



Doctoral Thesis

Physical and chemical interactions of nanoparticles with human cells and in sewage treatment plants

Author(s):

Limbach, Ludwig K.

Publication Date:

2008

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005724240> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 18061

**Physical and chemical interactions of nanoparticles with
human cells and in sewage treatment plants**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

presented by

LUDWIG KORBINIAN LIMBACH

Dipl. Chem.-Ing. ETH

born on August 22nd 1981

citizen of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. W. J. Stark, examiner

Prof. Dr. D. Günther, co-examiner

Prof. Dr. P. Gehr, co-examiner

Zürich, 2008

Zusammenfassung

Vor ungefähr 20 Jahren wurde der Begriff Nanotechnologie ins Leben gerufen, durch die Entdeckung des Rastertunnelmikroskops wurde der Grössenbereich zwischen 1 und 100 Nanometern für Forscher sichtbar und bekam eine eigene Bezeichnung. Seitdem konnte der Begriff Nanotechnologie aufgrund seiner Vielfältigkeit nicht genau definiert werden. „Nano“, die einstige Grössenbezeichnung für 10^{-9} , hielt als thematischer Überbegriff Einzug in nahezu alle Forschungsgebiete; seien es Ingenieurwissenschaften, Chemie, Physik, oder auch Medizin und Biologie. Tatsache ist, dass immer mehr Leute ihre wissenschaftliche Arbeit unter diesem Begriff einordnen und dass grosse finanzielle, medizinische und gesellschaftliche Erwartungen mit diesem Begriff in Verbindung gebracht werden. Seit Anfang dieses Jahrhunderts mehren sich kritische Stimmen, welche neben dem Unterstreichen der Möglichkeiten auch vor allfälligen Risiken warnen. Diese Risiken werden vor allem mit künstlich hergestellten Nanomaterialien verbunden, einem Untergebiet der Nanotechnologie.

Die vorgelegte Doktorarbeit untersucht den Einfluss von Nanopartikeln, einer Unterklasse der Nanomaterialien, auf Zellen und Bakterien und legt damit einen Grundstein zur nachhaltigen Weiterentwicklung von Nanopartikeln.

Kapitel 1 gibt eine allgemeine Einführung in das Risikoverständnis für neue Technologien, insbesondere für die Nanotechnologie. Für gesellschaftlichen und damit wirtschaftlichen Erfolg der Nanotechnologie ist die Risikobereitschaft der Gesellschaft von grösster Bedeutung. Wie am Beispiel der Gentechnologie klar wurde, reicht Fortschritt allein nicht aus, wenn er von der Gesellschaft nicht akzeptiert wird. Am Übergang vom Grössenmassstab der Moleküle zu den Materialien ergeben sich für Nanopartikel völlig neue Materialeigenschaften. Gold, als inertes Material, wird zum Beispiel als 5 Nanometer kleines Partikel plötzlich chemisch aktiv. Der Einfluss dieser neuen Eigenschaften auf Zellen wird anhand von aktuellen wissenschaftlichen Studien beleuchtet. So können hydrophile Nanopartikel im Gegensatz zu hydrophilen Chemikalien nahezu ungehindert in Zellen eindringen. Auswirkungen dieser Aufnahme werden in den Folgekapiteln untersucht.

