

Eindrapport

**Opmaak van een concreet en praktisch  
toepasbaar draaiboek voor toepassing van  
effectgerichte metingen in het lopende en  
toekomstige milieu- en gezondheidsbeleid met  
inbegrip van validatie door toepassing op de  
geselecteerde hot spot Genk-Zuid van het 2de  
generatie Steunpunt Milieu en Gezondheid.  
(Bestek LNE/ OL200800043/9030/M&G)**

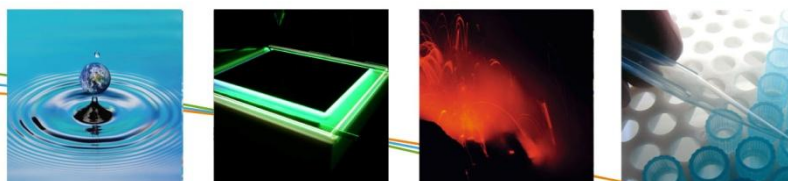
Coördinator: Dr R. Van Den Heuvel (VITO)

Medewerkers: Dr R. Smolders  
Dr H. Witters

Universiteit Hasselt: Prof Dr T. Nawrot

Vlaamse Overheid: M. Mampaey

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





## SAMENVATTING

In dit project wordt een volledig uitgewerkt en toepasbaar draaiboek opgesteld, op basis waarvan effectgerichte metingen in luchtstalen in het milieu- en gezondheidsbeleid kunnen geïntegreerd worden. Door het gelijktijdig uitvoeren van effectgerichte metingen en humane biomonitoring van de plaatselijke bevolking in de geselecteerde hotspot Genk-Zuid van het tweede generatie Steunpunt Milieu en Gezondheid en het gelijktijdig gebruik maken van beschikbare fysicochemische metingen, wordt getracht een betere relatie te leggen en inschatting te maken van de mogelijke gezondheidsrisico's van de luchtkwaliteit.

### Werkpakket 1: Draaiboek

Luchtverontreiniging is zonder twijfel één van de belangrijkste bronnen van onvrijwillige en vaak ook onbewuste blootstelling van de bevolking aan mogelijke pollutanten. Het reguleren van deze blootstelling is vanuit beleidsoogpunt dan ook vaak erg moeilijk. Nochtans geven verschillende beleidsdocumenten het belang aan van het onderzoek naar de gezondheidseffecten van luchtverontreiniging, waarbij wordt vastgesteld dat fysische en chemische metingen alleen vaak niet volstaan voor de inschatting van gezondheidseffecten. De redenen hiervoor zijn onder andere omdat:

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

De Vlaamse gezondheidsraad stelde dan ook in een advies dat er nood is aan zowel humane biomonitoring als monitoring op milieustalen aan de hand van eenvoudige biologische testsystemen die representatief zijn voor specifieke (toxische) werkingsmechanismen van stoffen. Effectgerichte metingen, i.e. het uitvoeren van metingen van de milieukwaliteit aan de hand van *in vitro* testsystemen, bieden het voordeel ervan is dat ook de effecten van onbekende stoffen of complexe mengsels op geïntegreerde wijze opgespoord kunnen worden.

Om effectgerichte metingen echter op te nemen als een beleidsondersteunend instrument om de gezondheidseffecten van luchtverontreiniging te meten, dient steeds een afweging gemaakt te worden tussen verschillende parameters die de dimensies van een meetcampagne bepalen. De belangrijkste parameters en de vragen die ermee gepaard gaan, zijn de volgende:

- Doelstellingen: Een lokale, specifieke bron of een regionale studie?
- Ruimtelijke/temporele variabiliteit: op welke locaties worden stalen verzameld?
- Staalname: welke staalnamemethode wordt gebruikt? High- of –low-volume samplers?
- Duur van bemonstering
- In vitro metingen: Welke testen worden gebruikt om mogelijke gezondheidseffecten in kaart te brengen

Het opgestelde draaiboek biedt een gestructureerde en zo objectief mogelijke beslissingsboom die als leidraad gebruikt kan worden om een optimale meetstrategie te ontwikkelen. Aan de hand van een beslissingsboom worden verschillende scenario's voorgesteld, waarbij zowel de voor- als

nadelen van de scenario's worden geïdentificeerd, en die uiteindelijk als basis voor beslissingen gebruikt kunnen worden.

In het draaiboek zijn een aantal opeenvolgende stappen gedefinieerd:

- De eerste vraag die gesteld dient te worden is of het al dan niet nodig is een effectgerichte meetcampagne op te stellen, en of dit een toegevoegde (beleidsondersteunende) waarde heeft. Om deze primaire keuze te ondersteunen werd een beslissingsboom opgesteld;
- Het doorlopen van de beslissingsboom resulteert in het vastleggen van de doelstellingen voor een campagne effectgericht meten. De belangrijkste afweging die gemaakt moet worden, gaat over het ruimtelijke karakter van een meetcampagne: lokaal of regionaal. Bij een lokale campagne wordt de bijdrage van de ruimere omgeving aan het geïdentificeerde milieuprobleem als minimaal beschouwd (bijvoorbeeld emissies van een vuilverbrandingsoven), terwijl voor een regionale campagne ook de omliggende gebieden een belangrijke bijdrage kunnen leveren tot de effecten waargenomen op de staalnamelocaties (bijvoorbeeld fijn stof in Vlaanderen);
- Een tweede beslissingsboom leidt tot het selecteren van één van vier generieke scenario's:
  - Basispakket: Specifieke bron, algemene effecten
  - Focus: Specifieke bron, specifieke effecten
  - Brede screening: Achtergrondstudie, algemene effecten
  - Biomerker batterij: Achtergrondstudie, specifieke effecten;
- Er bestaat een verband tussen verschillende generieke scenario's en de technische, logistieke, en wetenschappelijke eisen die aan een effectgerichte meetcampagne gesteld worden. Logistieke en technische parameters, zoals de selectie van de bemonsteringstoestellen, filter, extractieprocedure,... hebben een belangrijk effect op de toepasbaarheid van de verschillende beschikbare *in vitro* testmethoden, en uiteraard ook op het daarmee geassocieerde prijskaartje van de campagne;
- Een belangrijk aspect van een effectgerichte meetcampagne is de selectie van de locaties waar stalen genomen worden. In het draaiboek worden een aantal verschillende opties besproken waarop locaties geselecteerd kunnen worden:
  - Random locatie van meetpunten
  - Gestratificeerde toewijzing, rekening houdend met klimatologische data
  - Gestratificeerde toewijzing, rekening houdend met bevolkingsblootstelling
  - Toewijzing gebaseerd op praktische overwegingen.

Naast deze verschillende praktische aspecten waarmee rekening dient te worden gehouden bij het opstellen van een effectgerichte meetcampagne, werden een aantal aspecten behandeld die belangrijk zijn bij de analyse, interpretatie, en communicatie van de resultaten van een effectgerichte meetcampagne:

- Externe controle: om factoren zoals seizoensale of temporele variabiliteit in de metingen in kaart te brengen, zou een tijdsreeks van herhaalde staalnames opgesteld moeten worden. Zo kunnen latere resultaten van effectgerichte metingen uitgaande van een milieugerelateerd probleem afgetoetst worden aan de normale temporele variabiliteit van een (relatieve) Vlaamse referentiesituatie;
- Interne controle: door voor elke geselecteerde *in vitro* test een specifieke chemische stof mee te nemen als interne controle, kan de activiteit van luchtstalen op een uniforme en gestandaardiseerde manier uitgedrukt worden in "relatieve toxische eenheden" (RTE). Hierdoor wordt een maat voor eenheidstoxiciteit geïntroduceerd, die als basis gebruikt kan worden om verschillende campagnes en locaties met elkaar te vergelijken en te interpreteren;
- Statistische analyse: er werden een aantal bruikbare analysemethoden voorgesteld om de uitkomsten van een effectgerichte meetcampagne statistisch uniform te interpreteren

- Interpretatie en communicatie: Een radar diagram werd voorgesteld als een eenvoudige, overzichtelijke en aanschouwelijke manier om de data van een effectgerichte meetcampagne grafisch te presenteren.

