KLİNİK ÇALIŞMA / CLINICAL TRIAL
Ege Klin Tıp Derg 2020;58 (3):364- 369

Nikel Klorürün Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Hücre Dizilerinde (A549) Hücre Canlılığı ve Koloni Formasyonu Üzerine Olan Etkisi

Effect of Nickel Chloride on Cell Viability and Colony Formation in Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines (A549)

Erkan KAHRAMAN* 0000-0003-0051-416X
Erdem GÖKER 0000-0001-6180-713X**

* Ege Üniversitesi, Atatürk Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, İzmir, Türkiye,
** Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı, İzmir, Türkiye,

Yazışma Adresi: Erkan KAHRAMAN
Atatürk Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu,
Ege Üniversitesi, İzmir
e-mail: erkan.kahraman@ege.edu.tr

Geliş Tarihi: 10.10.2020
Kabul Tarihi:30.11.2020

Öz

Amaç: Son yıllarda birçok metal ve metal bileşiğinin kanser tedavisinde umut vadedebileceği gösterilmiştir. Bu elementlerden bir tanesi de nikeldir. Her ne kadar nikel bir genotoksik karsinojen olarak tanımlansa da bazı kanser türlerinde terapötik bir ajan olabileceği ileri sürülmüştür. Ancak nikelin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre dizilerinde (A549) hücre proliferasyonu ve kanser hücresi koloni formasyonu üzerine olan etkileri bilinmemektedir. Yapmış olduğumuz çalışma ile nikel klorürün ($NiCl_2$) A549 hücre dizilerinin hücre canlılığı ve koloni oluşturma yetenekleri üzerine olan etkilerinin araştırılmasını amaçladık.

Yöntem: $NiCl_2$'ün hücre canlılığına olan etkilerinin belirlenmesi için A549 hücre dizilerine 50 / 100 / 200 / 400 / 800 / 1600 / 3200 µM dozlarında 24, 48 ve 72. saatlerde $NiCl_2$ uygulaması yapıldı. Hücre canlılığına olan etkilerinin belirlenmesi için MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) analizi gerçekleştirildi. Koloni sayılarına olan etkilerinin belirlenmesi için ise koloni formasyon analizi uygulandı.

Bulgular: $NiCl_2$'ün 24. saatte 100 µM'dan itibaren ($p<0.01$), 48 ve 72. saatlerde 50 µM'dan itibaren ($p<0.01$), hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı görüldü. $NiCl_2$'ün A549 hücrelerinin büyümesini %50 oranında baskılayan dozunun (IC50) ise 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla 535,7 µM, 322,7 µM ve 215,9 µM olduğu hesaplandı. Ayrıca, IC50 dozunda $NiCl_2$ uygulanan A549 hücre dizilerinde oluşan koloni sayısının (koloni sayısı: 34,2 ± 6,02), kontrol grubuna göre (koloni sayısı: 67,3 ±5,81) istatistiksek olarak daha az olduğu belirlendi ($p<0.01$).

Sonuç: Bulgularımız, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre dizilerine (A549) $NiCl_2$ uygulamasının, doz ve zaman bağımlı olarak hücre canlılığını baskıladığı ve kanser hücrelerinin koloni yapabilme yeteneğini azalttığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Akciğer Kanseri, Kanser, Nikel Klorür.

Abstract

Introduction: Recently years, it has been shown that many metal and metal compounds might be a promising in cancer treatment. One of these elements is nickel.

Although nickel is defined as a genotoxic carcinogen, it has been suggested that it may be a therapeutic agent in some types of cancer. However, the effects of nickel are unknown on cell proliferation and cancer cell colony formation in non-small cell lung cancer cell lines (A549). In our study, we aimed that investigate the effect of nickel chloride on cell viability and colony formation ability of A549 cell lines.