Kapitel 2 beschäftigt sich mit der Entstehung von reaktiven Sauerstoff-Radikalen in menschlichen Lungenzellen als Folge der Aufnahme von Nanopartikeln. Diese Radikale, auch oxidativer Stress genannt, entstehen ebenfalls während der normalen Zellatmung. Durch Strahlung oder durch katalytisch aktive Verunreinigungen erhöht sich die Menge an Radikalen in den Zellen. Dies kann durch Oxidation der DNS zu einer erhöhten Eintrittswahrscheinlichkeit von Krebs führen oder zu anderen intrazellulären Schäden durch die Oxidation von Proteinen oder Fetten. Manganoxid-, Kobaltoxid-, Eisenoxid- und Titanoxid-Nanopartikel wurden auf ihre intrazelluläre Radikalentstehung untersucht. Der oxidative Stress ausgehend von den Nanopartikeln wurde zusätzlich mit der Reaktion der entsprechenden Menge an gelösten Metallionen verglichen. Um die genauere Entstehungsweise der Radikale zu ergründen, wurden zusätzlich Siliziumoxid-Nanopartikel mit unterschiedlichen Mengen dieser Nebengruppenelemente dotiert. Dank der Flammensynthese konnte ein Set an Partikeln hergestellt werden, welche untereinander zwar ähnliche physikalische Eigenschaften (Grösse und Form) besitzen, aber eine unterschiedliche chemische Zusammensetzung aufweisen. Die Ergebnisse der Experimente zeigten, dass die Sauerstoffradikale direkt an der Oberfläche der Nanopartikel entstehen. Durch den direkten Vergleich der Nanopartikel zur gleich konzentrierten Salzlösungen, konnte gezeigt werden, dass Nanopartikel Ionen in Zellen bringen können. Dies wurde als „nano-Trojan-horse“ Mechanismus (trojanisches Pferd) beschrieben, dem hölzernen Pferd der griechischen Mythologie nachempfunden.

In Kapitel 3 werden die möglichen Langzeitfolgen diskutiert, die von Nanomaterialien ausgehen. Hauptproblem ist, dass Langzeitfolgen erst durch zeitaufwändige Experimente gezeigt werden können. Aus wirtschaftlichen Gründen ist es interessanter möglichst früh über mögliche Langzeitschäden Bescheid zu wissen. Eine Klassifizierung bezüglich der möglichen Langzeitfolgen basiert auf bereits jetzt verfügbaren physikalischen und chemischen Daten. Hauptparameter ist die Beständigkeit (Persistenz) der Partikel in biologischen Medien. Unglücklicherweise konnten in der jüngeren Geschichte einige Fehlentwicklungen nicht mit bestehenden toxikologischen Untersuchungen vorhersagt werden können. Beispielsweise wurde Asbest von allen Seiten lange als nicht akut toxisches Material gepriesen, bis sich herausstellte, dass die nicht abbaubaren Fasern in der Lunge zu Entzündungen und Krebs führten. Dichlor-Diphenyl-Trichlorethan, kurz DDT, wurde als Insektizid mit vergleichsweise geringer akuter Toxizität für Säugetiere verwendet. Später entdeckte man, dass sich DDT

nicht abbaute und entlang der Nahrungskette ansammelte. Auch die Fluorkohlenwasserstoffe (FCKW) wurden dank ihrer geringen Toxizität und ihrer idealen Eigenschaften für Wärmetauscher eingesetzt. Leider stellte sich später heraus, dass wenn diese Gase in der Atmosphäre ankommen, die Ozonschicht angreifen. Abgeleitet von diesen Erkenntnissen wird eine Klassifizierung vorgeschlagen, welche parallel zu den bisherigen toxikologischen Untersuchungen, das Risiko für Langzeitschäden ausgehend von Nanopartikeln verkleinern soll.

Kapitel 4 beschäftigt sich mit einem Nebeneffekt der Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen. Es wird untersucht, ob Moleküle, adsorbiert auf Nanopartikeln, über diesen Weg in die Zelle gelangen können. Die Zellmembran von menschlichen Zellen ist eine Barriere für Salze und Moleküle. Durch aktive Mechanismen haben es die Zellen geschafft, nützliche Moleküle in die Zelle aufzunehmen während schädlichen Molekülen der Zugang meistens verwehrt bleibt. Nanopartikel hingegen werden schnell und effizient von Zellen aufgenommen, bisherige Mechanismen können diese Aufnahme bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht erklären. Zusätzlich haben die Nanopartikel durch ihre Geometrie eine grosse spezifische Oberfläche. Eine Adsorption von Molekülen auf dieser grossen Oberfläche, erleichtert den Zugang in Zellen durch deren Zellmembran. Um diesen Effekt zu untersuchen wurde ein Zellkulturmodell gewählt, das die Auswirkung von zwei gängigen Giften bei der Ko-Applikation von Nanopartikeln untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Industrieruss (Carbon black) zusammen mit dem Gift Paclitaxel eine stärkere toxische Wirkung auf Zellen aufweist als die Zugabe des Giftes alleine. Die hydrophilen Nanomaterialien Ceriumdioxid und Siliziumdioxid interagieren ebenfalls mit Molekülen, wie anhand von der Adsorption von Farbstoffen bewiesen werden konnte. Allerdings schwächen sich diese Interaktionen bei physiologischen Salzkonzentrationen ab, deshalb konnte im Zellkulturmodell kein verstärkt toxischer Einfluss dieser Nanopartikel gefunden werden.