Na afloop van de casestudie Genk-Zuid volgde een postevaluatie van het draaiboek, waarbij volgende opmerkingen gemaakt werden:

- Elke effectgerichte meetcampagne heeft zijn specifieke onderzoeksvragen, en het opgestelde draaiboek is dan ook eerder een leidraad voor beslissingen dan een rigide plan dat bij elke effectgerichte meetcampagne blindelings kan worden toegepast;
- Vanwege de logistieke en technische randvoorwaarden van de casestudie Genk-Zuid stond de keuze van het studiegebied en de te bestuderen gezondheidseffecten al op voorhand vast. Er werd in de casestudie gekozen voor een licht afwijkende vorm van het generieke scenario “Basispakket”;
- Uit de postevaluatie van de casestudie komt duidelijk naar voor dat het essentieel is om zoveel mogelijk gestandaardiseerd te werken, gebruik makende van dezelfde bemonsteringstechnologie op de verschillende staalnamelocaties;
- De strategie die gevolgd werd voor het selecteren van de meetlocaties in de casestudie volgde niet één specifiek scenario zoals beschreven in het draaiboek, maar een combinatie van verschillende opties. Langs de ene kant spitste de studie zich toe op een erg lokaal probleemgebied (Genk-Zuid), maar werd de referentielocatie gekozen op een regionale schaal (Koksijde). Hoewel er praktische redenen waren voor deze keuze, blijkt het verschil in regionaal klimaat en het specifieke karakter van Koksijde een belangrijke factor te zijn in de interpretatie van de data.

## **Werkpakket 2: Hotspot Genk-Zuid**

### Meetstrategie voor de hotspot Genk-Zuid

In een eerste fase (Hoofdstuk 2) van werkpakket 2 werd een concreet en optimaal geïntegreerde meetstrategie voor Genk-Zuid uitgewerkt. Bij de selectie van meetplaatsen, de frequentie en wijze van bemonstering en de keuze van de testen werd rekening gehouden met de vastgestelde milieuvervuiling en de mogelijke gezondheidsimpact daarvan, de praktische en financiële haalbaarheid van de meetstrategie. De meetstrategie werd eveneens afgestemd met de fysicochemische metingen (VMM) en de humane biomonitoring in de hotspot Genk-Zuid (Steunpunt Milieu en Gezondheid).

De meetstrategie voor effectgerichte metingen in de hotspot Genk-Zuid werd opgesteld naar analogie met de biomonitoringstrategie in de hotspots waarbij de resultaten van de biomerkers vergeleken worden met de referentiewaarden uit de Vlaamse referentiebiomonitoring. De referentiewaarden dienen als controlewaarde voor de case studies.

Concreet betekende dit dat effectgerichte meetresultaten van Genk-Zuid zullen vergeleken worden met een ‘Vlaamse referentiewaarde’. Het probleem stelt zich hier dat we niet over Vlaams referentiewaarden van de luchtkwaliteit beschikken die bekomen werden via effectgerichte metingen. Daarom werd gekozen om de resultaten van Genk-Zuid te vergelijken met de effectgerichte meetresultaten van een achtergrondlocatie of landelijke gebied uit één van de VMM-meetnetten.

Bij de keuze van de meetplaatsen werd rekening gehouden met de beschikbare oppervlakte voor het plaatsen van de bemonsteringstoestellen en de nutsvoorzieningen. Het VMM-meetnet zware metalen heeft in Genk meerdere meetstations gelegen op verschillende afstanden van het industriegebied. Op basis van de historische gemeten metaalconcentratie in de lucht werd de meetpost op de locatie E. Fabrylaan (code 00GK11) weerhouden als meest geschikte meetpost voor deze studie. Omdat zware metalen een probleempolluent zijn in Genk-Zuid werd de achtergrondlocatie 'Koksijde' (code 00KK02) van het VMM meetnet zware metalen weerhouden als Vlaams referentiegebied voor deze studie. Vanwege een beter ligging (binnenland) had de locatie Hechtel-Eksel een beter optie geweest in deze studie, maar de zware metaalmetingen werden eind 2007 stopgezet. De metingen op de meetpost in Aarschot (PAKs meetnet) werden in 2009 stopgezet omdat deze residentiële locatie niet meer als achtergrond kan beschouwd worden.

Om logistieke redenen werd gekozen voor de volgende opstelling van de bemonsteringstoestellen:

- In Genk werden drie laag volume bemonsteringstoestellen Partisol Plus type 2025 geplaatst met volgende kenmerken: aanzuigdebiet 1 m<sup>3</sup>/h, PM10 inlaatkop, Teflon filter (PTFE, Teflo, PALL Life Sciences, Ø=47mm);
- In Koksijde werd een hoog volume bemonsteringstoestel Digitel DHA-80 sampler geïnstalleerd met volgende kenmerken: aanzuigdebiet 30 m<sup>3</sup>/h, PM10 inlaatkop, Teflon filter (PTFE, T38, Whatman, Ø=150mm).

De meetcampagne werd uitgevoerd gedurende 6 maanden met start op 31/01/2010 en einde op 31/07/2010. De frequentie van bemonstering (24-uur bemonstering) gebeurde in functie de gezondheidseindpunten die worden gemeten in de HBM-studie. Hierbij wordt een onderscheid gemaakt tussen enerzijds humane effectbiomerkers die wijzen op een recente blootstelling en anderzijds effectbiomerkers van middellange tot lange termijn blootstelling.

Om de luchtkwaliteit van recente blootstelling te kunnen evalueren werd in Genk-Zuid de lucht bemonsterd de dag (24u) voor de onderzoeksdag van de studiepopulatie. In functie van niet-recente blootstelling is het aangewezen om te bemonsteren over een lange periode om de luchtkwaliteit te beoordelen. Daarom werd geopteerd om op verschillende dagen per maand (10 dagen per maand met spreiding in de tijd) luchtstalen te verzamelen en dit gedurende 6 maanden. Nadien worden de luchtstalen per maand gepoold tot één maandstaal.

De keuze van de *in vitro* testen werd afgestemd op de biomerkers van effect (carcinogene effecten, immunologische effecten, hormoonverstoring) die worden gemeten in de HBM-studie. Tabel 1 geeft een overzicht van de effectgerichte testen en experimentele informatie.

Tabel 1: Overzicht van de testsystemen.

Gezondheidseffect	In vitro test	Betekenis	PM10 Fractie	Referentie stof	Luchtstalen
Carcinogene effecten	Ames	Maat voor aanwezigheid van genotoxische stoffen	Extract	B(a)P	Poolstaal per maand/locatie
Immunologische effecten	Beas-2B bronchiale cellijn: il-6/il-8	Inflammatie	Partikels	LPS (endotoxine)	Poolstaal per maand/locatie
	LAL test	Maat voor aanwezigheid van endotoxines	Partikels		Poolstaal per maand/locatie
Hormoonverstoring	MELN test	Maat voor aanwezigheid van hormoonverstorende stoffen	Extract	Oestradiol	Poolstaal per maand/locatie
Oxidatieve stress	Radicaal-genererend vermogen	Vermogen om zuurstofradicalen te genereren	Partikels		Genk: dagstaal ifv HBM Koksijde: alle dagstalen

### Meetcampagne in hotspot Genk-Zuid

De meetcampagne in de hotspot Genk-Zuid wordt beschreven in Hoofdstuk 3. Per locatie werd voor elke maand (ongeveer 10 dagen per maand) een gepoold staal gemaakt. Buiten deze dagen werd er ook een 24h luchtstaal verzameld in Genk de dag die vooraf gaat aan een onderzoeksdag van de HBM-studie om korte termijn blootstelling in te schatten. In totaal werd op 10 dagen de lucht bemonsterd in functie van de HBM-veldwerkdagen.