Methods: In order to determine the effects of nickel chloride on cell viability, nickel chloride was treated to A549 cell lines for 24, 48 and 72 hours at 50 / 100 / 200 / 400 / 800 / 1600 / 3200 µM doses. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay was used for determine of effect of nickel chloride on cell viability. Colony formation assay was used for determine of effect of nickel on colony number.

Result: It was shown that nickel chloride decreased cell viability starting from 100 µM at 24th hour ($p < 0.01$), starting from 50 µM at 48th and 72nd hour ($p < 0.01$) statistically significantly. The IC50 (the half maximal inhibitory concentration) value was calculated as 535,7 µM, 322,7 µM and 215,9 µM doses at 24, 48, 72nd hour, respectively. Also, it was determined that the number of colonies (number of colonies: 34.2 ± 6.02) formed in A549 cell lines treated with Nickel chloride at IC50 dose was statistically less than the colony number of control group (number of colonies: 67.3 ± 5.81) ($p < 0.01$).

Conclusion: Our results indicate that the treatment of nickel chloride in non-small cell lung cancer cell lines (A549) decreases the colony formation ability of cancer cells and suppresses cell viability in a time and dose dependent manner.

Key Words: Cancer, Lung Cancer, Nickel Chloride.

Giriş

Metal bir element olan nikel, yer kabuğunda en çok bulunan yirmi dördüncü elementtir (1). Genel popülasyonda en yüksek nikel ve nikel bileşikleri alımı, içilen sular ve beslenme yoluyla gerçekleşir. Ayrıca nikel içeren mücevherler, madeni paralar ve paslanmaz çelik eşyalar ile birlikte temas yoluyla da nikel maruziyeti gerçekleşebilmektedir (2).

Nikele kronik çevresel maruziyet dünya çapında bir sağlık sorunudur. Nikel bileşiklerine uzun süre maruz kalmanın insan kanserlerini tetikleyebileceği gösterilmiş, bu nedenle nikel bileşikleri insan karsinojenleri olarak tanımlanmıştır. Ancak nikel indüklü karsinogenez mekanizması altında yatan nedenler günümüzde çok az bilinmektedir (3). İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda nikelin karsinojenik etkisinin benzer olduğu ortaya konmuştur. Vücutta çözünebilme yeteneğine sahip olması ve nikelin genotoksik ve karsinojenik bir aktifi olan iyonik nikelin salınımına yol açması nedeniyle metalik nikelin karsinojenik olduğu düşünülmektedir. Kültüre edilen insan ve fare hücrelerinde yapılan bir çok çalışmada ise çeşitli nikel bileşiklerinin DNA kırıkları mutasyonlar, kromozomal hasarlar ve DNA tamirinin bozulması gibi genetik hasarlara yol açtığı gösterilmiştir (4).

Elemental nikel ve nikel tuzlarının kanserojen olabileceğine dair birçok araştırma bulunmaktadır. Ancak bir nikel bileşiği olan nikel klorürün ($NiCl_2$) ise tek başına uygulanmasıyla kanserojen etkisinin çok zayıf olduğu gösterilmiştir. Hatta tek başına uygulama ile farelerde cilt kanserine yol açmadığı bu özelliklerinden dolayı çok daha zayıf bir karsinojen olabileceği belirlenmiştir (5). Diğer taraftan genotoksik potansiyelinin altında yatan mekanizma tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Nikel subsülfit gibi birçok nikel bileşiği genotoksik olarak sınıflandırılırken $NiCl_2$ ise genotoksik olmayan bir karsinojen olarak sınıflandırılmaktadır ve birçok çalışmada da $NiCl_2$'ün DNA hasarına yol açmadığı ortaya konmuştur (6).