Kapitel 5 beschreibt das Verhalten von Nanopartikeln in einer Kläranlage. Die Entsorgung der exponentiell wachsenden Menge an Nanopartikeln wurde bisher wenig untersucht. Es ist bekannt, dass Nanopartikel problemlos durch Filter aus der Luft abgetrennt werden können. In wässrigen Suspensionen verwendet man Zentrifugen um Nanopartikel abzutrennen. Dieser Prozess ist für Kläranlagen nicht durchführbar, deshalb wurde anhand einer Pilotanlage (6 Liter) untersucht, inwiefern Nanopartikel durch eine Kläranlage

abgetrennt werden können. Es wurden Ceriumdioxid-Nanopartikel eingesetzt, welche heute zum Schleifen von Computerchips verwendet werden. Um zu untersuchen wie diese Partikel in einer Kläranlage verhalten, wurde die Oberfläche der Ceriumdioxid-Nanopartikel jeweils mit einem bioabbaubaren und einem persistenten Tensid bedeckt. Diese Tenside verhindern eine Agglomeration der Partikel bei erhöhter Ionenstärke oder verändertem pH. Erstaunlicherweise konnten bereits unstabilierte Nanopartikel die Model-Kläranlage verlassen. Untersuchungen der Oberflächenladung ergaben, dass Peptide, Bruchteile von Proteinen, auf die Partikel adsorbierten und diese dadurch stabilisierten. Der Grossteil der Partikel (> 90%) verblieb in der Kläranlage. Theoretische Berechnungen und Elektronenmikroskopie-Bildern zur Folge adsorbieren die zurückgebliebenen Partikel an den Bakterien des Klärschlammes. Weitere Folgeuntersuchungen müssen nun zeigen, ob die Effekte auch in realen Kläranlagen zu beobachten sind. Grösste Beachtung sollte die Entsorgung des überschüssigen, möglicherweise kontaminierten, Klärschlammes finden.

Kapitel 6 fasst die Ergebnisse der Arbeit generell zusammen und zeigt einen Ausblick über mögliche weitere, aufbauende Forschungsansätze.

Summary

The term nanotechnology was introduced 20 years ago. With the discovery of the scanning tunneling microscope, the size range from 1 to 100 nanometers became visible for scientists and got its own notation. Since that time, the term nanotechnology could not be defined properly because of its diversity. “Nano” - the former labeling for 10^{-9} – entered as thematic umbrella term in nearly all scientific realms; engineering, chemistry, physics, biology and medicine. It is a fact that an increasing number of scientists declare their own work as nanotechnology and that financial, medical, and social expectations are related to this term. Since eight years critical voices are increasing that highlight possible risks behind all opportunities. These voices are mainly related to nanomaterials, a sub-area of nanotechnology.

The here presented thesis investigates the influence of nanoparticles, a sub-area of nanomaterials, on cells and bacteria, and places a basis for a sustainable developments of nanomaterials.

Chapter 1 introduces generally the risk tolerance for new technologies by focusing on nanotechnology. The risk tolerance of the society is crucial for the commercial success of nanotechnology. Sole progress is not sufficient when it is not accepted by the society, as shown by the biotechnology in Europe. Nanomaterials have new properties because of their size at the interface between organic chemicals and materials. For example gold is known as an inert material, but in the size range of five nanometer, gold nanoparticles become chemically active. The influence of these new properties on cells is presented based on current publications. Hydrophilic nanoparticles are easily taken up by cells in contrary to hydrophilic chemicals. Effects of this uptake are investigated within the following chapters.