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

De extracten (maandstalen) werden getest voor hun mutageen karakter en oestrogeen-actieve potentie. De partikels van de filters (maandstalen) werden getest voor cytotoxiciteit met Beas-2B cellen en voor hun inflammatoir karakter en de aanwezigheid van endotoxines werd geëvalueerd. Het radicaalgenererend vermogen van de partikels (dagstalen) werd eveneens onderzocht.

Om carcinogene effecten te meten werd de Ames-test uitgevoerd met de stam TA98 in aan- en afwezigheid van de metaboliserende fractie S9. Voor het testen van de oestrogene activiteit werd gebruik gemaakt van de MELN-celijn, dit zijn getransfecteerde MCF-7 cellen (humane borstkanker cellen). De cytotoxiciteit van de PM10 fractie, de potentie om cellen te beschadigen, wordt bepaald m.b.v. de neutraal rood test. Hiervoor werd gebruik gemaakt van de Beas-2B cellijn (humane bronchiale epitheliale adherente cellijn). Tegelijkertijd werd de vrijstelling van de inflammatoire merkers il-6 en il-8 in deze cellen geëvalueerd. Partikelstalen werden getest voor aanwezigheid van endotoxines. Hiervoor werd gebruik gemaakt van een kwantitatieve LAL-testkit.

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

### Resultaten van de effectgerichte metingen

In Hoofdstuk 4 en Hoofdstuk 5 worden de resultaten van de effectgerichte metingen besproken. Voor elk testsysteem werd de concentratie-respons geëvalueerd en werd het effect van de locatie, tijdstrends, chemische samenstelling en klimatologische omstandigheden onderzocht. Gegevens over de fysische en chemische samenstelling van omgevingslucht en de meteorologische condities werden ter beschikking gesteld door VMM en KMI. De windrichting tijdens de meetcampagne werd in kaart gebracht (windrozen) voor beide locaties. In tegenstelling tot de voorbije jaren is er tijdens de meetperiode februari-juli 2010 zowel in Houtem als in Antwerpen-Luchtbal meer wind uit het noordoosten en minder uit het zuidwesten. De vermindering van het aandeel ZW wind tijdens de meetcampagne betekent dat er in Koksijde minder aanvoer is van lucht afkomstig van de industriezone in Duinkerke en in Genk minder aanvoer van lucht afkomstig van de industriezone in Genk-Zuid.

#### *Ames test*

In huidige studie werd een extract als positief (mutageen) aanzien als er een significante concentratie-respons is en er een verdubbeling is van het aantal revertanten bij 20m<sup>3</sup> luchtequivalent t.o.v. de solvent controle (IF>2). Rekening houdend met de vooropgestelde criteria, tonen de resultaten aan dat alle gepoolde stalen van Koksijde en Genk schadelijke stoffen bevatten met een directe (-S9) mutagene werking en dat met uitzondering van de extracten van de maanden mei en juni uit Koksijde en juni en juli uit Genk alle extracten indirect mutageen (+S9) zijn.

Wanneer de mutagene activiteit van de maandstalen bekeken wordt in functie van de tijd, zijn er significante verschillen tussen de maanden zowel voor de directe (-S9) als de indirecte (+S9) mutageniciteit. Deze verschillen tussen de maanden worden gezien in beide locaties. De mutagene activiteit van de extracten is het hoogst in februari, maart en april zowel voor Koksijde als voor de locatie Genk. De statistische vergelijking van de twee locaties bevestigt dat de directe en de indirecte mutageniciteit verhoogd is in Genk tov Koksijde.

Een significant positieve correlatie kon aangetoond worden tussen de concentratie PM2.5 in de omgevingslucht en het direct ( $r=0.76$ ) en indirect mutageen ( $r=0.77$ ) karakter van de partikels. De directe mutagene potentie bleek positief gecorreleerd met de gemeten Pb-concentratie in de omgevingslucht ( $r=0.64$ ). Een zwak significant positieve associatie werd ook vastgesteld tussen de aanwezigheid van Cd in de lucht en de directe ( $r=0.62$ ) en indirecte mutageniciteit ( $r=0.6$ ) van de extracten. Er werden significant positieve associaties gevonden tussen het mutageen karakter van PM10 en de aanwezigheid van PAKs in de omgevingslucht. De gemeten directe en indirecte mutageniciteit van de filterextracten is significant gecorreleerd met de totale concentratie van PAKs in zwevend stof ( $r=1$ ), som carcinogene PAKs ( $r=1$ ), som niet-carcinogene PAKs ( $r=0.9$ ), en verschillende afzonderlijke PAKs zoals, benzo(a)pyreen ( $r=1$ ). Omdat er voor PAKs weinig meetgegevens beschikbaar zijn ( $n=5$ ), zijn de resultaten minder betrouwbaar. In deze studie is zwarte rook in de omgevingslucht significant gecorreleerd met het direct mutageen effect ( $r=0.65$ ). Zowel de directe ( $r=-0.68$ ) als indirecte ( $r=-0.62$ ) mutagene capaciteit van de PM10 extracten waren significant negatief gecorreleerd met de omgevingstemperatuur.

#### *MELN test*

Al de extracten, en filter blanco's werden eerst in de prescreen assay geëvalueerd. De prescreen assay bleek geen indicatie te geven voor cytotoxiciteit, noch voor antagonistische activiteit. Ondanks deze filterachtergrond waarvoor gecorrigeerd werd, kon er supplementaire oestrogene activiteit in extracten van luchtfilters uit Genk en Koksijde gemeten worden. Er werden geen uitgesproken seizoensverschillen opgemerkt, hoewel er significante verschillen tussen

verschillende maanden bleek. Globaal is het signaal in Genk ( $0.52 \text{ pgE2-Equiv/m}^3$ ) consistent hoger dan in Koksijde ( $0.25 \text{ pgE2-Equiv/m}^3$ ).

Er werd geen correlatie gevonden tussen de concentratie zwevend stof (PM10 en PM2.5) in de lucht en de oestrogene activiteit van de gecollecteerde partikels. Er werden significant positieve associaties gevonden tussen de oestrogene activiteit en de aanwezigheid van zware metalen Pb, Zn, Cu, Ni, As, Mn, Cd en Cr in PM10. Zwarte rook in de omgevingslucht bleek gecorreleerd met de oestrogene activiteit ( $r=0.79$ ) van de gecollecteerde PM10.

Er werd geen correlatie gevonden met de omgevingstemperatuur terwijl de windsterkte negatief gecorreleerd is met de oestrogene activiteit ( $r=-0.71$ ).

#### *Cytotoxiciteit*

Significante veranderingen in de viabiliteit van de cellen werden waargenomen voor alle stalen met uitzondering van poolstalen van april en juni uit Genk. De gemiddelde vermindering in leefbaarheid bedraagt  $24 \pm 9 \%$ . Algemeen kan gesteld worden dat de waargenomen cytotoxiciteit vrij laag is.

Niettegenstaande kon een significant tijds- en plaatseffect van het cytotoxisch potentieel van PM10 aangetoond worden waarbij het schadelijk karakter van de partikels verhoogd was in Koksijde ten opzichte van Genk.

Het eerder zwak cytotoxisch karakter van de partikels kon niet gecorreleerd worden met de aanwezigheid van zware metalen, zwarte rook of PAKs in de omgevingslucht.