Bununla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalarda $NiCl_2$'ün bazı kanser türlerine karşı etkili olduğu, anti kanser özellikleri olabileceği, hatta $NiCl_2$'ün kanser tedavisinde kullanılabilecek ve gelecek vadeden bir ajan olabileceği bildirilmiştir. Buna paralel olarak oral sukuamoz hücreli karsinomda MMP ekspresyon düzeylerini hem protein hem de RNA düzeyinde azalttığı, $NiCl_2$ verilen farelerde metastaz ilişkili genlerin baskılandığı ve $NiCl_2$'ün oral kanserlerin tedavisi için umut verici yeni bir anti-kanser terapötiği olabileceği belirtilmiştir (7).

Bu doğrultuda yapmış olduğumuz çalışma ile kanser tedavisinde umut verici bir ajan olabileceği ileri sürülen $NiCl_2$'ün, küçük hücreli olmayan insan akciğer kanseri hücre dizilerinde (A549) hücre proliferasyonuna ve kanser hücrelerinin koloni oluşturma kabiliyetine olan etkilerinin ortaya konmasını amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Hücre kültürü

İnsan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre dizisi (A549) Amerikan tip hücre kültür koleksiyonundan (ATCC, CCL-185) ticari olarak satın alındı. Hücreler %10 FBS (Fetal Bovine Serum, Biological Industries, Kat.No: 01-121-1A), 2mM L-Glutamin (Biological Industries, Kat.No: 03-020-1B), 100 µg/ml Penisilin/Streptomisin (Biological Industries, Kat.No: 03-031-1B) içeren DMEM/F12 (Sigma, Kat.No: D6421) medyumu içerisinde 37°C'de, %5 CO_2'li nemli inkübatörde kültüre edildi.

Hücre canlılığı analizi

Hücre canlılığı tayini için MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) analizi gerçekleştirildi. A549 hücre dizileri 96 kuyulu kültür kaplarına her bir kuyuda 2500 hücre olacak şekilde 100µl besi yeri içerisinde ekildi. 24 saat sonra hücrelere 0 / 100 / 200 / 400 / 800 / 1200 / 1600 / 3200 µM dozlarında $NiCl_2$ (Sigma, Kat No:339350) uygulaması gerçekleştirildi. 24, 48 ve 72. saatlerde 5mg/ml MTT (Sigma Kat.No: 5655) stok solüsyonundan her bir kuyuya 15 µl eklendi. 4 saatlik inkübasyon sonunda kuyulardaki içerik çekilerek her bir kuyuya 100 µl Dimetil Sülfoksit (Merck, Kat.No: 116743) eklendi. 570 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucuda okutuldu (Beckman Coulters DTX 880). Hücre canlılığı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Canlılık (\%)} = \frac{\text{Nikel klorür grubu ortalama absorbans (örnek} - \text{blank)}}{\text{Kontrol grubu ortalama absorbans (kontrol} - \text{blank)}} \text{x100}$$

Koloni formasyon analizi

A549 hücre dizileri 6 kuyulu hücre kültürü kaplarına 100 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra hücrelere 24 saatlik IC50 dozunda $NiCl_2$ uygulandı. 24 saat sonunda besi yeri değiştirilerek hücreler 10 gün kültüre edildi. Kültür sonunda besi yerleri çekilerek methanol (Sigma Kat. No: 32213) ile koloniler fikse edildikten sonra kristal viyole (Merck, Kat No:1014080025) ile boyandı. Oluşan koloniler sayılarak değerlendirildi.

