

## *In Vitro Evaluation of Cytotoxic Effects of Nickel Oxide Nanoparticles on Human Neuroblastoma Cell Line (SH-SY5Y)*

Mozhdeh Hajimohammadjafar Tehrani<sup>1</sup> , Mojtaba Falahati<sup>2</sup> , Mahsa Ale-Ebrahim<sup>3\*</sup> ,  
Shahram Zarabiyani<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

<sup>2</sup> Department of Nanotechnology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

<sup>3</sup> Department of Physiology, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

**\*Corresponding Author:**

**Mahsa Ale-Ebrahim;**  
Department of Physiology,  
Faculty of Medicine, Tehran  
Medical Sciences, Islamic  
Azad University, Tehran,  
Iran.

Email:  
mahsa.alebrahim@yahoo.com,  
aleebrahimmahsa@gmail.com

Received: 23 Apr, 2020

Accepted: 14 Feb, 2021

### **Abstract**

**Background and Objectives:** Despite the many applications of nickel oxide nanoparticles (NiO NPs) in industry and biomedicine, limited studies have been performed in the case of the cytotoxicity of these nanoparticles on nervous system yet. In many neurobiological studies, the human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) which have the ability to become adult human neurons have been used. The aim of the present study was to evaluate the cytotoxicity effects of nickel oxide nanoparticles on human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) in vitro.

**Methods:** The effect of different doses of NiO NPs (0, 1, 10, 20, 50, 100 µg/ml) on SH-SY5Y cell line was determined by MTT, lactate dehydrogenase (LDH), and caspase-3 activity tests. Statistical analysis was performed by using SPSS software and student t-test.





**Results:** Based on the results of MTT test, the viability rate of SH-SY5Y cells were decreased dose dependently after 24 hours treatment with NiO NPs, compared with control group. While there was no significant increase in levels of LDH enzyme compared with control group. The activity of caspase-3 enzyme was also significantly increased in a dose dependent pattern of nanoparticles.

**Conclusion:** The results of the present study showed that the Nickel oxide nanoparticles do not cause membrane damage in SH-SY5Y cells. While these nanoparticles induce their toxic effects by damaging the mitochondrial membrane, increasing the caspase 3 activity, and activating the apoptotic pathway.

**Keywords:** Apoptosis; Caspase 3; Cytotoxicity; L-Lactate Dehydrogenase; Nanoparticles; Nickel monoxide.

DOI: 10.29252/qums.14.11.20

## ارزیابی اثرات سمیت سلولی نانوذرات اکسید نیکل بر رده سلولی نوروبلاستوم انسانی *In vitro* در شرایط (SH-SY5Y)

مژده حاجی محمد جعفر تهرانی<sup>۱</sup> , مجتبی فلاحتی<sup>۲</sup> , مهسا آل ابراهیم<sup>۳\*</sup> , شهرام ضرابیان<sup>۱</sup> 

### چکیده

**زمینه و هدف:** با وجود کاربردهای فراوان نانوذرات اکسید نیکل در صنعت و زیست پزشکی، تاکنون مطالعات محدودی در مورد سمیت این نانوذرات در سیستم عصبی انجام شده است. در بسیاری از مطالعات نوروبیولوژیکی از سلول‌های نوروبلاستوم انسانی (SH-SY5Y) که توانایی تبدیل شدن به نورون‌های بالغ انسانی را دارند، استفاده می‌شود. در این راستا، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات سمیت سلولی نانوذرات اکسید نیکل بر رده سلولی نوروبلاستوم انسانی (SH-SY5Y) در شرایط *In vitro* انجام شد.

**روش بررسی:** اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید نیکل (۰، ۱، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر رده سلول‌های SH-SY5Y با استفاده از آزمون‌های زنده‌مانی سلول MTT و لاکتات دهیدروژناز (LDH: Lactate dehydrogenase) و نیز با ارزیابی فعالیت کاسپاز ۳ تعیین گردید. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 23 و آزمون t انجام شد.

**یافته‌ها:** براساس نتایج آزمون MTT، میزان زنده‌مانی سلول‌های SH-SY5Y پس از ۲۴ ساعت تیمار با نانوذرات اکسید نیکل در مقایسه با گروه کنترل به صورت وابسته به غلظت کاهش یافت؛ در حالی که افزایش معناداری در میزان آنزیم لاکتات دهیدروژناز در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد. بر مبنای نتایج، فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ به طور معناداری در یک الگوی وابسته به غلظت نانوذرات افزایش یافت.

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان دادند که نانوذرات اکسید نیکل باعث بروز آسیب غشایی در سلول‌های SH-SY5Y و ایجاد نکروز نمی‌گردند؛ بلکه این نانوذرات اثرات سمی خود را از طریق ایجاد آسیب در غشای میتوکندریایی، افزایش فعالیت کاسپاز ۳ و فعال شدن مسیر آپوپتوز القا می‌نمایند.

**کلیدواژه‌ها:** آپوپتوز؛ سمیت سلولی؛ کاسپاز ۳؛ لاکتات دهیدروژناز؛ نانوذرات اکسید نیکل؛ نانوذرات‌ها.

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

<sup>۲</sup> گروه نانو تکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

<sup>۳</sup> گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

\* نویسنده مسئول مکاتبات:

مهسا آل ابراهیم؛ گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:  
mahsa.alebrahim@yahoo.com,  
aleebrahimmahsa@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۶

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Hajimohammadjafar Tehrania M, Falahati M, Ale-Ebrahim M, Zarabiyani S. In Vitro Evaluation of Cytotoxic Effects of Nickel Oxide Nanoparticles on Human Neuroblastoma Cell Line (SH-SY5Y). Qom Univ Med Sci J 2021;14(11):20-29.