Chapter 2 investigates the generation of reactive oxygen species (ROS, radicals) in human epithelial lung cells exposed to nanoparticles. These radicals occur also as a byproduct of the cell respiration. The amount of ROS in cells increases by additional irradiation or catalytically active contaminations. This leads to an increased probability of cancer, through oxidation of the DNA; or leads to other cellular damage by oxidation of proteins or lipids. Manganese oxide, cobalt oxide, iron oxide and titania nanoparticles were investigated for their ability of ROS generation in cells and ex vitro. In order to gain information about the

intracellular behavior the nanoparticles were compared to equal amounts of metal ions. The results showed that reactive oxygen species were generated on the surface of the particles. Comparison to metal ion solutions, showed that nanoparticles could dissolve intracellularly and transport by these way ions in cells by a “nano Trojan-horse” mechanisms.

Chapter 3 discusses the possible long-term effects resulting from nanoparticles exposure. The main problem is the difficulty to experimentally prove long-term effects. The knowledge on long term effects is important at an early stage for economic and safty reasons. Unfortunately, it was not possible to avoid erroneous trends with current toxicological assays during the past decades. For example, asbestos was known as not acute toxic material until one recognized that the non-degrading fibers generate inflammation and cancer in the lung. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) was used as an insecticide known for its harmlessness for mammalian. Later on, it was found that DDT was not degraded and has been accumulated in the food chain. Also chlorofluorocarbons (CFC) were used because of their low toxicity and their ideal properties as heat exchangers. However, these persistent gases have destroyed the ozone layer in the atmosphere. Derived from these findings, we propose a classification of nanomaterials based on their ability to generate long term effects parallel to ongoing toxicological studies. Main parameter is the persistence of the nanoparticles in biological media.

Chapter 4 deals with a side effect of the uptake of nanoparticles in cells. It is investigated whether molecules, adsorbed on nanoparticles, can enter by this way into cells. The cellular membrane of human cells is a barrier for salts and molecules. Cells managed it to incorporate valuable molecules by an active process whereas for harmful molecules the access is mostly denied. Nanoparticles are taken up by human cells fast and efficient by a yet not understood mechanism. Additional nanoparticles have a high specific surface thanks to their geometry. Adsorption of molecules on this surface would facilitate the access into human cells through their membrane. This effect was investigated on a cell culture model exposed to nanoparticles together with toxins. It was shown that carbon black together with the toxin paclitaxel has a stronger toxic effect on cells compared to the single exposure of the toxin. Experiments with dyes showed that the hydrophilic nanoparticles ceria and silica interact with molecules too. However, this interaction weakens at physiological salt concentration and therefore no increased toxic effect of ceria and silica was measured in the cell culture model.

Chapter 5 describes the behavior of nanoparticles in a sewage plant. Until today, the removal of nanomaterials is only poorly investigated compared to the exponentially increased amount of produced nanomaterials. It is known that nanoparticles can easily be separated by filters from the air. Suspensions of nanoparticles in water are separated mainly through centrifugation. This process is not suitable for waste-water treatment plants, therefore the clearing efficiency of an pilot-scale sewage plant (6 liter) was investigated for the case of cerium oxide nanoparticles. These nanoparticles are used nowadays in tonne quantities for e.g. grinding of silicon wafers. In order to vary the suspension stability of ceria nanoparticles, they were dispersed additionally with either a degradable or a not-degradable tenside (stabilization agent). The tensides inhibit the aggregation of particles by increasing ionic strength or by changing pH. Surprisingly, the unstabilized nanoparticles – similar as the stabilized ones - left the experimental setup at concentrations of up to 6 wt%. Investigation on the particles surface showed that peptides, digested proteins, adsorbed on the surface and stabilized therefore the particles dispersion. The main part of the particles (> 90%) stayed within the setup. These particles adsorbed partially on the bacteria as electron micrographs and theoretical calculations showed. Additional investigations have to be conducted to show if these effects are also observable in real sewage plants. Main attention should be paid on the removal of the clearing sludge.

Chapter 6 concludes the investigations of the thesis and gives an outlook for further investigations.