De windsnelheid is positief gecorreleerd met het cytotoxisch effect van de partikels ( $r=0.67$ ).

#### *Inflammatoire cytokines*

Een significante concentratie-effect relatie werd vastgesteld voor de maandstalen van Genk waarbij de productie van il-6 en il-8 toeneemt bij stijgende concentratie PM10. Na blootstelling van Beas-2B cellen aan PM10 afkomstig van Koksijde kon alleen voor het maandstaal van juni een significante verhoging van de il-6 inductie worden aangetoond. De il-8 productie in Beas-2B cellen na blootstelling aan PM10 afkomstig van bemonsterde lucht in Koksijde liggen onder de waarde van de negatieve controle ( $0 \mu\text{g PM10}$ ).

Er werd een significant positieve correlatie aangetoond tussen de productie van il-6 en il-8 door Beas-2B na blootstelling aan PM10 ( $r= 0.92$ ).

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

Zowel il-6 als il-8 inductie door PM10 afkomstig van Genk is significant verhoogd in vergelijking met Koksijde.

De gemeten immuunreactie in bronchiale Beas-2B cellen is gecorreleerd met de concentratie van verschillende zware metalen in de omgevingslucht. De Spearman rank correlaties tonen aan dat er een significant positieve correlatie is tussen de productie van het inflammatoire cytokines il-6 en de metalen Pb ( $r=0.64$ ), Zn ( $r=0.71$ ), Cu ( $r=0.8$ ), As ( $r=0.78$ ), Mn ( $r=0.86$ ), Cd ( $r=0.74$ ) en Cr ( $r=0.84$ ). Ook de productie van il-8 is positief gecorreleerd met de aanwezigheid van de metalen Cu ( $r=0.72$ ), As ( $r=0.55$ ), Mn ( $r=0.77$ ), Cd ( $r=0.61$ ) en Cr ( $r=0.76$ ) in de omgevingslucht.

Een significant positieve associatie werd waargenomen tussen de omgevingstemperatuur en de capaciteit van PM10 om il-8 te induceren in Beas-2B cellen ( $r= 0.66$ ). De temperatuur was eveneens positief gecorreleerd met il-6 inductie maar de relatie was niet significant ( $r=0.65$ ). Deze resultaten bevestigen de verhoogde cytokineproductie na blootstelling aan PM10 verzameld in juni en juli. De windsnelheid is negatief gecorreleerd met het immunotoxisch effect (il-6:  $r=-0.95$ ; il-8:  $r=-0.93$ ).

### *Endotoxine bepaling*

De aanwezigheid van endotoxines werd nagegaan in het partikel extract (100 µg PM10/ml) waaraan de Beas-2B cellen werden blootgesteld. In slechts in 3 maandstalen (Genk juni, Genk juli en Koksijde juni) konden endotoxine gehalten gemeten worden boven de detectielimiet (0.1 EU/ml). De gemeten niveaus van endotoxine in de bemonsterde lucht kunnen de inflammatoire potentie van de PM10 stalen niet verklaren.

### *Radicaalgenererend vermogen*

Het radicaalgenererend vermogen is significant hoger voor Genk (gemiddelde = 1495.7) dan voor Koksijde (gemiddelde = 352.6).

Tijdens de studieperiode werd er geen associatie gevonden tussen het radicaalgenererend vermogen en de kalendertijd zowel voor Genk als Koksijde.

Ondanks het beperkt aantal datapunten kon er een sterk significante positieve associatie aangetoond worden tussen het radicaalgenererend vermogen van PM10 en de inflammatoire potentie van de partikels.

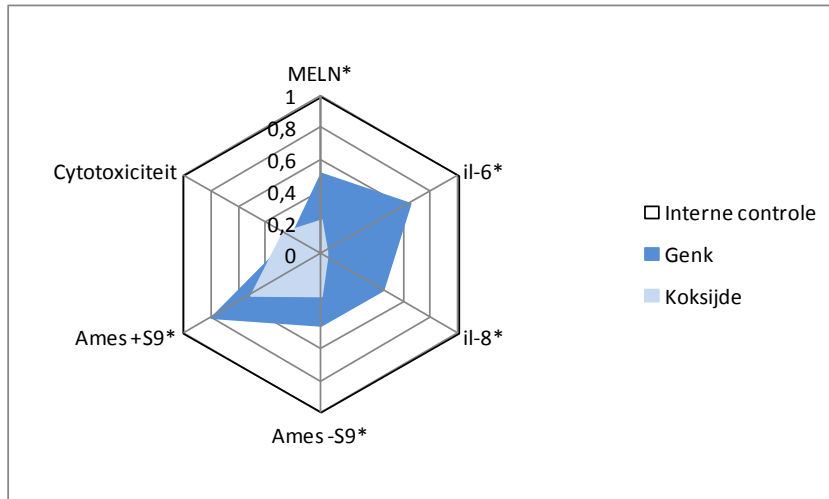
Het radicaalgenererend vermogen van de dagstalen fijn stof is significant gecorreleerd met alle beschouwde metalen in de omgevingslucht: lood,  $r=0.71$ ; zink,  $r=0.63$ ; koper,  $r=0.73$ ; nikkel,  $r=0.47$ ; arseen,  $r=0.59$ ; mangaan,  $r=0.63$ ; cadmium,  $r=0.66$ ; chroom,  $r=0.48$ . Ook de correlaties tussen radicaalgenererend vermogen en PM10 ( $r=0.67$ ), PM2.5 ( $r=0.74$ ) en zwarte rook ( $r=0.83$ ) zijn significant ( $p<0.01$ ).

Voor radicaal genererend vermogen en temperatuur is de lineaire associatie niet significant. Een regressiemodel met temperatuur en de kwadratische term voor temperatuur toont een significant niet-lineair verband en verklaart 28% van de variatie in het radicaalgenererend vermogen. Er is een significant negatieve associatie tussen het radicaalgenererend vermogen van de partikels en de hoeveelheid neerslag ( $r= -0.32$ ).

### *Toxicologisch profiel van Genk en Koksijde*

Door gebruik te maken van een interne controle (referentiestof) voor elk gemeten eindpunt werd de gemiddelde berekende toxische respons per locatie uitgedrukt als equivalent van de referentiestof (vb pg E2-equivalenten).

Voor elk eindpunt werd de deze toxiciteitsequivalent omgerekend naar een relatieve toxische eenheid. Met behulp van deze waarden kan het toxicologisch profiel van de hotspot en het controle gebied op eenvoudige manier grafisch worden voorgesteld (Figuur 1).



Figuur 1: Grafische voorstelling van het toxicologisch profiel van Genk en Koksijde. (\* significante verschillen tussen Genk en Koksijde)

### Relatie effectgericht meten en de HBM-studie

In Hoofdstuk 6 wordt eerst een overzicht gegeven van de beschikbare gezondheidsgegevens afkomstig van de Gezondheidsenquête in Genk-Zuid en de effectmerkers in de HBM-studie van de hotspot Genk-Zuid. Vervolgens werd nagegaan of de potentiële gezondheidseffecten van het fijn stof goed werden ingeschat met behulp van de effectgericht metingen.

De relatie van het radicaalgenererend vermogen van PM10 tot biomerkers van recente blootstelling (komeetttest (standaard en oxidatief) en 8-OH-deoxyguanosine in urine) werd onderzocht. De oxidatieve komeetttest is significant geassocieerd met het de radicaalgenerende capaciteit van PM10 1 dag voor de bloedname ( $r=0.2$ ) terwijl de klassieke komeetttest en de urinaire uitscheiding van 8-deoxy-guanosine geen significante associaties vertoonden.