[Full Text in Persian]

ژنتیکی و یا بروز جهش را ایجاد نماید (۸،۹). نتایج مطالعات پیشین حاکی از آن هستند که نانوذرات معدنی نیکل می‌تواند سبب بروز استرس اکسیداتیو در محیط‌های *in vitro* شود (۱۰-۱۲). ارزیابی اثر سمیت نانوذرات اکسید نیکل بر سیستم تنفسی پستانداران نیز نشان داده است که این ترکیبات می‌توانند باعث القای استرس اکسیداتیو و بروز التهاب در سلول‌های اپیتلیالی ریه‌ها شوند (۱۳). نانوذرات اکسید نیکل به شکل معناداری میزان آنزیم مالون‌دی‌آلدئید (MDA: Malondialdehyde) که شاخص استرس اکسیداتیو است را افزایش می‌دهند. این نانوذرات می‌توانند از طریق سیستم تنفسی به سیستم عصبی مرکزی منتقل شوند. همچنین می‌توانند از دستگاه گوارش به سیستم گردش خون رسیده و به اندام‌هایی مانند کلیه، کبد و مغز آسیب رسانند (۱۴).

استفاده از مدل‌های *in vitro* تأثیر به‌سزایی بر پیشرفت نوروبیولوژی و علوم عصب‌شناسی دارد. در اکثر مدل‌های کشت سلول از نورون‌های اولیه مشتق شده از موش‌ها و یا رده‌های سلولی شبه نوروبلاست انسانی استفاده می‌شود (۱۵). سلول‌های شبه نوروبلاست انسانی SH-SY5Y، یک کلونی از رده سلولی والد خود (SK-N-SH) هستند که می‌توانند با پشت سر گذاشتن مکانیسم‌های مختلف از حالت شبه نوروبلاست به نورون‌های بالغ انسانی تمایز یابند. با به‌کارگیری روش‌های مختلف می‌توان رده سلولی SH-SY5Y را به انواع زیرمجموعه نورون‌های آدرنژیک، کولینرژیک و دوپامینرژیک تمایز داد. این ویژگی باعث استفاده از این رده سلولی در پژوهش‌های مختلف نوروبیولوژیکی شده است (۱۶). این سلول‌ها در حالت تمایز نیافته به سرعت و به صورت خوشه‌ای تقسیم می‌شوند (۱۵،۱۶). از آنجایی که نورون‌های بالغ قابلیت تقسیم ندارند، سلول‌های شبه نوروبلاستی در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند. با توجه به مطالب بیان شده، هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثر سمیت نانوذرات اکسید نیکل بر رده سلولی نوروبلاستوم انسانی (SH-SY5Y) تحت شرایط *in vitro* بود.

## روش بررسی

**آزمون پراکندگی نور دینامیکی (DLS: Dynamic Light Scattering)**

پایداری کلئیدی نانوذرات را می‌توان از طریق شعاع

در سال‌های اخیر استفاده از نانوذرات در صنعت و پزشکی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. با افزایش کاربرد نانوذرات و حضور بیشتر این ترکیبات در محیط، ارتباط معناداری بین استفاده از آن‌ها و بروز برخی از بیماری‌ها ایجاد شده است. در حال حاضر دانش ما در ارتباط با سازگاری زیستی این ذرات و خطرات ناشی از در معرض آن‌ها قرار گرفتن، محدود می‌باشد. نانوذرات به دلیل اندازه کوچک و نسبت سطح به حجم بالایی که دارند می‌توانند با پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و حتی متابولیت‌های سلولی برهمکنش دهند؛ از این رو بررسی سمیت نانوذرات و درک مکانیسم‌های مولکولی برهمکنش آن‌ها با سیستم‌های زیستی، بسیار حائز اهمیت می‌باشد. یکی از موضوعات بسیار مهم در بحث سمیت نانوذرات، ارزیابی اثرات این ترکیبات بر سیستم عصبی است؛ زیرا چنانچه نانوذرات سبب تخریب سلول‌ها و پروتئین‌های مغزی شوند می‌توانند در ایجاد آلزایمر، پارکینسون و سایر بیماری‌های عصبی نقش داشته باشند (۱).

نانوذرات اکسید نیکل در صنعت در تولید کاتالیزورها، حسگرهای گاز، فیلم‌های الکتروکرومی و نیز به عنوان جاذب در صنعت رنگ‌بری در سلول‌های خورشیدی و دیودهای تابشی مورد استفاده قرار می‌گیرند. همچنین از نانوذرات اکسید نیکل در تولید طعم‌دهنده‌ها و رنگ‌دهنده‌های صنایع غذایی، مکمل‌های آرایشی-بهداشتی و همچنین در پزشکی در امر تشخیص و درمان برخی از بیماری‌ها استفاده می‌شود (۲-۴). با وجود کاربردهای فراوان نانوذرات اکسید نیکل، اطلاعات محدودی در مورد سمیت آن‌ها در سطح سلولی و مولکولی وجود دارد. مطالعات پیشین اثرات سمی نانوذرات اکسید نیکل در باکتری‌ها و میکرو جلبک‌ها را گزارش نموده‌اند (۵،۶). Hori و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که نانوذرات اکسید نیکل، توانایی القای استرس اکسیداتیو و ایجاد آسیب در سلول‌های ریوی را دارند (۷). در برخی از مطالعات نیز پیشنهاد شده است که تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS: Reactive Oxygen Species) و در نتیجه ایجاد استرس اکسیداتیو، یکی از مکانیسم‌های احتمالی ایجاد سمیت توسط این نانوذرات است (۸). ROS با ایجاد آسیب DNA (Deoxyribonucleic acid) می‌تواند اثرات سمیت سلولی، سمیت

