



Katedra Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa
Wydział Bioinżynierii Zwierząt
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

XLV Sesja Naukowa Sekcji Żywienia Zwierząt
Komitetu Nauk Zootechnicznych i Akwakultury
Polskiej Akademii Nauk

Olsztyn, 21-22 czerwca 2016 r.

**NANOCZĄSTKI MIEDZI JAKO STYMULATOR AKTYWNOŚCI
METABOLICZNEJ DROBIU. BADANIA NA MODELU ZARODKA KURY**

Sawosz E.,^{1*} Łukasiewicz M.,² Mroczek N.,² Niemiec J.,² Łozicki A., Jaworski S.,¹ Kurantowicz N.,¹
Chwalibóg A.¹

¹*Katedra Żywienia i Biotechnologii Zwierząt,*

²*Katedra Szczegółowej Hodowli Zwierząt, Zakład Hodowli Drobiu/SGGW,
Warszawa, Ciszewskiego 8; *ewa_sawosz@sggw.pl*

Wstęp Miedź jest niezbędnym mikroelementem w żywieniu zwierząt, a przede wszystkim stanowi centrum aktywne wielu enzymów. Cu jest katalitycznym i strukturalnym centrum enzymów, które uczestniczą w procesie wytwarzania energii, przemianach żelaza, transporcie tlenu, krzepnięciu krwi, transdukcji sygnału w komórce i wielu innych procesach. Cu jest głównie zaangażowana w angiogenezę jako stymulator rozwoju naczyń, waskulogenezy i migracji komórek śródbłonna [1]. Cu wpływa na ekspresję czynników wzrostu, takich jak czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) oraz czynnik wzrostu fibroblastów 2 (FGF2), [2]. Nanocząstki miedzi (<100 nm) mogą zwiększać efektywność aktywacji angiogenezy, w porównaniu z solami Cu w wyniku innego mechanizmu transportu - „cell to cell” i jako źródło powoli uwalnianych się jonów Cu. Celem badania była ocena wpływu nanocząstek miedzi na mechanizm angiogenezy na poziomie systemowym i molekularnym, w stosunku do soli Cu, w doświadczeniach z użyciem modelu zarodka kury.

Materiały i metody Jaja kur (Ross x Ross 308) podzielono losowo na cztery grupy (4 x 100 jaj); 1. Kontrolna, 2. Placebo (PBS), 3. CuSO₄, 4. NanoCu (koloid nanocząstek Cu). W 1 dniu inkubacji jaja zważono i wstrzykiwano 0,3 ml badanych roztworów do komory powietrznej jaja. Jaja inkubowano przez 20 dni w standardowych warunkach. Stan rozwoju embrionów kury porównano z etapami rozwoju opisanymi przez H & H. Sieć naczyń krwionośnych błony kosmówkowo-omoczniowej (CAM) oceniano w dniu 9 i 12. W dniu 18 i 20 pobrano próbki mięśni piersiowych i oznaczono ekspresję mRNA wybranych genów metodą RT-PCR.

Wyniki Rozwój zarodka kury w dniach 3, 6, 9, 12, 15, 18 i 20 inkubacji porównano ze standardem H&H. Wszystkie zarodki były normalnie rozwinięte i nie stwierdzono żadnych wad genetycznych. Ocena rozwoju zarodków w dniu 9 wykazała, że rozwój naczyń krwionośnych był bardziej intensywny w grupie NanoCu niż w grupie CuSO₄, a gęstość sieci naczyń była większa niż w grupie kontrolnej. W dniu 20 obserwowano zwiększenie ekspresji mRNA FGF2 w grupie otrzymującej CuSO₄ i w większym stopniu w grupie traktowanej NanoCu. Zwiększenie poziomu ekspresji FGF2 było około pięć razy większe w grupie CuSO₄ i siedmio-krotnie większe w grupie NanoCu niż w grupie kontrolnej. W dniu 20, ekspresja MyoD1 była istotnie wyższa w mięśniach zarodków traktowanych NanoCu i CuSO₄ w porównaniu do grupy kontrolnej.

Podsumowanie W świetle badań rozwoju sieci naczyń krwionośnych zarodka kury na poziomie systemowym, można stwierdzić, że NanoCu stymuluje angiogenezę w stopniu większym niż CuSO₄. Ponadto, analiza markerów molekularnych wskazuje, że dodatek NanoCu jak też CuSO₄ do zarodka kury wpływa na zwiększenie ekspresji mRNA genów zaangażowanych w proces angiogenezy i proliferacji komórkowej. Może to sugerować, że poziom zmagazynowanego Cu w jajach jest niewystarczający dla rozwijającego się embriona. Ponadto NanoCu ma większy wpływ na ekspresję mRNA genu FGF niż CuSO₄, co może wskazywać na inny mechanizm sygnalizacji, jak również bardziej efektywną sekwestrację Cu w komórkach mięśniowych.