De inductie van il-6 en il-8 in de bronchiale epitheelcellen na blootstelling aan PM10 wijzen op het inflammatoir karakter van de partikels. De beschikbare gezondheidsgegevens geven echter weinig informatie over long- en luchtwegaandoeningen. In de gezondheidsenquête Genk-Zuid kwamen luchtwegaandoeningen meer voor in de case gebieden rondom het industrieterrein Genk-Zuid tegenover de controlegebieden na correctie voor confounders. In de HBM-studie werd gekeken naar het voorkomen van astma en allergie. In de voorgelegde vragenlijst werden luchtwegklachten niet specifiek bevestigd. Het perceptieonderzoek dat werd uitgevoerd in de HBM-studie geeft daarentegen wel aan dat de jongeren van mening zijn dat er meer luchtwegklachten voorkomen in de hotspot Genk-Zuid.

De resultaten van de Ames test tonen aan dat de luchtstalen uit Genk een verhoogde mutagene potentie vertonen. In de HBM-studie werd er een significante verhoging van komeetwaarden in vergelijking met Vlaamse referentiewaarden vastgesteld.

In de huidige studie werd endocrien versturende activiteit in de PM10-extracten afkomstig van Genk-Zuid waargenomen. In de HBM-studie werden significante verschillen waargenomen in hormoonwaarden en puberteitsontwikkeling in vergelijking met de referentiepopulatie.

### Vergelijking met de pilootstudie

In Hoofdstuk 7 worden de resultaten van huidige studie vergeleken met de resultaten van het Pilotproject voor effectgerichte metingen in omgevingslucht ("Uitwerken en uitvoeren van een

pilootproject voor effectgerichte metingen om de luchtkwaliteit in Vlaanderen te kunnen evalueren" (OL200500031)). Er werden in deze studie een industriële site (Zelzate), een stedelijke site (Borgerhout) en een landelijke site (Aarschot) bemonsterd (TSP) (periode september 2006 tot september 2007).

In beide studies werden ASE-extracten gemaakt van de beladen filters en werd dezelfde concentratiereeks van  $m^3$  luchtequivalent getest in de Ames test. Statistische vergelijking van de verschillende locaties toont aan dat het direct mutageen signaal in Genk verhoogd is ten opzichte van dat van de andere locaties.

Het cytotoxisch karakter van TSP afkomstig van Aarschot, Borgerhout en Zelzate is significant verhoogd in vergelijking met het effect van PM10 uit Genk en Koksijde.

Il-6 en il-8 inductie in Beas-2B is significant verhoogd in Genk in vergelijking met Koksijde. De il-6 verhoging t.o.v. van de andere locaties is niet significant. Il-8 inductie is vergelijkbaar tussen Genk, Aarschot, Borgerhout en Zelzate.

Met behulp van de MELN assay werden in de pilootstudie en in de huidige studie de aanwezigheid van stoffen met oestrogene activiteit in organische extracten van luchtfilters aangetoond.

### Besluit

In WP1 werden finaal een aantal specifieke aandachtspunten geïdentificeerd die mee in rekening gebracht dienen te worden bij toekomstige effectgerichte meetcampagnes:

- Nood aan een gestandaardiseerde bemonsteringsopstelling;
- De keuze van de staalnamelocaties is cruciaal, voornamelijk het selecteren van een representatieve referentielocatie;
- Het draaiboek biedt over het algemeen een goede handleiding voor het opstellen van meetcampagnes, maar is eerder een leidraad dan een rigide document waarbij flexibiliteit een belangrijk aspect blijft.

In WP2 werd een concreet en optimaal geïntegreerde meetstrategie uitgewerkt voor de toxicologische karakterisatie van PM10 geïncubeerd op filters in de geselecteerde hotspot Genk-Zuid van het tweede generatie Steunpunt Milieu en Gezondheid, door gebruik te maken van biologische testen. De effectgerichte meetcampagne werd gedurende 6 maanden uitgevoerd in Genk en de achtergrondlocatie Koksijde.

Het onderzoek toonde aan dat de gebruikte biologische testen een toxicologisch beeld van de verzamelde partikels gaven. Het mutageen, inflammatoir, hormoonverstorend en radicaalgenererend karakter van de luchtstalen varieerde in functie van de tijd, plaats en klimatologische omstandigheden. De gemeten eindpunten waren significant verhoogd in Genk in vergelijking met Koksijde. De toxicologische effecten konden deels verklaard worden door de aanwezigheid van chemische componenten in de omgevingslucht.

Het gelijktijdig uitvoeren van effectgerichte metingen en humane biomonitoring van de plaatselijke bevolking in de geselecteerde hotspot Genk-Zuid heeft toegelaten om een betere relatie te leggen en inschatting te maken van de luchtkwaliteit en de mogelijke gezondheidsrisico's hiervan. Het gezondheidsrisico werd met behulp van de effectgerichte metingen goed ingeschat. Het genotoxisch en endocrien verstorend karakter van de omgevingslucht in Genk-Zuid werd bevestigd door de verhoogde meetwaarden van humane effectmerkers voor genotoxiciteit en endocriene verstoring in de HBM-studie. In deze studie werd voor de eerste keer een significante associatie aangetoond tussen het radicaal genererende vermogen van fijn stof met humane toxiciteit (komeetttest) in een populatie.

---

## SUMMARY

This project aimed to draft a completely elaborated and applicable scenario to better integrate effect-oriented measurements in air samples and environmental and health policy. In order to better assess the potential risk to human health from environmental air quality, effect-oriented measurements will be performed simultaneously with human biomonitoring of the local population in the selected hotspot Genk-Zuid from the second generation Flemish Centre of expertise on Environment and Health (Steunpunt Milieu en Gezondheid) and available physicochemical data will be taken into account.

### Work package 1: Scenario

Without a doubt, air pollution is one of the most important sources of involuntary and often also unknown exposure of the general population to environmental contaminants. Yet, because of its involuntary nature, regulating exposure is often very difficult from a legislative point of view. Nonetheless, several policy documents highlight the need for further research on the health effects of air pollution, taking into account that physical and chemical measurements alone are often not sufficient to understand potential adverse health effects. The reasons for these are among others:

- The health impact of the majority of compounds is not fully understood;
- There is large uncertainty regarding the potency of individual compounds (and mixtures thereof) to cause health effects,
- The number of pollutants that can be measured is limited;
- Complex mixtures of substances, as they are frequently found in the environment, can cause important synergistic effects with regard to health damage.

The Flemish Health Council outlined in a recent advice that there is a need for human biomonitoring as well as environmental monitoring using simple, biologically relevant test systems that are representative for specific (toxic) working mechanisms. Effect-oriented measuring, i.e. measuring environmental quality based on *in vitro* test systems, offers the possibility to quantify the integrated effect of unknown compounds or complex mixtures.

In order to include effect-oriented measuring as a tool for environmental policy support, several parameters need to be taken into account. The most important ones, and the issues related to them, are:

- Aims: a local, specific pollution source, or a regional study?
- Spatial/temporal variability: at which locations are samples collected?
- Sampling period: when to collect a representative sample?
- *In vitro* measurements: which tests are used to quantify potential health effects?

