

De bruikbaarheid van een 'in vitro'-test

Er lijkt een link te zijn tussen verschillende gezondheidseffecten en blootstelling aan deeltjes en stoffen uit het binnenmilieu. De mechanismen hierachter worden nog steeds niet volledig begrepen. Het 'in vitro'-testen is een alternatief voor het blootstellen van personen of dieren aan specifieke omgevingscondities in een labomgeving. Onder gecontroleerde condities wordt een bepaalde procedure buiten een levend organisme uitgevoerd. De bruikbaarheid hiervan is onderzocht met menselijke longcellen. De procedure voor het testen van de emissies van geurkaarsen, haarlak en spray heeft zowel tot reproduceerbare testcondities als reproduceerbare toxicologische resultaten geleid.

Dr.ir. P.M. (Philomena) Bluysen en dr.ir. I.L. (Ilse) Tuinman, TNO Delft

INLEIDING

Al meer dan dertig jaar toont onderzoek relaties aan tussen de aanwezigheid van deeltjes in de buitenlucht (PM) en toenemende gezondheidsproblemen [1]. Voor binnenluchtverontreiniging, in het bijzonder ultra fijne deeltjes, lijkt die link met gezondheid ook aanwezig [2]. Toxicologisch bewijs geeft echter aan dat andere aspecten van deeltjes dan massa (gewicht), waarop de huidige (buitenlucht)richtlijnen zijn gebaseerd, de toxiciteit bepalen [1].

Veel stoffen die binnenshuis worden gegenereerd zijn semivluchtig, zoals fthalaten, brandvertragers, polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAKs), chlorofenolen, pesticiden, organotinen en metalen. Deze stoffen kunnen adsorberen aan de in de lucht of huisstof aanwezige deeltjes en kunnen worden ingeademd of ingeslikt, afhankelijk van de grootte. Vijftig tot tachtig procent van binnen voorkomende ultrafijne deeltjes (UFP) wordt ook binnen geproduceerd [2] door het gebruik van kook- en verwarmingstoestellen,

in sigarettenrook, door brandende kaarsen, stofzuigen en andere huishoudelijke activiteiten.

In de lucht voorkomende deeltjes kunnen dus verschillen in chemische samenstelling, afhankelijk van de bron. Daarnaast produceren de meeste bronnen ook gassen. Semivluchtige organische stoffen (SVOS), anorganische stoffen, maar ook niet gebonden vluchtige organische stoffen (VOS) kunnen de gezondheid schaden [3]. Bovendien kunnen secundaire organische aerosolen (SOA), die ontstaan door chemische reacties, (e.g. ozon-terpeen reacties) de gezondheid negatief beïnvloeden [4].

Er is een behoefte aan een procedure of methode waarmee gezondheidseffecten als gevolg van blootstelling aan emissies van verschillende binnenluchtbronnen (inclusief ultrafijn stof) kunnen worden bepaald. Verscheidene technieken zijn beschikbaar voor het inschatten van gezondheidseffecten bij de mens als gevolg van blootstelling aan binnenluchtverontreinigingen. Men kan blootgestelde

personen onderzoeken in een epidemiologische of cohort studie. Of men kan personen of dieren blootstellen onder gecontroleerde condities in een laboratoriumomgeving. Dergelijke studies zijn echter schaars in gebruik, vooral vanwege ethische en financiële redenen. Het 'in vitro' testen kan als extra informatiebron worden gezien. Dit is een techniek waarbij een bepaalde procedure onder gecontroleerde condities buiten een levend organisme wordt uitgevoerd. Verscheidene 'in vitro'-testmethoden zijn beschikbaar. Deze methoden kunnen verschillen ten aanzien van het celtype dat wordt toegepast (menselijk of anders, primaire cellen of getransformeerde cellijnen, epitheelcellen of anders), de blootstellingmethode (suspensie van verzameld materiaal, blootstelling van conventionele cultures aan aerosolen of luchtvlloeistof interface blootstellingen) en de toxicologische bepaalde eindpunten (levensvatbaarheid van de cel of celdood, cytokine productie (ontsteking), oxidatieve stress, specifieke functie van een celtype) [5]. Met het commercieel beschikbare Cultex®-systeem