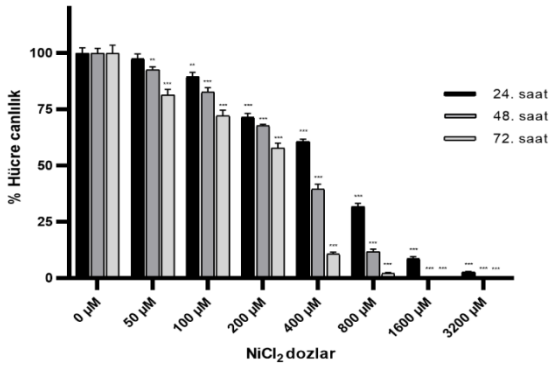
İstatistik Yöntem

Elde edilen veriler GraphPad Prism 8.0 istatistik programına aktarılarak analiz edildi. Sitotoksisitede gruplar arsındaki farkın anlamlılık düzeyinin belirlenmesi için One-Way ANOVA analizi (Post-Hoc, Dunnett's), IC50 değerlerinin belirlenmesinde doz yanıt baskılama analizi, koloni formasyon analizinde ise iki grup arasındaki farkın anlamlılık düzeyinin belirlenmesi için bağımsız örneklem t-testi yapıldı. $p<0.05$(*), $p<0.01$(**), $p<0.001$(***) değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

$NiCl_2$ uygulaması A549 hücre dizilerinin canlılığını doz ve zaman bağımlı olarak azaltır.

$NiCl_2$'ün A549 hücre dizilerinde doz ve zaman bağımlı olarak hücre proliferasyonuna olan etkisini belirlemek amacıyla bir hücre canlılık testi olan MTT analizi gerçekleştirildi. 24, 48 ve 72. saate kadar hücrelere 50, 100, 200, 400, 800, 1600 ve 3200µM dozlarında $NiCl_2$ uygulaması yapıldı. $NiCl_2$ uygulamasının 24. saatte 100 µM'dan itibaren ($p<0.01$), 48. saatte 50 µM'dan itibaren ($p<0.01$) ve 72 saatlerde ise 50 µM'lık dozdan itibaren ($p<0.001$) hücre canlılığını istatistiksel olarak azalttığı belirlendi (Şekil 1).



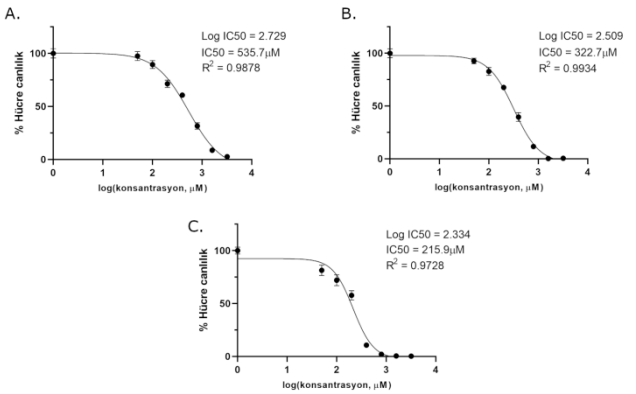
Şekil 1. $NiCl_2$ uygulamasının A549 hücre dizilerinin hücre canlılığına olan etkisi. Hücre canlılık analizi olarak MTT testi gerçekleştirildi. Sonuçlar her biri birbirinden bağımsız en az üç testin ortalamasını göstermektedir. Hata Barları: ± SD. **p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001*

Ayrıca her bir zaman periyodunda $NiCl_2$'ün A549 hücre dizilerinin hücre canlılığını %50 oranında baskılayan dozunun (IC50) hesaplanması için, uygulanan her bir $NiCl_2$ dozunu *log (X)* tabanına çevirerek GraphPad Prism 8.0 istatistik programında doz yanıt baskılanma analizi gerçekleştirildi. Buna göre $NiCl_2$'ün 24. saat IC50 değeri 535,7 µM (R=0.99), 48. saat IC50 değeri 322,7 µM (R=0.99) ve 72. saat IC50 değerinin 215,9 µM (R=0.97) olduğu belirlendi (Şekil 2). Elde etmiş olduğumuz sonuçlara göre verilerimiz $NiCl_2$ uygulamasının A549 hücre dizilerinin hücre canlılığını doz ve zaman bağımlı olarak azalttığını göstermektedir.