The scenario document offers a structured and objective decision tree that can be used as a guidance to develop an optimal measuring strategy. In the decision tree, various possible scenarios are proposed, and their advantages and disadvantages are identified. In the procedure, a number of steps are identified:

- The first aspect that needs to be addressed is whether it makes sense to start an effect-oriented measuring campaign, and whether it offers sufficient added value for policy making;
- The most important issue that needs to be addressed deals with the spatial dimensions of a measuring campaign: local or regional? In a local campaign, the impact of the wider

environment is negligible (e.g. around a waste incinerator), while the wider environment is assumed to have a substantial impact in a regional campaign (e.g. PM<sub>x</sub> emissions in Flanders);

- A second decision tree supports the selection of one of four different generic scenarios:
  - Basic: specific source, general effects
  - Focus: specific source, specific effects
  - Screening: background study, general effects
  - Biomarker battery: background study, specific effects.
- There is a relationship between different generic scenarios and the technical, logistic, and scientific demands which are inherent to an effect-oriented measuring campaign. Logistic and technical parameters, such as the selection of the sampling device, filter, extraction procedure,... have an important effect on the applicability of the different *in vitro* testing methods available, and also bears the financial implications;
- An important consideration in an effect-oriented campaign is the selection of the sampling locations. In the scenario-document, a number of options are discussed:
  - Random sampling allocation;
  - Stratified allocation, based on climatological data;
  - Stratified allocation, based on population exposure;
  - Allocation based on practical requirements.

Apart from these practical aspects, a number of additional requirements were identified that are important in the analysis, interpretation, and communication of the results from an effect-oriented measuring campaign:

- External control: to take into account factors such as seasonal or temporal variability, a time series of repeated measurements should be constructed in selected areas. This way, later results from effect-oriented measuring campaigns can be more easily compared to the normal (relative) Flemish reference situation;
- Internal control: by including a specific chemical compound as an internal control in each *in vitro* test, the potency of samples can be expressed in “relative toxic units”. Through this approach, a toxic units measure is introduced that can be used to compare different campaigns across large time spans and different locations;
- Statistical analyses: a number of specific statistical tests were proposed to improve the uniformity of the statistical interpretation of different effect-oriented measuring campaigns;
- Interpretation and communication: a radar-diagram was proposed as a simple and easily interpretable way to graphically present the outcome of an effect-oriented measuring campaign.

Following the Genk-Zuid case study, a post evaluation of the scenario document was performed. The following remarks were made:

- Every measuring campaign has its specific aims and achievements, in which the scenario document is more a guidance document than a rigid manual on how to perform effect-oriented measurements;
- The logistic and technical boundaries of the case-study Genk-Zuid were fixed in advance, and hence were not determined following the procedures outlined in the scenario document. A slightly different version of the generic scenario “Basic” was selected;
- Following the post-evaluation, the need to use standardised sampling methodologies emerges as one of the essential points of an effect-oriented measuring campaign;
- The strategy that was followed for the selection of the sampling locations was a combination of two different options foreseen in the scenario document. On the one hand,

the case-study focuses on a local area (Genk-Zuid), yet the reference location Koksijde was chosen at a regional scale. Although there were practical reasons to support this choice, the differences in regional climate and the maritime character of Koksijde are important factors that hamper the interpretation of the data.

## **Work package 2: Hotspot Genk-Zuid**

### Measuring strategy for the hotspot Genk-Zuid

In a first phase (Chapter 2) of work package 2 a concrete and optimal integrated measuring strategy was setup for the hotspot Genk-Zuid. The selection of the measuring sites, the frequency and manner of sampling and the selection of tests took into account the local airpollution and the possible health impact thereof and the practical and financial feasibility of the measuring strategy. The measuring strategy was tuned with ongoing physicochemical measurements (VMM= Flemish Environment Agency) and the human biomonitoring study in the hotspot Genk-Zuid.

The measuring strategy for the effect-oriented measurements in the hotspot Genk-Zuid was setup in accordance with the biomonitoring strategy in the hotspot where the results of the biomarker measurements will be compared with reference values from the Flemish biomonitoring study. The reference values serve as control values for the case studies.

This means that the results from effect-oriented measurements from Genk-Zuid will be compared with a 'Flemish reference value'. However, there are no such Flemish reference values for air quality obtained by effect-oriented measurements. As a consequence, it was decided to compare the results from Genk-Zuid with effect-oriented measurements in a 'Flemish reference location' eg a background location or rural area in one of the VMM monitoring networks.

The choice of the measuring locations depended on the available space to install the air sampling device and the availability of electric supply. The VMM monitoring network heavy metals has several sampling sites in Genk at different distances from the industrial park. Based on historical metal concentration data the location E. Fabrylaan (code 00GK11) was retained for the current study. As heavy metals are a major problem in Genk-Zuid, the background location 'Koksijde' (code 00KK02) from the VMM monitoring network heavy metals was chosen as Flemish reference location. Due to its geographic location inland the background location Hechtel-Eksel would have been a better option but heavy metal monitoring has stopped in 2007. Monitoring of PAHs in Aarschot has been ceased as well as this residential location could no longer be considered as a background location.

For logistic reasons the following arrangement was chosen for the position of the air sampling devices:

- Three low-volume samplers Partisol Plus type 2025 were installed in Genk. These air samplers have the following characteristics: flow rate 1 m<sup>3</sup>/h, PM10 pre-separator, Teflon filter (PTFE, Teflo, PALL Life Sciences, Ø=47mm);
- In Koksijde a high-volume sampler Digitel DHA-80 sampler was installed having the following characteristics: flow rate 30 m<sup>3</sup>/h, PM10 pre-separator, Teflon filter (PTFE, T38, Whatman, Ø=150mm).

The sampling campaign started at 31/01/2010 and ended at 31/07/2010. Sampling frequency (24-hour sampling) was harmonised on the one hand to the human biomarkers of effect reflecting

recent exposure and on the other hand to biomarkers of effect reflecting medium-term to long-term exposure.

To assess the air quality reflecting recent exposure, 24-hour sampling was carried out in Genk-Zuid the day preceding the examination day of the study population. In relation to non-recent exposure it is recommended to perform sampling covering a longer period to assess the air quality. To this end several 24-hour samples were collected (10 days per month, spread equally in time) during 6 months. Samples collected at the same location and during the same month were pooled together.

The selection of *in vitro* assays corresponded to the biomarkers of effect (carcinogenic effects, immunological effects, endocrine disruption) which were retained in the biomonitoring study. Table 1 gives an overview of the effect-oriented tests and experimental details.

Table 1: Overview of the assays.

Health effect	<i>In vitro</i> test	Meaning	Fraction PM10	Reference compound	Air sample
Carcinogenic effect	Ames	Measure for presence of genotoxic compounds	Extract	B(a)P	Pooled month sample/location
Immunological effect	Beas-2B bronchial cell line: il-6/il-8	Inflammation	Particles	LPS (endotoxin)	Pooled month sample/location
	LAL test	Measure for presence of endotoxin	Particles		Pooled month sample/location
Endocrine disruption	MELN test	Measure for presence of endocrine disrupting compounds	Extract	Oestradiol	Pooled month sample/location
Oxidative stress	Radical generating activity	Ability to generate reactive oxygen species	Particles		24-hr sample preceding examination day

### Sampling campaign in hotspot Genk-Zuid

The sampling campaign in the hotspot Genk-Zuid is described in Chapter 3. Samples collected at the same location during the same month (appr. 10 days/month) were pooled together. Alongside these collections, 24-hour samples (n=10) were collected in Genk the day preceding the examination day in order to assess short-term exposure.

Sample treatment occurred in function of the biological test systems. Particulate matter (PM) was collected and filters were extracted using ASE (Accelerated Solvent Extraction).

The organic extracts (month samples) were tested for their mutagenic and estrogenic-active potential. The cytotoxic and inflammatory character of the particulate matter (month samples) were tested using Beas-2B cells and the presence of endotoxin was evaluated. The ability of the particulates to generate hydroxyl-radicals (24-hr samples) was examined as well.

Carcinogenic effects were evaluated using the Ames assay with TA98 strain in the presence and absence of the metabolic fraction S9. To test the estrogenic activity of the extracts, the MELN cell line which are transfected MCF-7 cells (human breast cancer cells) was used. Cytotoxicity of PM10,

the capacity to damage cells, was assessed using the neutral red uptake assay in Beas-2B cells (human bronchial epithelial cells). Simultaneously, the release of the inflammatory markers il-6 and il-8 was evaluated. Particle samples were tested for the presence of endotoxin using a quantitative LAL-test kit. The oxidative capacity, measured by the ability of particle suspensions to generate hydroxyl radicals *in vitro*, was determined using a non biological test. The oxidative activity reflects the potency to cause biological damage.