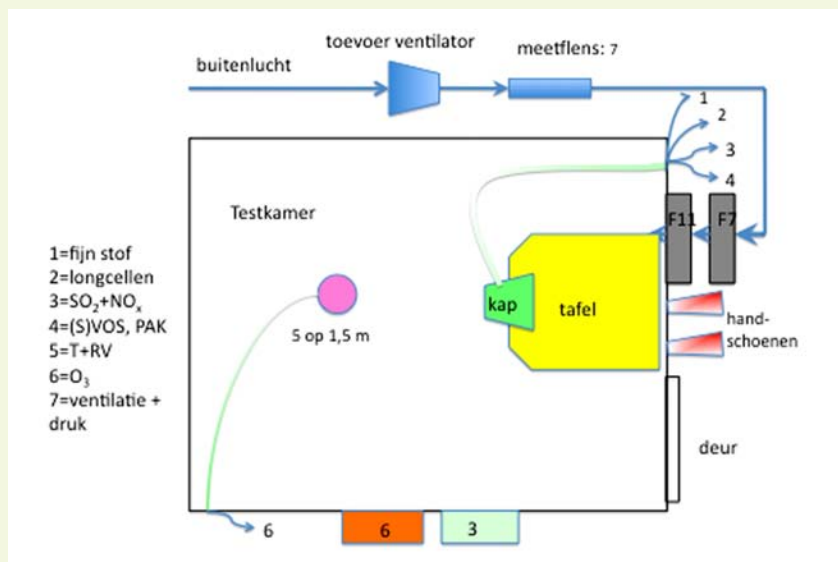
[6] is het mogelijk om gekweekte menselijke longcellen bloot te stellen aan een luchtstroom zonder interferentie van een medium, om zo 'in vivo' (werkelijke) blootstelling deels na te bootsen.

Het gebruik van het Cultex®-systeem voor het bestuderen van biologische effecten als gevolg van blootstelling aan emissies van verschillende binnenluchtbronnen lijkt veelbelovend. Het systeem laat directe beoordeling van de toxiciteit van complexe testmengsels toe die nauwelijks of geen verandering van de fysisch-chemische kenmerken hebben ondergaan. De doelstelling van de onderliggende studie was het bepalen van het potentieel van dit systeem. Dit om biologische effecten door binnenluchtbronnen te bestuderen, als essentiële stap naar het ultieme doel om gezondheidseffecten als gevolg van blootstelling aan binnenmilieuverontreinigingen te kunnen bepalen