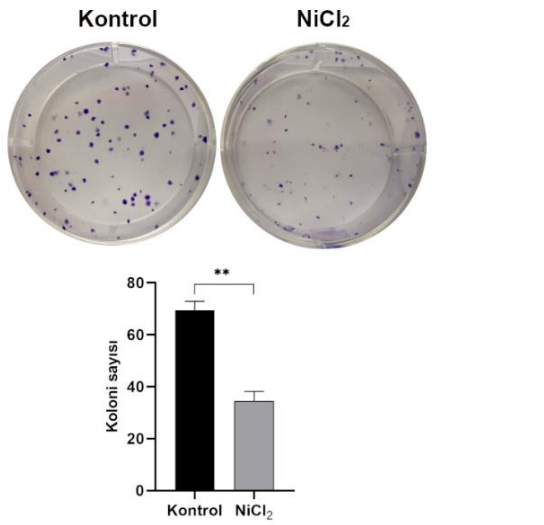
$NiCl_2$ uygulaması A549 hücre dizilerinin koloni oluşturabilme yeteneğini baskılar.

$NiCl_2$'ün A549 hücre dizilerinin koloni oluşturma yeteneği üzerine olan etkilerini incelemek amacıyla koloni formasyon analizi (CFA) gerçekleştirildi. Bu amaçla A549 hücre dizilerine 24. saatliğine IC50 değeri olan 535 µM $NiCl_2$ uygulandı ve 10. gün sonunda meydana gelen koloniler sayıldı.

Kontrol grubunda 67,3 (±5,81) tane koloni meydana geldiği, diğer taraftan $NiCl_2$ uygulanan grupta ise 34,2 (± 6,02) koloni oluştuğu gözlemlendi. Yapılan istatistiksel analizle $NiCl_2$ uygulanan grupta meydana gelen koloni sayısının istatistiksel olarak kontrol grubundan daha az olduğu belirlendi ($p<0.01$) (Şekil 3). Sonuç olarak verilerimiz $NiCl_2$ uygulamasının A549 hücre dizisinin koloni sayısını azalttığını göstermiştir.



Şekil 2. A549 hücre dizilerinde $NiCl_2$ uygulaması sonucu elde edilen IC50 değerleri. IC50 değerlerinin hesaplanması için $NiCl_2$ dozları *log(X)* tabanına çevrildi ve GraphPad Prism 8.0 istatistik programında doz yanıt baskılanma analizi gerçekleştirildi. Sonuçlar her biri birbirinden bağımsız en az üç testin ortalamasını göstermektedir. Hata Barları: ± SD.



Şekil 3. $NiCl_2$ uygulamasının A549 hücre dizilerinde koloni formasyonu üzerine etkileri. Koloni sayılarının belirlenmesi amacıyla koloni formasyon analizi gerçekleştirildi. Sonuçlar her biri birbirinden bağımsız en az üç testin ortalamasını göstermektedir. Hata Barları: ± SD. ***p<0.01*

Tartışma

1960'larda Barnett Rosenberg tarafından bir platin bileşiği olan cisplatinin keşfedilmesi kanser tedavisinde metal temelli bileşiklerinin kullanılması açısından bir dönüm noktası olmuş ve bu keşif metal tabanlı anti kanser ilaçların modern çağının başlamasını sağlamıştır (8, 9). Metal bazlı bileşikler yaygın olarak kullanılmasına rağmen terapötik ve toksik dozlar arasında tam olarak net bir ayrım olmaması tedavi açısından büyük bir zorluktu. Ancak hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji deki gelişmeler sayesinde, hücresel ve moleküler toksisitelerin ortaya konmasıyla bu bileşiklerin tedavide kullanımı açısından rasyonel tasarımlarının yapılmasına olanak sağladı (10). Böylece birçok metal bileşiği kanser tedavisinde terapötik aday olarak kullanılıp kullanılamayacağı araştırılmaya başlanmış ve bu metallerin hücresel biyolojik yanıtları olan etkileri ortaya konmaya çalışılmıştır (11-13).