### Results of the effect-oriented measurements

The results of the effect-oriented measurements are discussed in Chapter 4 and 5. The concentration-response was evaluated for each test system and effect of location, time trends, chemical characteristics, and climate conditions were investigated. Data on physicochemical characteristics of ambient air and meteorological conditions were provided by VMM (Vlaamse Milieumaatschappij) and KMI (Koningklijk Meteorologisch Instituut). The wind direction during the sampling campaign was mapped (wind roses) for both locations. Unlike previous years, there was more wind from the northeast and less wind from the southwest during the sampling campaign February-July 2010 in Houtem as well as in Antwerp-Luchtbal. The latter implicates less supply of air from the industrial park Duinkerke to Koksijde and less supply of air from the industrial park Genk-Zuid to Genk.

#### *Ames test*

In this study, an extract was considered as positive (mutagenic) in case a significant concentration-response was observed and when there was a doubling of revertants at 20 m<sup>3</sup> air equivalent compared to solvent control (Induction Factor > 2). Taking into account these criteria, the results showed a direct (-S9) mutagenic effect induced by the pooled samples of Koksijde and Genk. Furthermore, all extracts were indirect mutagenic (+S9), except those from May and June from Koksijde and June and July from Genk.

For direct (-S9) and indirect (+S9) mutagenic activity, significant differences in function of time were observed between the months at both locations. The mutagenic response of the extracts was the highest in February, March, and April in Koksijde as well as in Genk. Statistic comparison of both locations confirmed an increased (in)direct mutagenic activity in Genk compared to Koksijde.

A significant positive correlation was demonstrated between the PM<sub>2.5</sub> concentration in ambient air and the direct ( $r=0.76$ ) and indirect ( $r=0.77$ ) mutagenic character of the particles. The direct mutagenic potential was positively correlated with Pb concentrations in ambient air ( $r=0.64$ ). A weak significant positive correlation was found between the presence of Cd in ambient air and the direct ( $r=0.62$ ) and indirect ( $r=0.60$ ) mutagenic response of the extracts. Significant positive associations were observed between the mutagenic potential of PM<sub>10</sub> and the presence of PAHs in ambient air. The (in)direct mutagenicity of the filter extracts was significantly correlated with the total concentration of PAHs in suspended particulate matter ( $r=1$ ), sum carcinogenic PAHs ( $r=1$ ), sum non-carcinogenic PAHs ( $r=0.9$ ), and several individual PAHs, such as benzo(a)pyrene ( $r=1$ ). Because the available number of PAHs data is small in this study ( $n=5$ ), the results are less reliable. In this study, black smoke in ambient air was significantly correlated with the direct mutagenic effect ( $r=0.65$ ). Both direct ( $r=-0.68$ ) and indirect ( $r=-0.62$ ) mutagenic potential of PM<sub>10</sub> extracts were significantly negatively correlated with temperature.

#### *MELN test*

All extracts and filter blanks were first evaluated in a prescreen assay. The latter showed no indication of cytotoxicity, nor antagonistic activity. Despite the corrections for filter background,

additional estrogenic activity was found in extracts of air filters from Genk and Koksijde. No marked seasonal differences were noted, although significant differences were observed between the different months. Overall, the signal in Genk (0.52 pgE2-Equiv/m<sup>3</sup>) was consistently higher compared to Koksijde (0.25 pgE2-Equiv/m<sup>3</sup>).

No correlation was found between the ambient PM concentration (PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub>) and the estrogenic activity of the collected particles. Significant positive associations were found between the estrogenic activity and the presence of heavy metals Pb, Zn, Cu, Ni, As, Mn, Cd, and Cr in PM<sub>10</sub>. Black smoke in ambient air was correlated with estrogenic activity ( $r=0.79$ ) of the collected PM<sub>10</sub>. No correlation was found with temperature, while wind speed was negatively correlated with estrogenic activity ( $r=-0.71$ ).

### *Cytotoxicity*

Significant differences in cell viability were observed for all samples, except the pooled samples of April and June from Genk. The average reduction in cell viability was  $24\pm 9\%$ . Generally, the observed cytotoxicity was quite low. Despite this, a significant effect of time and place was observed for the cytotoxic potential of PM<sub>10</sub> with an increased harmful nature of the particles in Koksijde compared to Genk.

It was not possible to correlate the rather weak cytotoxic potential of the particles with the presence of heavy metals, black smoke, or PAHs in ambient air. The wind speed was positively correlated with the cytotoxic effect of the particles ( $r=0.67$ ).

### *Inflammatory cytokines*

A significant concentration-effect relationship was established for the month samples of Genk in which the production of IL-6 and IL-8 increased with increasing concentration of PM<sub>10</sub>. A significant enhanced IL-6 production was only observed in the sample from June after exposure of BEAS-2B cells to PM<sub>10</sub> from Koksijde. The IL-8 production in BEAS-2B cells exposed to PM<sub>10</sub> from Koksijde was below the negative control value (0  $\mu\text{g}$  PM<sub>10</sub>).

A significant positive correlation was observed between the production of IL-6 and IL-8 after exposure of BEAS-2B cells to PM<sub>10</sub> ( $r=0.92$ ). The inflammatory potential was the highest during the summer months (June and July) and the lowest during the winter months (February and March). Both IL-6 and IL-8 induction by PM<sub>10</sub> from Genk was significantly enhanced compared to Koksijde.

The immune reaction in bronchial BEAS-2B cells was correlated with the concentration of different heavy metals in ambient air. The Spearman rank correlations showed a significant positive correlation between production of inflammatory cytokines IL-6 and metals Pb ( $r=0.64$ ), Zn ( $r=0.71$ ), Cu ( $r=0.8$ ), As ( $r=0.78$ ), Mn ( $r=0.86$ ), Cd ( $r=0.74$ ), and Cr ( $r=0.84$ ). Furthermore, the production of IL-8 was positively correlated with the presence of metals Cu ( $r=0.72$ ), As ( $r=0.55$ ), Mn ( $r=0.77$ ), Cd ( $r=0.61$ ), and Cr ( $r=0.76$ ) in ambient air.

A significant positive association was observed between ambient temperature and capacity of PM<sub>10</sub> to induce IL-8 in BEAS-2B cells ( $r=0.66$ ). The temperature was also positively correlated with IL-6 induction, but this relation was not significant ( $r=0.65$ ). These results confirm the enhanced cytokine production after exposure of BEAS-2B cells to PM<sub>10</sub> collected in June and July. The wind speed was negatively correlated with the immunotoxic effects (IL-6:  $r=-0.95$ ; IL-8:  $r=-0.93$ ).

### *Endotoxin determination*

The presence of endotoxins was investigated in the particle extract (100  $\mu\text{g}$  PM<sub>10</sub>/ml) to which BEAS-2B cells were exposed. In only 3 month samples (Genk June, Genk July, and Koksijde June),

endotoxin was measured above the detection limit (0.1 EU/ml). These endotoxin levels could not explain the inflammatory potential of PM10 samples.

#### *Radical generating capacity*

The ability to generate hydroxyl radicals was significantly higher for Genk (average = 1495.7) compared to Koksijde (average = 352.6). During the study period no association was found between the oxidative capacity and calendar time for both Genk and Koksijde.

Despite the limited number of data points, a strong significant positive association was demonstrated between the radical generating capacity of PM10 and the inflammatory capacity of the particles.