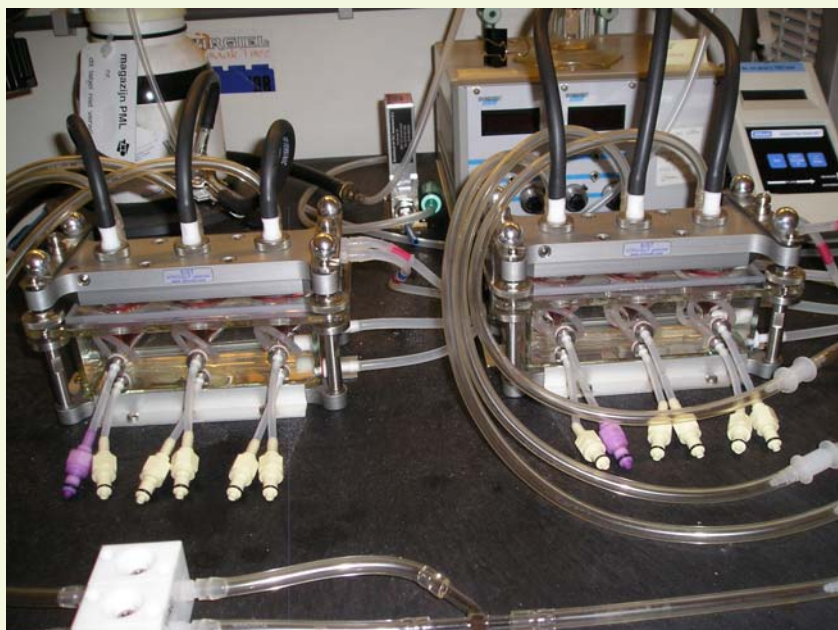
METHODEN

Test procedure

In een laboratoriumstudie zijn de emissies van verschillende bronnen (25 geurkaarsen: brandend (Kaarsen) (n=5) en niet-brandend (Nkaarsen) (n=3); en nanodeeltjes producerende sprays (haarlak (n=5) en spray om textiel en leer waterdicht te maken (verder spray genoemd) (n=4)) verscheidene malen getest (n = het aantal testen). De emissies werden geproduceerd in een klimaatkamer op overdruk (4m x 4m x 2,5m), waarvan de binnenwanden bekleed zijn met aluminiumfolie om emissies uit bouwmaterialen te voorkomen. De luchttoevoer naar de ruimte vond plaats via een opening in de wand, waarin een F7- en een F11-filter zijn geplaatst. De opening bevond zich op een hoogte van 2 m naast de toegangsdeur (zie figuur 1). Om de afstand tussen de bron en de meting zo kort mogelijk te houden is ervoor gekozen om de bronnen niet in het midden van de kamer te plaatsen maar dicht bij de wand waarachter de meetapparatuur geplaatst konden worden, inclusief de Cultex®-opstelling (figuur 2). Om te voorkomen dat bij het openen van de toegangsdeur andere verontreinigingen dan de te testen verontreinigingen naar binnen komen, werd tussen de luchttoevoeropening en de toegangsdeur een extra opening met ingebouwde handschoenen gecreëerd. Met deze ingebouwde handschoenen konden de kaarsen worden aangestoken of de sprays worden vernield zonder dat de ruimte betreedt hoeft te worden (zie figuren 3 en 4 op volgende pagina). De kaarsen werden op een tafel geplaatst en met behulp van een elektrische aansteker aangestoken. De sprays werden elke 10 minuten gedurende een minuut rechtstreeks in de afzuigkap gespoten.



-Figuur 1- Opstelling. Meetpunten 1, 2 en 4 zijn naast de wand van de kamer geplaatst, zo dicht mogelijk bij de aftakking van de kamer en de monsterneming



-Figuur 2- Het Cultex®-systeem



-Figuur 3- Aansteken van kaarsen met een elektrische aansteker



-Figuur 4- Sprayen

Component	Meet- en analyse methode	
(Ultra) fijn stof	Fijnstof (10 – 523 nm)	Scanning mobility particle sizer (SMPS)
Toxiciteitstesten	Toxiciteit humane longcellen	Cultex®: LDH, Alamar blue, RCDC en IL-8.
Gassen	Stikstofoxiden (NO _x) Zwavel dioxide (SO ₂) Ozon (O ₃)	Chemilumescence NO _x -analyzer Fluorescence SO ₂ -analyzer Photometric O ₃ -analyzer
Chemische stoffen	VOC PAK en derivaten	Monsternamen Tenax Monsternamen Berner impactor Analyse alle monsters: ATD GC-MS
Overige	Temperatuur [°C] Luchtvochtigheid [%] Ventilatiehoeveelheid [m ³ /h]	Thermometer Luchtvochtigheidsmeter Debietmeter

-Tabel 1- Overzicht van metingen en apparatuur

Geurkaarsen, haarlak en spray werden geselecteerd, omdat de emissies uit complexe mengsels van verontreinigingen bestaan, zoals UFP, SVOS, VOS en mogelijk SOA. Per type bron werden verschillende herhalings van dezelfde testomstandigheden uitgevoerd. Voor de proeven met kaarsen betrof de meetduur per proef 1,5 uur en voor de proeven met haarlak en spray was de meetduur 1 uur. Eén echte blanco situatie (lege kamer) werd getest.