## Archive of SID

گردید. سپس درصد بقای سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT بررسی شد. برای تهیه استوک MTT، ۵ میلی‌گرم از این ترکیب در ۱ میلی‌لیتر بافر نمکی فسفات حل گردید. سلول‌ها در ظروف کشت ۹۶ خانه‌ای کشت شده و نانوذرات اکسید نیکل با غلظت‌های متفاوت به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر از استوک MTT به سلول‌ها اضافه گردید. پس از چهار ساعت نگهداری در انکوباتوری با دمای ۳۷ درجه، واکنش با اضافه کردن محلول HCl (Hydrochloric Acid) ۰/۰۴ نرمال در ایزوپروپانول یا DMSO (Dimethyl sulfoxide) متوقف گردید. این محلول‌ها باعث حل شدن رسوب فورمازان بنفش رنگ در سلول‌ها شدند و میزان جذب توسط دستگاه الایزا پلیت ریدر (Stat Fax® 3200 Microplate Readers) (Palm, FL, USA) اندازه‌گیری گردید. سپس IC50 یعنی غلظتی از نانوذرات اکسید نیکل که ۵۰ درصد از رشد سلول‌ها را در مقایسه با گروه کنترل مهار می‌کند، محاسبه گردید (۱۸).

## آزمون لاکتات دهیدروژناز

لاکتات دهیدروژناز آنزیمی است که در سیتوپلاسم سلول‌های زنده وجود دارد و پس از لیز شدن سلول (پاره شدن غشای سلول) به محیط کشت آزاد می‌شود؛ بنابراین افزایش فعالیت لاکتات دهیدروژناز در محیط کشت سلولی، متناسب با تعداد سلول‌های لیز شده می‌باشد. سلول‌ها در ظروف کشت ۲۴ خانه‌ای با غلظت‌های مشخصی از نانوذرات اکسید نیکل به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) در محلول رویی و رسوب لیز شده سلولی با استفاده از کیت تشخیصی LDH پارس آزمون اندازه‌گیری گردید. اساس این روش بدین صورت است که ابتدا لاکتات دهیدروژناز، لاکتات را به پیرووات تبدیل می‌کند و در جریان آن، NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide) به NAD<sup>+</sup> اکسید می‌شود. سپس پیرووات با نمک زرد رنگ ترازولیوم که در محیط وجود دارد، واکنش نشان داده و فورمازان بنفش را به وجود می‌آورد. سپس به روش طیف‌سنجی، جذب ناحیه بنفش در ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌گردد (۱۹).

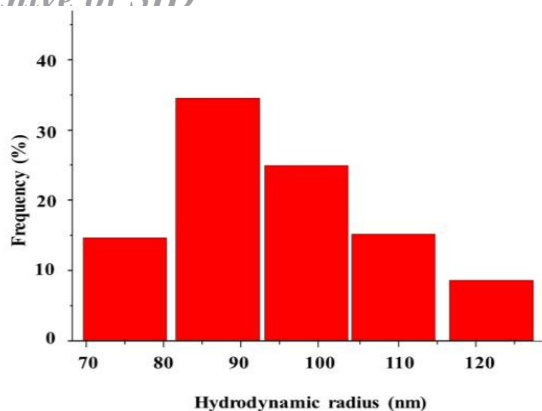
هیدرودینامیکی و مقدار پتانسیل زتا در آن‌ها تعیین نمود. در پژوهش حاضر نانوذرات اکسید نیکل از شرکت سیگمای آمریکا خریداری شدند و با استفاده از آزمون DLS، شعاع هیدرودینامیکی و میزان پتانسیل زتای آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت؛ به این صورت که نانوذرات اکسید نیکل در آب مقطر دوبار تقطیر، حل شده و با یک پروب سونیکاتور (USA، Misonix-S3000)، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سونیکیت گردیدند. سپس با استفاده از دستگاه DLS (Malvern) (United Kingdom، Worcestershire، Instrument) آنالیز شدند.

## کشت رده سلول‌های SH-SY5Y

رده سلولی SH-SY5Y از بانک سلولی رویان خریداری شد و به آزمایشگاه کشت سلول دانشگاه آزاد واحد علوم پزشکی تهران منتقل گردید. سپس سلول‌های تهیه شده در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (شرکت sigma، آمریکا) همراه با سرم جنین (FBS: Fetal Bovine Serum) و ۲ میلی‌مولار L-گلوتامین کشت داده شدند و در فلاسک‌های کشت ۴۰ میلی‌لیتری در انکوباتوری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO<sub>2</sub> (Carbon dioxide) نگهداری شدند.

## آزمون MTT و بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌ها (Viability)

با کمک آزمون MTT می‌توان پاسخ سلول‌های مختلف را به فاکتورهای خارجی از جمله فاکتورهای رشد، کمپلکس‌های فلزی، سمیت سلولی و سایر عوامل شیمیایی ارزیابی کرد. بدین منظور، ابتدا ۴-۵×۱۰<sup>۴</sup> سلول در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت ریخته شد و غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید نیکل (۱۰۰، ۵۰، ۲۰، ۱۰، ۰، ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت با گروه‌های مختلف سلولی انکوبه گردید. غلظت‌های مورد استفاده در این مطالعه براساس نتایج پژوهشی که در سال ۲۰۱۷ در ارتباط با اثر نانوذرات اکسید نیکل بر سلول‌های نوروبلاستوم انجام شده بود، انتخاب گردید (۱۷). به منظور تهیه استوک Dulbecco's، ۱۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم در ۹۹۰ میلی‌لیتر محیط کشت حل شد و همراه با نانوذرات اکسید نیکل به سلول‌های کنترل اضافه

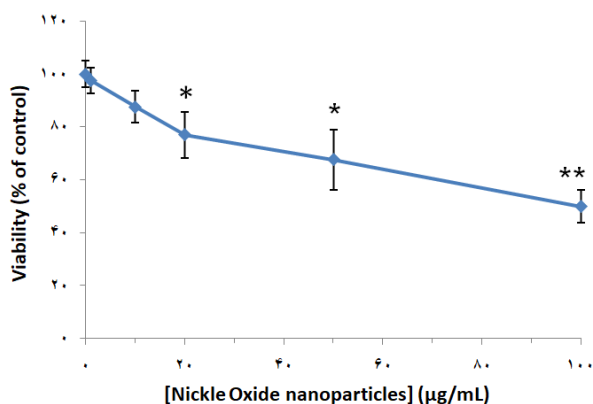


نمودار شماره ۱: نمودار پراکندگی نور دینامیکی (DLS) نانوذرات اکسید نیکل در آب دوبار تقطیر

فراهم می کنند (نمودار ۱).