The radical generating capacity of daily samples particulate matter was significantly correlated with all metals in ambient air: Pb,  $r=0.71$ ; Zn,  $r=0.63$ ; Cu,  $r=0.73$ ; Ni,  $r=0.47$ ; As,  $r=0.59$ ; Mn,  $r=0.63$ ; Cd,  $r=0.66$ ; and Cr,  $r=0.48$ . In addition, significant correlations ( $p<0.01$ ) were observed between the radical generating capacity and PM10 ( $r=0.67$ ), PM2.5 ( $r=0.74$ ) and black smoke ( $r=0.83$ ).

The linear association for radical generating capacity and temperature was not significant. A regression model for temperature and the quadratic term for temperature showed a significant non-linear association and explained 28% of the variation in radical generating capacity. A significant negative association was observed between the radical generating capacity of particles and the amount of rain ( $r=-0.32$ ).

#### *Toxicological profile of Genk and Koksijde*

Through the use of an internal control (reference compound) for each endpoint, the average calculated toxic response for each location was expressed as equivalent of the reference compound (e.g. E2-equivalents).

For each endpoint this toxicological equivalent value was converted to a relative toxic unit. Using these values, the toxicological profile of the hot spots and control areas can easily be presented graphically (Figure 1).

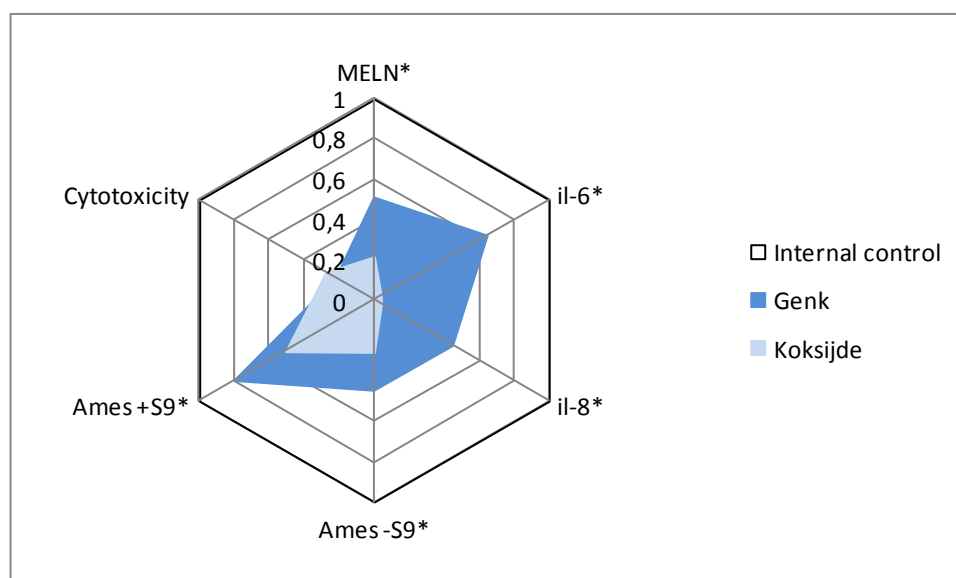


Figure 1: Graphical presentation of the toxicological profile of Genk and Koksijde (\* significant difference between Genk and Koksijde)

### Relationship effect-oriented measurements and HBM study

Chapter 6 starts with an overview of available health data from the Health Survey Genk-Zuid and the effect markers in the HBM study of hotspot Genk-Zuid. Furthermore, it was considered whether potential health effects of particulate matter were well estimated using the effect-oriented measurements.

The relation between radical generating capacity of PM10 and biomarkers of recent exposure (comet assay (standard or oxidative) and 8-OH-deoxyguanosine in urine) was investigated. The oxidative comet assay was significantly associated with the radical generating capacity of PM10 one day before blood collection ( $r=0.2$ ), while the classic comet assay and urinary excretion of 8-OH-deoxyguanosine showed no significant associations.

The induction of Il-6 and Il-8 in bronchial epithelial cells after exposure to PM10 emphasize the inflammatory potential of the particles. Available health data provide little information on lung and respiratory diseases. The Health Survey Genk-Zuid revealed more respiratory disorders in case areas surrounding the industrial site Genk-Zuid compared to control areas after adjustment for confounders. The HBM study looked at prevalence of asthma and allergy. Respiratory disorders were not specifically questioned. The perception survey carried out in the HBM study indicates, however, that youth believe in a higher prevalence of respiratory symptoms in the hot spot Genk-Zuid.

Ames results show an enhanced mutagenic activity of air samples from Genk. A significant increase in comet values was observed compared to the Flemish reference value in the HBM study.

In the present study, endocrine disrupting activity was demonstrated in PM10 extracts from Genk-Zuid. The HBM study showed significant differences in hormone levels and pubertal development compared to the reference population.

### Comparison with the pilot study

In Chapter 7, the results of the current study are compared with the results of the Pilot project effect-oriented measurements in ambient air (“Uitwerken en uitvoeren van een pilootproject voor effectgerichte metingen om de luchtkwaliteit in Vlaanderen te kunnen evalueren” (OL200500031)). In the latter study, an industrial site (Zelzate), an urban site (Borgerhout), and a rural site (Aarschot) were sampled (TSP) (Period September 2006 to September 2007). In both studies, ASE-extracts were prepared from loaded filters and the same concentration range  $m^3$  air equivalent was tested in the Ames test. Statistical comparison of the different sites showed an increased direct mutagenic signal in Genk compared to the other sites.

The cytotoxic potential of TSP from Aarschot, Borgerhout, and Zelzate was significantly enhanced compared to the effect of PM10 from Genk and Koksijde.

Il-6 and Il-8 induction in BEAS-2B cells was significantly enhanced in Genk compared to Koksijde. The increase of Il-6 compared to the other locations was not significant. Il-8 induction was comparable between Genk, Aarschot, Borgerhout, and Zelzate.

The MELN assay demonstrated the presence of substances with estrogenic activity in organic extracts of air filters in both studies.

## Conclusion

In WP1 a number of specific points were raised that need to be taken into account in any future effect-oriented measurement campaign:

- There is an urgent need for standardised sampling setup;
- The selection of sampling locations is crucial, particularly selecting a sufficiently representative reference location;
- The scenario document provides support and guidance in the establishment of effect-oriented measuring campaigns, but should be seen as a flexible decision support instrument rather than a rigid framework.

In WP2 a clear and optimal integrated measuring strategy was developed for the toxicological characterisation of PM10 collected on filters in the selected hot spot Genk-Zuid from the second generation Flemish Centre of Expertise on Environment and Health (Steunpunt Milieu en Gezondheid) using biological tests. The effect-oriented sampling campaign was conducted over 6 months in Genk and the background location Koksijde.

The study showed that a toxicological profile of the collected PM10 can be determined by the used biological tests. The mutagenic, inflammatory, endocrine disrupting, and radical generating capacity of the air samples varied in function of time, location, and climatic conditions. The measured endpoints were significantly increased in Genk compared to Koksijde. The toxicological effects could partly be explained by the presence of chemical components in ambient air.

The simultaneous performance of effect-oriented measuring and human biomonitoring of the local population in the selected hot spot Genk-Zuid allowed for a better relationship between and estimation of air quality and possible related health risks. The health risk was well estimated using effect-oriented measurements. The genotoxic and endocrine disrupting potential of ambient air in Genk-Zuid was confirmed by elevated values of human effect markers for genotoxicity and endocrine disruption in the HBM study. In the current study a significant association was demonstrated for the first time between the radical generating capacity of particulate matter and human toxicity (comet assay) in a population.

## INHOUD

Samenvatting	I
Summary	I
Inhoud	X
Deelrapport 1: Werkpakket 1	
Deelrapport 2: Werkpakket 2	