Metingen en analyse

Tijdens de proeven werden temperatuur, relatieve vochtigheid, verschillende gassen (NO, NO₂, SO₂ en O₃) en fijn- en ultrafijne deeltjes gelogd of bemonsterd. Voor vier proeven met brandende kaarsen, één proef met niet brandende kaarsen en de enige blanco situatie (geen bronnen in de kamer aanwezig), werden VOS en PAK gemeten. Voor het bepalen van gezondheidseffecten bij de humane longcellen, is na het beëindigen van de experimenten een aantal toxicologische indicatoren bepaald: Interleukin-8 (IL-8) als maat voor ontsteking, Lactaat Dehydrogenase (LDH) en Alamar blue als maat voor celdood of levensvatbaarheid van de cel en RCDC Protein assay als indicator voor het aantal eiwitten, hetgeen ook iets zegt

over de levensvatbaarheid van de cel.

In tabel 1 staat een overzicht van de metingen en gebruikte meetapparatuur. Voor een uitgebreide beschrijving van deze apparatuur en voor een beschrijving van de analysemethoden van de genomen metingen, zie [7].

RESULTATEN EN DISCUSSIE

Reproduceerbaarheid

De standaard deviaties van de gemiddelde gemeten temperatuur, relatieve vochtigheid, NO_x, SO₂, O₃ en UFP laten zien dat de reproduceerbaarheid van de testcondities voor alle testsituaties goed was [7]. In tabel 2 wordt per testsituatie (nkaarsen, kaarsen, haarlak en spray) de gemiddelde uitkomst (percentageverschil ten opzichte van medische lucht), de standaard deviatie en de reproduceerbaarheid van de toxicologische indicatoren weergegeven. De blanco situatie bleek identiek aan de resultaten met de medische lucht (dus % verschil). De resultaten van de blootstellingen met emissies van kaarsen, haarlak en waterdichtmakende spray geven een reproduceerbaarheid (R) tussen 0,05 en 0,30 (waarbij R=0,01 is excellent en R>1 is zeer slecht). De niet brandende kaarsensituatie was niet zo reproduceerbaar als de andere situaties (reeks van

0,44 voor Alamar blue tot 1,66 voor LDH). De standaarddeviatie bij de enkelvoudige testen varieerde gemiddeld van 8,5% voor de testen met Alamar blue, tot 11,3% voor testen met LDH, 13,8% voor testen met RCDC en 15,1% voor testen met IL-8. Zowel de laagste als de hoogste standaarddeviatie bij de enkelvoudige testen werd gevonden bij de proeven met brandende kaarsen: respectievelijk 2,2% voor een Alamar blue test en 27,7% voor een RC-DC test. In andere studies is aangetoond dat deze standaard deviaties nog lager kunnen zijn onder nauwkeurig gecontroleerde omstandigheden [8].

Concentraties van gassen en deeltjes

Voor de proeven met brandende kaarsen, lagen de gemiddelde concentraties van NO₂ (379±24 ppb) en SO₂ (9±3 ppb) boven de door de WHO aanbevolen lange duur waarden van 40 µg/m³ (221 ppb) (jaarlijks gemiddelde) en 20 µg/m³ (8 ppb) (24-uur gemiddelde), respectievelijk. De concentraties NO₂ en SO₂ waren minder dan de door de WHO aanbevolen korte duur waarden van 200 µg/m³ (1106 ppb) en 500 µg/m³ (191 ppb), respectievelijk. Deze concentratieniveaus zouden een biologisch effect kunnen geven. Voor de proeven met de waterdichtmakende spray lag de gemiddelde concentratie van NO₂ en SO₂ (43±13 ppb en 2±1 ppb, respectievelijk) ruim beneden elke aanbevolen waarde. De gemiddelde SO₂-concentratie voor haarlak was nagenoeg nul. Zoals verwacht, veroorzaakte brandende kaarsen hogere concentraties NO_x en SO₂ dan de sprays.