### یافته‌های آزمون MTT و میزان زنده‌مانی سلول‌ها (Viability)

براساس نتایج آزمون MTT (نمودار ۲)، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید نیکل (۰، ۱، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰) میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. درصد زنده‌مانی سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل (نانوذرات با غلظت صفر) به ترتیب ۱۰۰، ۹۷/۶۴، ۸۷/۰۶، ۷۷/۷۴، ۶۷/۱۷ و ۴۹/۸۷ درصد بود که به صورت وابسته به دوز کاهش یافتند. کاهش زنده‌مانی در غلظت‌های ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ( $P < 0.05$ ) و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ( $P < 0.01$ ) نسبت به گروه کنترل معنادار بود. میزان  $IC_{50}$  برای رده سلولی SH-SY5Y برابر با ۹۵/۲۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.



نمودار شماره ۲: تأثیر نانوذرات اکسید نیکل بر درصد زنده‌مانی (Viability) رده سلول‌های SH-SY5Y با استفاده از آزمون MTT

### ارزیابی فعالیت آنزیم کاسپاز ۳

کاسپاز ۳ در سیتوپلاسم سلول‌ها به شکل غیر فعال وجود دارد. در مرحله شروع آپوپتوز، کاسپاز ۳ فعال می‌شود و در مرحله پایانی آپوپتوز، فعالیت این آنزیم به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. در این مطالعه ابتدا سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید نیکل تیمار شدند. سپس سلول‌ها با تریپسین از کف ظرف جدا شده و با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در ادامه، محلول رویی دور ریخته شد و بافر لیزکننده به سلول‌ها اضافه گردید. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در یخ، سلول در دور ۱۰/۰۰۰ نیروی گراننش به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ گردید. به منظور بررسی فعالیت این آنزیم از کیت سنجش فعالیت آنزیم و از Leu-Glu-His-Asp-) LEHD-p-NA (p-nitroanilide به عنوان سوبسترای کاسپاز ۳ استفاده شد. شایان ذکر است که آبکافت آنزیمی موجب رهاسازی pNA در آن و افزایش جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر می‌گردد. میزان جذب نور نشان‌دهنده میزان شکست پروتئولیتیک سوبسترای کاسپاز و در نتیجه میزان فعالیت کاسپاز در عصاره سلولی استخراج شده می‌باشد (۲۰).

### روش تجزیه و تحلیل آماری

نتایج حاصل از این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS 23 و آزمون‌های آماری One-way ANOVA و t مورد بررسی و تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

### یافته‌ها

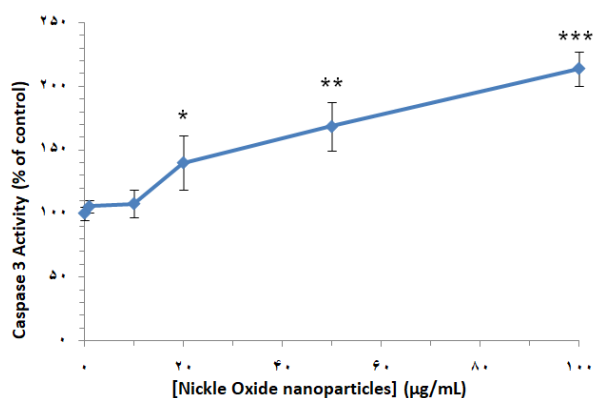
#### نتایج آزمون DLS

براساس نتایج مطالعه حاضر، شعاع متوسط هیدرودینامیکی نانوذرات اکسید نیکل به روش DLS حدود  $89.73 \pm 5.98$  نانومتر اندازه‌گیری گردید. باید خاطر نشان ساخت که توزیع نانوذرات به صورت باریک بود که این مهم نشان‌دهنده یکنواخت بودن محلول نانوذرات و عدم تجمع آن‌ها می‌باشد. ارزش پتانسیل زتای محلول نانوذرات اکسید نیکل نیز با روش DLS حدود  $-28.37 \pm 4.73$  میلی‌ولت محاسبه گردید. این داده‌ها حاکی از آن هستند که نانوذرات اکسید نیکل، پایداری کلئیدی خوبی را

## Archive of SID

در گروه کنترل و سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید نیکل (۰، ۱، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰) میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت را نشان می‌دهد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$ SD از سه آزمون مستقل نشان داده شده‌اند.

نمودار ۴، میزان فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ در محیط کشت سلول‌های SH-SY5Y در گروه کنترل و سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید نیکل (۰، ۱، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰) میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت را نشان می‌دهد. در این مطالعه سنجش میزان فعالیت کاسپاز ۳ در گروه‌های مختلف براساس میزان جذب نور در طول موج ۴۵۰ نانومتر ارزیابی گردید. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$ SD از سه آزمون مستقل به نمایش گذاشته شده‌اند. ( $P < 0.05$ )، ( $P < 0.01$ ) و ( $P < 0.001$ ) در مقایسه با گروه کنترل می‌باشند.