Metal yapıda olan nikel doğada en fazla bulunan elementlerden birisidir ve elemental nikel uluslararası kanser araştırma ajansı tarafından insanlar için kanserojen olarak kabul edilmiştir (14). Nikel bileşiklerinden olan $NiCl_2$ ise literatürde genotoksik olmayan karsinojen olarak tanımlanmıştır ve birçok çalışmada $NiCl_2$'ün diğer nikel bileşiklerine göre en zayıf karsinojenik etkiye sahip olan nikel bileşiği olduğu gösterilmiştir. Yapmış olduğumuz çalışma ile $NiCl_2$'ün küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre dizilerinde (A549) hücre proliferasyonuna ve kanser hücrelerinin koloni oluşturma yeteneklerine olan etkisi ortaya konmuştur. $NiCl_2$'ün birçok çalışmada hücrelerde malignant özellikleri indükleyerek karsinojeniteyi desteklediği (15-17), diğer taraftan ise bazı kanser türlerinde kanser tedavisinde potansiyel ve umut vadeden yeni bir aday olabileceği belirlenmiştir (7). Hepatoselüler karsinoma hücre dizilerinde(HepG2) yapılan bir çalışmada hücre proliferasyonunu %50 baskılayan IC50 değerinin 24. saatlerde 400µM (18), fare embriyonik fibroblast hücrelerinde (BALB/3T3) 700 µM (19), insan osteosarkom hücre dizilerinde(U2OS) 1,5 mM ve insan keratinositlerinde (HaCat) 2mM olduğu gösterilmiştir (20). 1984 yılında Dubreuil ve ark. tarafından A549 hücre dizileri üzerinde yapılan bir çalışmada ise sadece 48 saatlik IC50 değeri hesaplanmış ve bu değerin 350µM olduğu belirlenmiştir (21).

Yapmış olduğumuz çalışmada ise küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre dizisinde $NiCl_2$'ün 24. saat IC50 değerinin 535,7 µM, 48. saat IC50 değerinin 322,7 µM ve 72. saat IC50 değerinin ise 215,9 µM olduğunu belirledik. Ayrıca 24. saatte 100 µM'dan, 48. ve 72 saatlerde ise 50 µM'lık dozlardan itibaren $NiCl_2$'ün hücre proliferasyonunu istatistiksel olarak azalttığını ortaya koyduk.

Bir kanser hücresinin tek bir hücreden çoğalıp koloni oluşturması bir kanser hücre belirteci özelliğidir. Bu süreç bir kanser hücresinin bulunduğu yerde çoğalmasından, uzak doku metastazında homing yapması esnasına kadar kullandığı en önemli yeteneklerindendir (22).

Bu amaçla $NiCl_2$ uygulamasının A549 hücrelerinin koloni oluşturma yetenekleri üzerine olan etkilerinin belirlenmesi için koloni formasyonu analizi gerçekleştirdik ve IC50 dozlarında $NiCl_2$ uygulamasının A549 hücre dizilerinin koloni oluşturabilme yeteneklerini baskıladığını gösterdik.

Sonuç olarak, yapmış olduğumuz çalışma ile $NiCl_2$ uygulamasının, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre dizilerinin doz ve zaman bağımlı olarak hücre canlılığını ve koloni oluşturma yeteneklerini azalttığı gösterilmiştir.

Kaynaklar

1.Mastromatteo E. Yant memorial lecture. Nickel. Am Ind Hyg Assoc J 1986;47(10):589-601.

2.Coogan TP, Latta DM, Snow ET, Costa M. Toxicity and carcinogenicity of nickel compounds. Crit Rev Toxicol 1989;19(4):341-84.

3.Wang L, Fan J, Hitron JA, Son YO, Wise JT, Roy RV, et al. Cancer Stem-Like Cells Accumulated in Nickel-Induced Malignant Transformation. Toxicol Sci 2016;151(2):376-87.