De gemiddelde concentraties van O₃ voor de proeven met brandende kaarsen, haarlak en waterdichtmakende spray, respectievelijk 5±1, 3±0 and 4±2 ppb, verschilden niet significant van de blanco situatie (3 ppm). De proeven met niet brandende kaarsen gaven een iets hogere gemiddelde concentratie O₃ (12±2 ppb), maar nog steeds ruim beneden de aanbevolen WHO-waarde van 100 µg/m³ (196 ppb; dagelijks maximum 8-uur gemiddelde). Er werd geen effect van het sprayen op de O₃-concentratie gezien.

Figures 5 tot 7 laten respectievelijk de gemiddelde gemeten concentratie per deeltjes diameter voor de proeven met kaarsen, haarlak en waterdichtmakende spray zien. De geometrisch gemiddelde diameter van de deeltjes lag bij de kaarsverbranding rond de 29 nm, de haarlakverstuiving rond de 56 nm en de waterdichtmakende spray rond de 61 nm. De diameter van 29 nm voor de kaarsverbranding is indicatief voor een 'steady state' verbranding (geen rookvorming) met een monomodale verdeling, i.e. één piek. Het totale aantal deeltjes tijdens de haarlakverstuiving was een

factor 10 hoger dan bij de kaarsverbranding en zelfs een factor 20 hoger dan bij de waterdichtmakende spray. Het gemiddeld aantal deeltjes was respectievelijk $13,7 \cdot 10^4$, $156 \cdot 10^4$ and $74 \cdot 10^4$ per cm^3 voor kaarsen, haarlak en waterdichtmakende spray. Het aantal deeltjes afkomstig van brandende geurkaarsen is van dezelfde orde grootte als in de experimenten van Afshari et al. [9].

De resultaten van de gekwantificeerde VOC's en PAKs voor de proeven met brandende kaarsen waren consistent, zowel in samenstelling als in concentratieniveau. De gevonden concentraties waren laag maar lagen voor vrijwel alle componenten op een meetbaar niveau. Deeltjesgebonden stoffen waren zowel bij de verschillende deeltjesfracties bij de Berner impactor als bij de PAK/noPAK-metingen niet gevonden. De hoogste concentraties werden gemeten voor naftaleen.

UFP versus gezondheid

Er is gekeken of er een correlatie aangetoond kan worden tussen toxicologische gemeten indicatoren (Alamar blue, LDH, RCDC en IL-8) en deeltjesconcentratie. Daarnaast is er ook gekeken of er een correlatie aanwezig is tussen de toxicologische indicatoren en het totaal aantal deeltjes waaraan de longcellen zijn blootgesteld. In tabel 3, op de volgende pagina, staan deze correlaties gepresenteerd voor respectievelijk de enkelvoudige proeven en de gemiddelde uitkomsten van de verschillende blootstellingsituaties (nkaarsen, kaarsen, haarlak en spray). Alamar blue en IL-8 geven een redelijke correlatie voor de gemiddelde uitkomsten per blootstellings situatie, zowel met de gemiddelde concentratie van deeltjes als met het totaal aantal deeltjes waaraan de cellen zijn blootgesteld. RCDC geeft als enige een redelijke correlatie in de enkelvoudige vergelijking, waarbij elk experiment afzonderlijk is meegenomen.

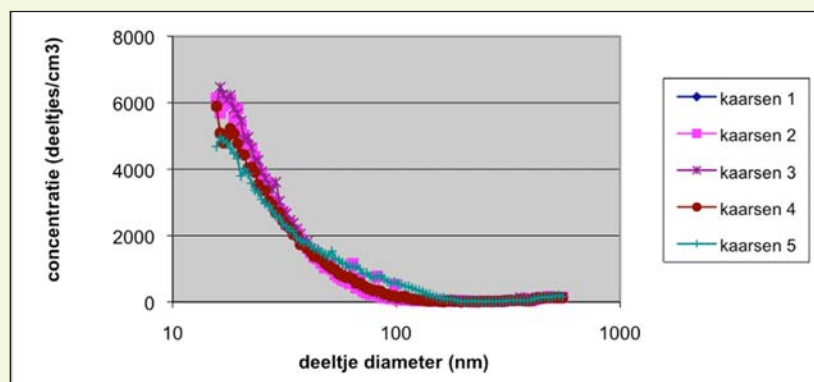
Voor de toxicologische indicatoren is verder bekeken in hoeverre de gemiddelde uitkomsten verschillende (onderscheidbare) resultaten opleveren voor de verschillende blootstellings situaties (nkaarsen, kaarsen, haarlak en spray). Hierbij is gekeken naar het 95% betrouwbaarheidsinterval (zie figuur 8 op de volgende pagina). De betrouwbaarheidsintervallen laten een relevant verschil zien tussen de afname van Alamar blue en RCDC voor de proeven met niet-brandende en brandende kaarsen, maar niet voor LDH en niet voor IL8.