نمودار شماره ۴: میزان فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ در محیط کشت سلول‌های SH-SY5Y در گروه کنترل و سلول‌های تیمار شده

## بحث

با توجه به کاربردهای روزافزون نانوذرات در زیست پزشکی، توجه محققان به بررسی برهمکنش‌های نانوذرات با سیستم‌های زیستی معطوف شده است (۲۱، ۲۲). نتایج حاکی از آن هستند که غلظت‌های بالای اکسید نیکل سبب ایجاد آسیب‌های پاتولوژیکی از جمله آسیب ریوی در انسان و مهره‌داران می‌گردد (۲۴، ۲۳). یکی از موضوعات بسیار مهم در بحث سمیت نانوذرات، ارزیابی اثرات این ترکیبات بر سیستم عصبی است؛ زیرا چنانچه نانوذرات سبب تخریب سلول‌ها و پروتئین‌های سیستم عصبی شوند، می‌توانند باعث ایجاد انواع بیماری‌های عصبی از جمله آلزایمر و

## نتایج آزمون لاکتات دهیدروژناز (LDH)

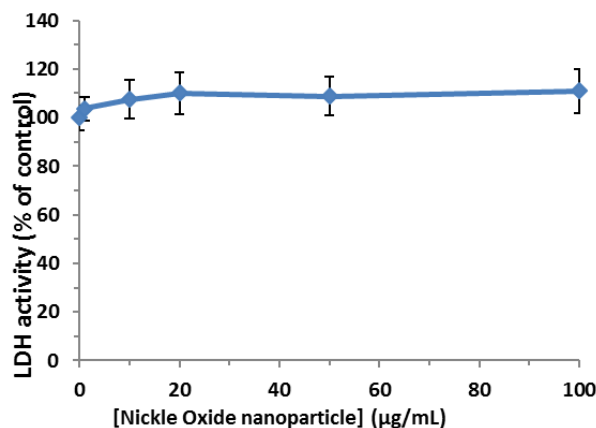
براساس نتایج نمودار ۳، پس از ۲۴ ساعت در معرض قرار گرفتن سلول‌های SH-SY5Y با غلظت‌های مختلف (۰، ۱، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰) میکروگرم بر میلی‌لیتر) نانوذرات اکسید نیکل، تفاوت معناداری در رهاسازی آنزیم LDH از سلول‌های تیمار شده با نانوذرات در غلظت‌های مختلف در مقایسه با گروه کنترل (غلظت صفر) مشاهده نگردید.

## نتایج ارزیابی فعالیت آنزیم کاسپاز ۳

پس از تیمار سلول‌های SH-SY5Y با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید نیکل (۰، ۱، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰) میکروگرم بر میلی‌لیتر)، فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ به صورت وابسته به غلظت افزایش یافت که این افزایش در غلظت‌های ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ( $P < 0.05$ ) و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ( $P < 0.01$ ) نسبت به گروه کنترل معنادار بود (نمودار ۳).

سلول‌ها با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید نیکل (۰، ۱، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰) میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. شایان ذکر است که داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$ SD از سه آزمون مستقل گزارش شده‌اند. ( $P < 0.05$ ) و ( $P < 0.01$ ) معنادار بودن در مقایسه با گروه کنترل (نانوذرات اکسید نیکل با غلظت صفر) را نشان می‌دهند.

نمودار ۳ میزان رهاسازی آنزیم LDH توسط سلول‌های SH-SY5Y



نمودار شماره ۳: میزان رهاسازی آنزیم LDH توسط سلول‌های SH-SY5Y در گروه کنترل و سلول‌های تیمار شده

## Archive of SID

پس از تیمار با نانوذرات اکسید نیکل به واسطه مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (آپوپتوز) رخ داده است.

نتایج پژوهشی که پیشتر به منظور ارزیابی اثرات سمیت نانوذرات اکسید نیکل خوراکی در مورد موش‌های صحرایی انجام شد، نشان دادند که این نانوذرات به طور معناداری سبب تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS)، بروز آسیب به DNA، افزایش اختلالات کروموزومی، آپوپتوز و اختلال در پتانسیل غشای میتوکندریایی شده و استرس اکسیداتیو و سمیت کبدی را ایجاد می‌کنند. در این مطالعه تیمار موش‌ها با نانوذرات اکسید نیکل، میزان پراکسیداسیون لیپیدی و آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز را به طور معناداری افزایش داد؛ در حالی که سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در بافت کبد کاهش یافت.

کاسپازها آنزیم‌های سیستمین پروتئازی هستند که نقشی کلیدی را در آغاز فرایند آپوپتوز ایفا می‌کنند. با فعال شدن کاسپازها، تغییراتی از جمله چروکیدگی سلولی، متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن DNA در سلول‌های آپوپتوتیک ایجاد می‌شود (۲۷-۲۵). از سوی دیگر، کاسپاز ۳ یک کاسپاز اجرایی و یکی از مهم‌ترین کاسپازها در تجزیه پروتئین‌های پیش‌ساز آمیلوئید بنا است که با مرگ سلول‌های عصبی در بیماری آلزایمر در ارتباط می‌باشد؛ از این رو بررسی تغییر در فعالیت کاسپاز ۳ به عنوان یک نشانگر مهم از ورود سلول‌ها به مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی محسوب می‌شود و می‌تواند نقش مهمی در شناخت مسیر سمیت ناشی از نانوذرات در سلول‌های عصبی نوروبلاستوم انسانی داشته باشد. براساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر، پس از تیمار سلول‌های SH-SY5Y با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید نیکل، فعالیت آنزیمی کاسپاز ۳ به صورت وابسته به غلظت افزایش پیدا کرد؛ به طوری که از غلظت ۲۰ میکرومولار به بالا، افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید. این امر نشان داد که نانوذرات اکسید نیکل در غلظت‌های بالا منجر به القای روند مرگ سلولی در سلول‌های SH-SY5Y از مسیر وابسته به کاسپازها شده‌اند. باید توجه داشت که افزایش فعالیت کاسپاز ۳ ناشی از ایجاد آسیب غشای میتوکندریایی بوده و باعث انتشار پروتئین‌های محلول از فضای بین سلولی به داخل

پارکینسون شوند. تاکنون مطالعات محدودی در مورد بررسی سمیت نانوذرات اکسید نیکل در سلول‌های عصبی صورت گرفته است (۱۷).