4.Stannard L, Doak SH, Doherty A, Jenkins GJ. Is Nickel Chloride really a Non-Genotoxic Carcinogen? Basic Clin Pharmacol Toxicol 2017;121 Suppl 3:10-15.

5.Uddin AN, Burns FJ, Rossman TG, Chen H, Kluz T, Costa M. Dietary chromium and nickel enhance UV-carcinogenesis in skin of hairless mice. Toxicol Appl Pharmacol 2007;221(3):329-38.

6.Chakrabarti SK, Bai C, Subramanian KS. DNA-protein crosslinks induced by nickel compounds in isolated rat lymphocytes: role of reactive oxygen species and specific amino acids. Toxicol Appl Pharmacol 2001;170(3):153-65.

7.Ota H, Shionome T, Suguro H, Saito S, Ueki K, Arai Y, et al. Nickel chloride administration prevents the growth of oral squamous cell carcinoma. Oncotarget 2018;9(35):24109-24121.

8.Jungwirth U, Kowol CR, Keppler BK, Hartinger CG, Berger W, Heffeter P. Anticancer activity of metal complexes: involvement of redox processes. Antioxid Redox Signal 2011;15(4):1085-127.

9.Nicolini M. Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy. . New York: Springer; 1997.

10.Hong-Fang Ji 1 X-JL, Hong-Yu Zhang. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? EMBO Rep. 2009 Mar;10(3):194-200.

11.Desoize B. Metals and metal compounds in cancer treatment. Anticancer Res 2004;24(3a):1529-44.

12.Fouani L, Menezes SV, Paulson M, Richardson DR, Kovacevic Z. Metals and metastasis: Exploiting the role of metals in cancer metastasis to develop novel anti-metastatic agents. Pharmacol Res 2017;115:275-287.

13.Frezza M, Hindo S, Chen D, Davenport A, Schmitt S, Tomco D, et al. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. Curr Pharm Des 2010;16(16):1813-25.

14. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Chromium, Nickel and Welding. International Agency for Research on Cancer 1990;49.

15.Guo X, Zhang Y, Zhang Q, Fa P, Gui Y, Gao G, et al. The regulatory role of nickel on H3K27 demethylase JMJD3 in kidney cancer cells. Toxicol Ind Health 2016;32(7):1286-92.

16.Wu CH, Hsiao YM, Yeh KT, Tsou TC, Chen CY, Wu MF, et al. Upregulation of microRNA-4417 and Its Target Genes Contribute to Nickel Chloride-promoted Lung Epithelial Cell Fibrogenesis and Tumorigenesis. Sci Rep 2017;7(1):15320.

17.Xu Z, Ren T, Xiao C, Li H, Wu T. Nickel promotes the invasive potential of human lung cancer cells via TLR4/MyD88 signaling. Toxicology 2011;285(1-2):25-30.

18.Guo H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Wang X, et al. Nickel chloride ($NiCl_2$) in hepatic toxicity: apoptosis, G2/M cell cycle arrest and inflammatory response. Aging (Albany NY) 2016;8(11):3009-3027.

19.Terpilowska S, Siwicka-Gieroba D, Siwicki AK. Cell Viability in Normal Fibroblasts and Liver Cancer Cells After Treatment with Iron (III), Nickel (II), and their Mixture. J Vet Res 2018;62(4):535-542.

20.D'Anto V, Valletta R, Amato M, Schweikl H, Simeone M, Paduano S, et al. Effect of nickel chloride on cell proliferation. Open Dent J 2012;6:177-81.

21.Dubreuil A. BG, Duret S., Mestre JC., Boudene C. In Vitro Cytotoxicity of Nickel Chloride on a Human Pulmonary Epithelial Cell Line (A 549). Berlin, Heidelberg.: Springer; 1984.

22.Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011;144(5):646-74.