CONCLUSIES EN VERVOLG

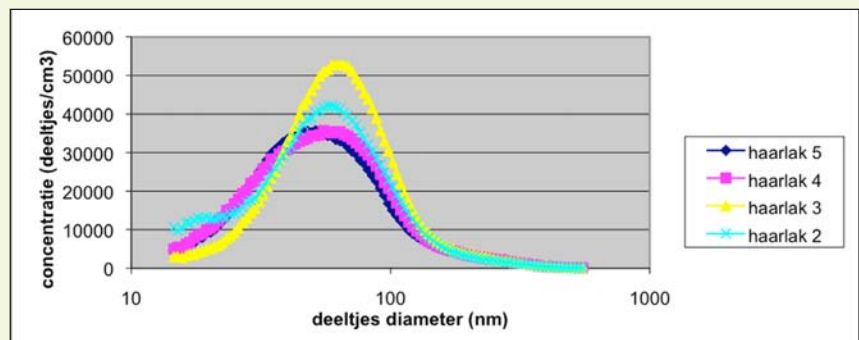
Uit de resultaten van de uitgevoerde proeven met het Cultex®-systeem kan worden gecon-

%	Nkaarsen (n=3)	Kaarsen (n=5)	Haarlak (n=5)	Spray (n=4)
IL-8 AV	6,5	24,1	26,0 ¹	13,6
SD	4,5	6,7	4,6	2,4
R	0,69	0,28	0,18	0,18
Alamar blue AV	-7,1	-20,4	-26,2	-20,3
SD	3,1	3,1	5,9	1,0
R	0,44	0,15	0,22	0,05
LDH AV	6,2	24,9	25,1	41,9
SD	10,3	4,0	7,6	9,0
R	1,66	0,16	0,30	0,21
RCDC AV	-2,3	-21,5	-21,0 ¹	-21,3
SD	3,4	4,3	19,8	4,8
R	1,48	0,20	0,94	0,22

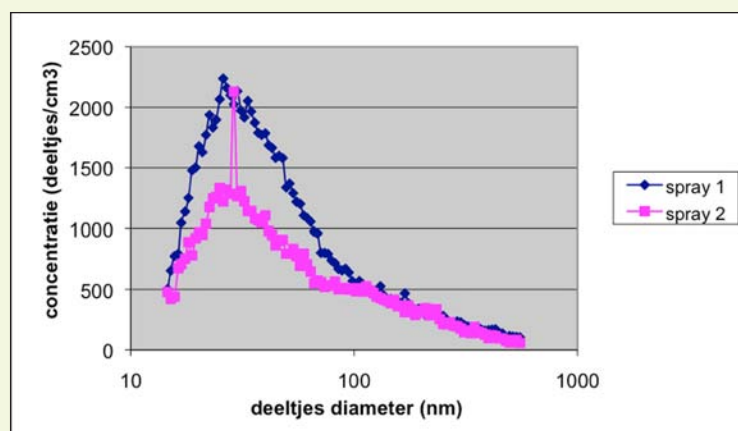
-Tabel 2- Gemiddelde (AV) uitkomst, de standaard deviatie (SD) en de reproduceerbaarheid (R) van de toxicologische indicatoren per testsituatie (1: n=4)



-Figuur 5- Gemiddelde gemeten aantal deeltjes per diameter per brandende kaarsenproef