آزمون MTT یک روش رنگ‌سنجی برای بررسی تکثیر و بقای سلول‌ها است که می‌تواند پاسخ سلول‌ها به فاکتورهای خارجی را ارزیابی کند. افزایش یا کاهش تعداد سلول‌های زنده به صورت خطی با فعالیت میتوکندریایی سلول‌ها در ارتباط می‌باشد؛ از این رو اساس این روش مبتنی بر فعالیت میتوکندریایی و احیا شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال‌های آبی رنگ فورمازان می‌باشد. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند، رابطه مستقیم دارد. در مطالعه‌ای که با هدف بررسی اثر نانوذرات اکسید نیکل با غلظت‌های ۰ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر سلول‌های نوروبلاستوم انجام شد، میزان زنده‌مانی سلول‌ها با افزایش غلظت نانوذرات اکسید نیکل کاهش یافت (۱۷). در پژوهش حاضر اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید نیکل (۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر رده سلول‌های SH-SY5Y بررسی گردید. نتایج آزمون MTT نشان دادند که سمیت سلولی این نانوذرات در مدت ۲۴ ساعت به صورت وابسته به غلظت افزایش می‌یابد که این مهم با یافته‌های مطالعات پیشین همسو است (۱۷)؛ به طوری که این نانوذرات در غلظت پایین (۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) اثری بر زنده‌مانی سلولی نداشتند؛ در حالی که از غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بالاتر به صورت وابسته به غلظت سبب کاهش زنده‌مانی سلولی گردیدند. از آنجایی که در پژوهش حاضر،  $IC_{50}$  یعنی غلظتی از نانوذرات اکسید نیکل که ۵۰ درصد از رشد سلول‌ها را در مقایسه با گروه کنترل مهار می‌کند، برای رده سلولی SH-SY5Y برابر با ۹۵/۲۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد، بررسی غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ضرورتی نداشت.

مغایر با نتایج آزمون MTT، درصد رهاسازی لاکتات دهیدروژناز در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید نیکل، تفاوت معناداری را با گروه کنترل نشان نداد؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این نانوذرات سبب ایجاد آسیب در غشای سلولی نمی‌شوند و کاهش زنده‌مانی سلول‌های SH-SY5Y

سلول می‌شود.

پاسخ به استرس‌های اکسیداتیو، قدرت فعال کردن سیگنال‌های آبخاری ایجادکننده آسیب به DNA را دارند و باعث تغییر در چرخه سلولی در سلول‌های اپیتلیال ریوی انسانی (A549، BEAS-2) می‌شوند (۳۳). نانوذرات اکسید نیکل درصد زنده‌مانی سلول‌های اپیتلیال ریوی انسانی را از طریق القای مسیر آپوپتوزی کاهش می‌دهند. همچنین به صورت وابسته به دوز، آپوپتوز و نکروز را در سلول‌های SH-SY5Y القا می‌کنند (۳۴). القای نکروز توسط اکسید نیکل در سلول‌های سرطانی نیز گزارش شده است (۳۵).

### نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر اثرات سمی نانوذرات اکسید نیکل بر سلول‌های SH-SY5Y را از طریق فعال کردن مسیر آپوپتوزی نشان داد. نتایج آزمایش MTT حاکی از آن بودند که سمیت سلولی از طریق نانوذرات اکسید نیکل در سلول‌های SH-SY5Y به صورت وابسته به غلظت حاصل می‌شود و با افزایش غلظت نانوذره، درصد زنده‌مانی سلول‌ها کاهش می‌یابد. با این وجود، نتایج آزمایش LDH نشان دادند که نانوذرات اکسید نیکل باعث بروز آسیب در غشای سلولی نمی‌شوند. فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ نیز در حضور نانوذرات اکسید نیکل پس از ۲۴ ساعت افزایش یافت که نشان داد این نانوذرات سبب القای آپوپتوز در سلول‌های SH-SY5Y می‌شوند.

### تشکر و قدردانی

مقاله حاضر از پایان‌نامه کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران استخراج شده است. بدین وسیله از تمام افرادی که پژوهشگران را در فرایند انجام این پژوهش همراهی نمودند، تقدیر و تشکر می‌شود.

