177*, 108630, doi:10.1016/j.envres.2019.108630.
 163. Hinnouho, G.-M.; Bernstein, R.; Barffour, M.; Arnold, C.; Wessells, K.; Ratsavong, K.; Bounheuang, B.; Kounnavong, S.; Hess, S. Impact of Two Forms of Daily Preventive Zinc or Therapeutic Zinc Supplementation for Diarrhea on Hair Cortisol Concentrations Among Rural Laotian Children: A Randomized Controlled Trial. *Nutrients* **2018**, *11*, 47, doi:10.3390/nu11010047.
 164. Vaghri, Z.; Guhn, M.; Weinberg, J.; Grunau, R.E.; Yu, W.; Hertzman, C. Hair cortisol reflects socio-economic factors and hair zinc in preschoolers. *Psychoneuroendocrinology* **2013**, doi:10.1016/j.psyneuen.2012.06.009.
 165. Laitinen, R. Zinc, copper, and sexual maturation in 9-18-year-old girls and boys. *Biol. Trace Elem. Res.* **1990**, *25*, 71–78, doi:10.1007/BF02990266.
 166. Jurdziak, M.; Gać, P.; Poręba, M.; Szymańska-Chabowska, A.; Mazur, G.; Poręba, R. Concentration of Thyrotropic Hormone in Persons Occupationally Exposed to Lead, Cadmium and Arsenic. *Biol. Trace Elem. Res.* **2018**, *182*, 196–203, doi:10.1007/s12011-017-1096-x.
 167. Chen, A.; Kim, S.S.; Chung, E.; Dietrich, K.N. Thyroid Hormones in Relation to Lead, Mercury, and Cadmium Exposure in the National Health and Nutrition Examination Survey, 2007–2008. *Environ. Health Perspect.* **2013**, *121*, 181–186, doi:10.1289/ehp.1205239.
 168. Yorita Christensen, K.L. Metals in blood and urine, and thyroid function among adults in the United States 2007–2008. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2013**, *216*, 624–632, doi:10.1016/j.ijheh.2012.08.005.
 169. Dundar, B.; Öktem, F.; Arslan, M.K.; Delibas, N.; Baykal, B.; Arslan, Ç.; Gultepe, M.; İlhan, I.E. The effect of long-term low-dose lead exposure on thyroid function in adolescents. *Environ. Res.* **2006**, *101*, 140–145, doi:10.1016/J.ENVRES.2005.10.002.
 170. Krieg, E.F. A meta-analysis of studies investigating the effects of occupational lead exposure on thyroid hormones. *Am. J. Ind. Med.* **2016**, *59*, 583–590, doi:10.1002/ajim.22591.
 171. Javorac, D.; Baralić, K.; Marić, Đ.; Mandić-Rajčević, S.; Đukić-Ćosić, D.; Bulat, Z.; Djordjevic, A.B. Exploring the endocrine disrupting potential of lead through benchmark modelling – Study in humans. *Environ. Pollut.* **2023**, *316*, 120428, doi:10.1016/j.envpol.2022.120428.