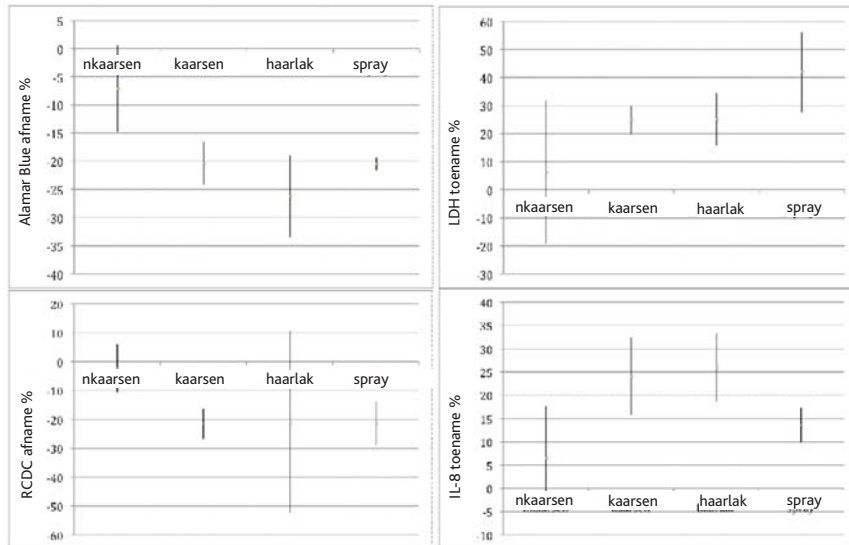
-Figuur 6- Gemiddelde gemeten aantal deeltjes per diameter per haarlakproef (tijdens de haarlak 1 proef zijn geen stofmetingen verricht)



-Figuur 7- Gemiddelde gemeten aantal deeltjes per diameter per sprayproef (voor sprayproef 3 en 4 zijn geen meetresultaten beschikbaar)

	Gemiddeld				Enkelvoudig			
	Alamar blue	LDH	RCDC	IL-8	Alamar blue	LDH	RCDC	IL-8
#deeltjes/m ³	0,46	0,005	0,14	0,45	0,11	0,00003	0,40	0,17
totaal #deeltjes	0,47	0,005	0,15	0,48	0,13	0,0002	0,43	0,19

-Tabel 3- Correlatie coëfficiënten tussen deeltjes concentraties en totaal aantal deeltjes voor afzonderlijke experimenten en voor gemiddelde uitkomsten per situatie met Alamar blue, LDH, RCDC en IL-8 uitkomsten



-Figuur 8- 95% betrouwbaarheidsinterval voor de proeven met kaarsen, haarlak en spray

cludeerd dat de procedure voor het testen van binnenmilieublootstellingen tot reproduceerbare testcondities en reproduceerbare toxicologische resultaten heeft geleid. Het onderscheidend vermogen van de methode in haar huidige vorm was echter beperkt. Het moet wel gezegd worden dat de concentraties tijdens de proeven hoger waren dan de te verwachten concentraties in 'real-life'-situaties. Normaliter wordt een dosis gerelateerde respons aangenomen. Maar, vooral bij zeer hoge concentraties zoals in deze studie, kan een respons op een hoge concentratie gedurende een korte tijd significant verschillen met een respons op een lagere concentratie gedurende een langere periode als gevolg van een sterke eerste reactie zonder de kans op afvoer of herstel. Deze hoge doses zijn gekozen om een reactie van de cellen tijdens de relatief korte blootstellingduur van 1 uur voor de sprays en 90 minuten voor de kaarsen te garanderen. Of het mogelijk is om de blootstellingduur te verlengen naar bijvoorbeeld 8 uur moet worden onderzocht. Andere parameters zoals luchtstroom, luchtverdeling over de cellen (luchtsnelheid) en vochtigheid van de verontreinigde lucht zijn dan belangrijk om mee te nemen. Het is niet onwaarschijnlijk dat een ander blootstelsysteem nodig is. Andere systemen, gebaseerd op vergelijkbare 'in vitro'-modellen of andere modellen, zijn reeds ontwikkeld of in ontwikkeling [10]. Ook al werden de concentraties en blootstellingduur per testsituatie constant gehouden, toch werd bevestigd, zoals in eerdere studies