### تضاد منافع

در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

آپوپتوز و استرس اکسیداتیو از عوامل مهم بروز آسیب در DNA سلول‌ها می‌باشند (۲۸). نتایج مطالعات پیشین حاکی از آن هستند که نمک نیکل می‌تواند باعث القای آپوپتوز از طریق افزایش ROS در سلول‌های بیضه موش شود (۲۹). همچنین گزارش شده است که نانوذرات اکسید نیکل می‌تواند سبب ایجاد سمیت در سلول‌های کبدی انسان (HEPG<sub>2</sub>)، القای آپوپتوز و تغییر عملکرد میتوکندریایی و لیزوزومی در این سلول‌ها شود. در پژوهشی که در این راستا انجام شد، نانوذرات اکسید نیکل سبب افزایش بیان ژن‌های آپوپتوتیک، Bax و کاسپاز ۳ گردیدند؛ در حالی که بیان ژن‌های آنتی‌آپوپتوتیک مانند Bcl<sub>2</sub> را کاهش دادند (۳۰). در پژوهش حاضر نیز افزایش معنادار فعالیت کاسپاز ۳ مشاهده شد که نشان‌دهنده القای آپوپتوز بود. یافته‌های Latavan و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان دادند که نانوذرات اکسید نیکل می‌تواند سبب بروز آسیب به DNA شوند؛ با این وجود، هیچ‌گونه ROS درون سلولی شناسایی نشد (۳۱). این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر همسویی دارند؛ زیرا در پژوهش حاضر پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید نیکل، تغییر معناداری در میزان لاکتات دهیدروژناز سلولی مشاهده نگردید که این امر نشان می‌دهد سلول‌ها دچار نکروز نشده‌اند. از سوی دیگر، افزایش فعالیت کاسپاز ۳ نشان‌دهنده بروز آسیب به DNA سلول‌ها و فعال شدن مسیر آپوپتوزی می‌باشد. گزارش شده است که نانوذرات اکسید نیکل سبب القای سمیت سلولی، استرس اکسیداتیو و ایجاد آپوپتوز همراه با افزایش فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ و قطعه‌قطعه شدن DNA در سلول‌های اپیتلیالی مجاری هوایی انسان (HEP2) می‌شوند (۳۲) که از نظر ایجاد استرس اکسیداتیو و نکروز در تضاد با نتایج پژوهش حاضر می‌باشد؛ زیرا در پژوهش حاضر، نکروز معناداری ناشی از تیمار سلول‌ها با نانوذرات اکسید نیکل مشاهده نگردید. این امر می‌تواند به دلیل تفاوت در نوع سلول‌ها، تفاوت در غلظت نانوذرات و همچنین مدت زمان تیمار باشد. براساس نتایج مطالعات پیشین، نانوذرات اکسید نیکل در



## References:

1. Sriram K, Lin GX, Jefferson AM, Roberts JR, Wirth O, Hayashi Y, et al. Mitochondrial dysfunction and loss of Parkinson's disease-linked proteins contribute to neurotoxicity of manganese-containing welding fumes. *FASEB J* 2010;24(12):4989-5002. DOI: [10.1096/fj.10-163964](https://doi.org/10.1096/fj.10-163964)
2. Vimala Rani JD, Kamatchi S, Dhathathreyan A. Nanoparticles of nickel oxide and nickel hydroxide using lyophilisomes of fibrinogen as template. *J Colloid Interface Sci* 2010;341(1):48-52. DOI: [10.1016/j.jcis.2009.09.006](https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.09.006)
3. Mu Y, Jia D, He Y, Miao Y, Wu HL. Nano nickel oxide modified non-enzymatic glucose sensors with enhanced sensitivity through an electrochemical process strategy at high potential. *Biosens Bioelectron* 2011;26(6):2948-52. DOI: [10.1016/j.bios.2010.11.042](https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.11.042)
4. Minigalieva IA, Katsnelson BA, Privalova LI, Sutunkova MP, Gurvich VB, Shur VY, et al. Attenuation of combined nickel (II) oxide and manganese (II, III) oxide nanoparticles' adverse effects with a complex of bioprotectors. *Int J Mol Sci* 2015;16(9):22555-83. DOI: [10.3390/ijms160922555](https://doi.org/10.3390/ijms160922555)
5. Gong N, Shao K, Feng W, Lin Z, Liang C, Sun Y. Biototoxicity of nickel oxide nanoparticles and bio-remediation by microalgae *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere* 2011;83(4):510-6. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2010.12.059](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.059)
6. Baek YW, An YJ. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb2O3) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *Sci Total Environ* 2011;409(8):1603-8. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2011.01.014](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.014)
7. Horie M, Fukui H, Nishio K, Endoh S, Kato H, Fujita K, et al. Evaluation of acute oxidative stress induced by NiO nanoparticles in vivo and in vitro. *J Occup Health* 2011;53(2):64-74. DOI: [10.1539/joh.110121](https://doi.org/10.1539/joh.110121)
8. Ahamed M, Karns M, Goodson M, Rowe J, Hussain SM, Schlager JJ, et al. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;233(3):404-10. DOI: [10.1016/j.taap.2008.09.015](https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.09.015)
9. Zhan H, Suzuki T, Aizawa K, Miyagawa K, Nagai R. Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence. *J Biol Chem* 2010;285(38):29662-70. DOI: [10.1074/jbc.M110.125138](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.125138)
10. Ahamed M, Akhtar MJ, Siddiqui MA, Ahmad J, Musarrat J, Al-Khedhairi AA, et al. Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells. *Toxicology* 2011;283(2-3):101-8. DOI: [10.1016/j.tox.2011.02.010](https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.02.010)
11. Ahamed M. Toxic response of nickel nanoparticles in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol In Vitro* 2011;25(4):930-6. DOI: [10.1016/j.tiv.2011.02.015](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.02.015)
12. Ahamed M, Akhtar MJ, Raja M, Ahmad I, Siddiqui MK, AlSalhi MS, et al. ZnO nanorod-induced apoptosis in human alveolar adenocarcinoma cells via p53, survivin and bax/bcl-2 pathways: role of oxidative stress. *Nanomedicine* 2011;7(6):904-13. DOI: [10.1016/j.nano.2011.04.011](https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.04.011)
13. Capasso L, Camatini M, Gualtieri M. Nickel oxide nanoparticles induce inflammation and genotoxic effect in lung epithelial cells. *Toxicol Lett* 2014;226(1):28-34. DOI: [10.1016/j.toxlet.2014.01.040](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.01.040)
14. Saquib Q, Attia SM, Ansari SM, Al-Salim A, Faisal M, Alatar AA, et al. p53, MAPKAPK-2 and caspases regulate nickel oxide nanoparticles induce cell death and cytogenetic anomalies in rats. *Int J Biol Macromol* 2017;105(Pt 1):228-37. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2017.07.032](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.032)
15. Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *J Vis Exp* 2016;108:53193. DOI: [10.3791/53193](https://doi.org/10.3791/53193)
16. Kovalevich J, Langford D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol* 2013;1078:9-21. DOI: [10.1007/978-1-62703-640-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5_2)
17. Abudayyak M, Guzel E, Özhan G. Nickel oxide nanoparticles are highly toxic to SH-SY5Y neuronal cells. *Neurochem Int* 2017;108:7-14. DOI: [10.1016/j.neuint.2017.01.017](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.01.017)

18. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol* 2011;731:237-45. DOI: [10.1007/978-1-61779-080-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20)
19. Kaja S, Payne AJ, Naumchuk Y, Koulen P. Quantification of lactate dehydrogenase for cell viability testing using cell lines and primary cultured astrocytes. *Curr Protoc Toxicol* 2017;72:2-26. DOI: [10.1002/cptx.21](https://doi.org/10.1002/cptx.21)
20. Butterick TA, Duffy CM, Lee RE, Billington CJ, Kotz CM, Nixon JP. Use of a caspase multiplexing assay to determine apoptosis in a hypothalamic cell model. *J Vis Exp* 2014;86:51305. DOI: [10.3791/51305](https://doi.org/10.3791/51305)
21. Alshatwi AA, Athinarayanan J, Periasamy VS, Alatah KA. Date fruits-assisted synthesis and biocompatibility assessment of nickel oxide nanoparticles anchored onto graphene sheets for biomedical applications. *Appl Biochem Biotechnol* 2017;181(2):725-34. DOI: [10.1007/s12010-016-2244-z](https://doi.org/10.1007/s12010-016-2244-z)
22. Din MI, Nabi AG, Rani A, Aihetasham A, Mukhtar M. Single step green synthesis of stable nickel and nickel oxide nanoparticles from *Calotropis gigantea*: catalytic and antimicrobial potentials. *Environ Nanotechnol Monit Manag* 2018;9:29-36. DOI: [10.1016/j.enmm.2017.11.005](https://doi.org/10.1016/j.enmm.2017.11.005)
23. Liu S, Zhu A, Chang X, Sun Y, Zhou H, Sun Y, et al. Role of nitritive stress in nano nickel oxide-induced lung injury in rats. *Wei Sheng Yan Jiu* 2016;45(4):563-7. [Link](#)
24. Chang X, Zhao H, Gao J, Chen L, Zhu A, Wang C, et al. Pulmonary toxicity of exposure to nano nickel oxide. *Micro Nano Lett* 2018;13(6):733-8. DOI: [10.1049/mnl.2017.0802](https://doi.org/10.1049/mnl.2017.0802)
25. Bahadar H, Maqbool F, Niaz K, Abdollahi M. Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models. *Iran Biomed J* 2016;20(1):1-11. DOI: [10.7508/ibj.2016.01.001](https://doi.org/10.7508/ibj.2016.01.001)
26. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 1999;144(2):281-92. DOI: [10.1083/jcb.144.2.281](https://doi.org/10.1083/jcb.144.2.281)
27. Helmke C, Raab M, Rödel F, Matthes Y, Oellerich T, Mandal R, et al. Ligand stimulation of CD95 induces activation of Plk3 followed by phosphorylation of caspase-8. *Cell Res* 2016;26(8):914-34. DOI: [10.1038/cr.2016.78](https://doi.org/10.1038/cr.2016.78)
28. Abudayyak M, Guzel E, Özhan G. Nickel oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in kidney cell line (NRK-52E). *Biol Trace Elem Res* 2017;178(1):98-104. DOI: [10.1007/s12011-016-0892-z](https://doi.org/10.1007/s12011-016-0892-z)
29. Zou L, Su L, Sun Y, Han A, Chang X, Zhu A, et al. Nickel sulfate induced apoptosis via activating ROS-dependent mitochondria and endoplasmic reticulum stress pathways in rat Leydig cells. *Environ Toxicol* 2017;32(7):1918-26. DOI: [10.1002/tox.22414](https://doi.org/10.1002/tox.22414)
30. Ahmad J, Alhadlaq HA, Siddiqui MA, Saquib Q, Al-Khedhairi AA, Musarrat J, et al. Concentration-dependent induction of reactive oxygen species, cell cycle arrest and apoptosis in human liver cells after nickel nanoparticles exposure. *Environ Toxicol* 2015;30(2):137-48. DOI: [10.1002/tox.21879](https://doi.org/10.1002/tox.21879)
31. Latvala S, Hedberg J, Di Bucchianico S, Möller L, Odnevall Wallinder I, Elihn K, et al. Nickel Release, ROS Generation and Toxicity of Ni and NiO Micro- and Nanoparticles. *PLoS One* 2016;11(7):e0159684. DOI: [10.1371/journal.pone.0159684](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159684)
32. Siddiqui MA, Ahamed M, Ahmad J, Majeed Khan MA, Musarrat J, Al-Khedhairi AA, et al. Nickel oxide nanoparticles induce cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis in cultured human cells that is abrogated by the dietary antioxidant curcumin. *Food Chem Toxicol* 2012;50(3-4):641-7. DOI: [10.1016/j.fct.2012.01.017](https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.01.017)
33. Capasso L, Camatini M, Gualtieri M. Nickel oxide nanoparticles induce inflammation and genotoxic effect in lung epithelial cells. *Toxicol Lett* 2014;226(1):28-34. DOI: [10.1016/j.toxlet.2014.01.040](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.01.040)
34. Duan WX, He MD, Mao L, Qian FH, Li YM, Pi HF, et al. NiO nanoparticles induce apoptosis through repressing SIRT1 in human bronchial epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015;286(2):80-91. DOI: [10.1016/j.taap.2015.03.024](https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.03.024)
35. Flamme M, Cressey PB, Lu C, Bruno PM, Eskandari A, Hemann MT, et al. Induction of necroptosis in cancer stem cells using a nickel(II)-dithiocarbamate phenanthroline complex. *Chemistry* 2017;23(40):9674-82. DOI: [10.1002/chem.201701837](https://doi.org/10.1002/chem.201701837)