1. Kim, B.-E.; Nevitt, T.; Thiele, D.J. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat. Chem. Biol.* 2008, 4, 176–185.

2. Finney, L.; Vogt, S.; Fukui, T.; Glesne, D. Copper and angiogenesis: Unravelling a relationship key to cancer progression. *Clin. Exp. Pharmacol. Phys.* 2009, 36, 88–89.

Badania prowadzono w ramach projektu BIOSTRATEG1/267659/NCBR/2015 “Gutfeed”.

**NANOPARTICLES OF COPPER AS A STIMULATOR OF METABOLIC
ACTIVITIES IN POULTRY. EXPERIMENTS ON CHICKEN EMBRYO
MODEL**

Sawosz E.,^{1*} Łukasiewicz M.,² Mroczek N.,² Niemiec J.,² Łozicki A., Jaworski S.,¹ Kurantowicz N.,¹
Chwalibóg A.¹

¹*Department of Animal Nutrition and Biotechnology,*

²*Department of Animal Breeding, Division of Poultry Breeding, WULS,
Warszawa, Ciszewskiego 8; *ewa_sawosz@sggw.pl*

Introduction Copper is an essential microelement required by animals, mainly is an active center of many enzymes. Cu serves as a catalytic and structural cofactor for enzymes that function in energy generation, is involved in iron acquisition, oxygen transport, cellular metabolism, blood clotting, signal transduction and a host of other processes [1]. Cu is essentially involved in angiogenesis as a stimulator of angiogenesis, vasculogenesis and endothelial cell migration [2]. Cu affects the expression of growth factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) as well as fibroblast growth factor 2 (FGF2) [4]. Nanoparticles of copper (< 100 nm) may more efficiency activate angiogenesis in comparison of Cu salts because of a “cell to cell” mechanism of transport and source of slowly releasing Cu ions. The objective of this study was to evaluate the influence of nanoparticles of copper on angiogenesis at the systemic and molecular level in comparison to Cu salt, in experiments using a chick embryo model.

Materials and Methods Chicken eggs (Ross × Ross 308) were randomly divided into four groups (4 × 100 eggs): no injection (control), injected with phosphate buffered saline (PBS) as a placebo, or injected with solutions of CuSO₄ (CuSO₄) or hydrocolloid of nanoparticles of copper (NanoCu). At day 1 of incubation, the eggs were weighed and 0.3 mL of experimental fluids was into the air sac. The eggs were incubated for 20 days under standard conditions. The developmental status of the chick embryos was compared with the developmental stages described by H&H. The network of blood vessels in the chorioallantoic membrane (CAM) was evaluated at day 9 and day 12. At day 18 six samples of the breast muscle were collected for mRNA expression analysis.

Results Chicken embryo development, at day 3, 6, 9, 12, 15, 18 and 20 of incubation, was compared with the Hamburger–Hamilton normal stages of chicken embryo development. All embryos developed normally and no genetic or other defects were detected. Evaluation of the development of the embryos at day 9 showed that the development of blood vessels was more intense in the NanoCu group than in the CuSO₄ group and much denser than in the control group. At day 20, *FGF2* was upregulated by CuSO₄, and to a greater extent by NanoCu. *FGF2* expression was about five-fold higher in CuSO₄ and seven-fold higher in the NanoCu group than in the control group. At day 20, *MyoD1* expression was significantly higher in the embryos treated with NanoCu and even higher (three-fold higher) in the CuSO₄ than in the control group.

Summary In the light of examination of vessel network development at the systemic level, the present results show that NanoCu stimulate angiogenesis more than CuSO₄. Moreover, the molecular responses demonstrate that NanoCu as well as CuSO₄ affect the mRNA expression of genes involved in angiogenesis and cell proliferation. This may indicate that the level of Cu stored in the egg is insufficient, notably at the end of embryogenesis. Furthermore, NanoCu have a stronger effect on mRNA gene expression than CuSO₄, which may point to a different mechanism of signaling, as well on more efficient sequestration within muscle cells.

1. Kim, B.-E.; Nevitt, T.; Thiele, D.J. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat. Chem. Biol.* 2008, 4, 176–185.
2. Finney, L.; Vogt, S.; Fukai, T.; Glesne, D. Copper and angiogenesis: Unravelling a relationship key to cancer progression. *Clin. Exp. Pharmacol. Phys.* 2009, 36, 88–89.

This work was supported by grant BIOSTRATEG1/267659/NCBR/2015 “Gutfeed”.