is aangetoond, dat UFP hoogstwaarschijnlijk een belangrijke indicator is maar zeker niet de enige reden van de waargenomen biologische effecten. Het hoogst aantal deeltjes werd waargenomen bij haarlakverstuiving (een factor 10 hoger dan tijdens kaarsenverbranding en zelfs een factor 20 hoger dan bij de waterdichtmakende spray). Dit verschil is echter niet waarneembaar bij de resultaten van de gemeten toxicologische indicatoren. Het lijkt erop dat andere stoffen dan UFP een rol spelen bij de waargenomen effecten. De reden kan mogelijk worden gevonden in de samenstelling van de deeltjesgebonden stoffen (die niet zijn gevonden bij de kaarsenproeven) of in het gecombineerde effect van gasen en vluchtige organische stoffen. Het 'in vitro' testen draagt zeker bij aan het beter begrijpen van de achterliggende mechanismen en oorzaken van gezondheidseffecten als gevolg van blootstelling aan 'real-life' complexe mengsels veroorzaakt door bronnen zoals brandende kaarsen en het gebruik van spuitbussen. Meer proeven met verschillende indicatoren, verschillende concentraties en blootstellingduur zijn echter nodig. Combinaties van verschillende cellen en gezondheidseindpunten kunnen tot beter bruikbare informatie leiden.

■ REFERENTIES

1. WHO, 2007. Health relevance of particulate matter from various sources, Report on a WHO Workshop, Bonn, Germany, 26-27 March 2007, EUR/07/5067587.

2. Weichenthal S., Dufresne A., Infante-Rivard C. and Joseph L. 2007. Indoor ultrafine particle exposures and home heating systems: A cross-sectional survey of Canadian homes during the winter months. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 17 (3): 288-297.
3. Henvinet 2009. Policy briefs: 'Expert elicitation on health implications of decaBDE', 'Expert elicitation on health implications of HBCD', 'Expert elicitation on health implications of phthalates', and 'Expert elicitation on neurodevelopmental implications of CPF', www.henvinet.eu.
4. Weschler C.J., Wells J.R., Poppendieck D., Hubbard H., Pearce T.A. 2006. Workgroup report: Indoor chemistry and health, *Environmental Health Perspectives*, 114, 442-446.
5. Seagrave J., McDonald J.D. and Mauderly, J.L. 2005. In vitro versus in vivo exposure to combustion emissions, *Exp Toxicol Pathol* 57 Suppl 1, 233-8.
6. Aufderheide M. 2008. An efficient approach to study the toxicological effects of complex mixtures. *Exp Toxicol Pathol*. Jun;60 (2-3): 163-80.
7. Bluysen P.M., Tuinman I.L., Alblas M.J., Bree J.E. van de, Houtzager M., Kooter I., 2011. In-vitro exposure of human lung cells to emissions of several indoor air sources created in a climate chamber. Submitted.
8. Pariselli F., Sacco M.G., Rembges D. 2009. An optimized method for in vitro exposure of human derived lung cells to volatile chemicals. *Exp Toxicol Pathol.*, 61(1): 33-9.
9. Afshari A., Matson U. and Ekberg L.E.: Characterization of indoor sources of fine and ultrafine particles: a study conducted in a full-scale chamber. *Indoor Air* 2005; 15 (2): 141-150.
10. Bérubé, K., Aufderheide, M., Breheny, D., Clothier, R., Combes, R., Duffin, R., et al. 2009. In vitro models of inhalation toxicity and disease, The report of the Frame workshop, ATLA 37, 89-141.

■ DANKBETUIGING

Het gerapporteerde onderzoek is uitgevoerd onder het vraaggestuurde programma Kwaliteit leefomgeving van TNO en met medewerking van Marcel Alblas, Jolet van de Bree, Marc Houtzager en Ingeborg Kooter van TNO.