

EFFECTS OF COPPER NANOPARTICLES ON THE MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL CHANGES IN CHICKEN

Nguyen Thi Xuan^{1,2}, Phi Thi Thu Trang¹, Le Thi Thu Hien^{1,2,*}

¹Institute of Genome Research, VAST, Vietnam

²Graduate University of Science and Technology, VAST, Vietnam

Received 22 January 2019, accepted 5 March 2019

ABSTRACT

Copper nanoparticles (nCu) have a wide range of applications in many different fields of life. In poultry farming, nCu is well-known as a feed additive to stimulate the development, a good antimicrobial agent and a suppressor of diarrhea. The aim of this study is to perform the analysis of biosafety of nCu. In this study, chickens were treated with drinking water containing 2 mg/L or 1,000 mg/L nCu. After 5 weeks of treatment, the survival rate, dry body weight, Cu content in serum and liver tissues of chickens were examined. Liver and kidney functions were also determined by measuring serum levels of ALT, AST, and creatinine. As a result, chickens treated with drinking containing 2 mg/L nCu had no changes in liver and kidney functions as well as their body weights. However, treatment of chickens with 1,000 mg/L nCu caused accumulation of Cu in the serum and liver and increase of the serum levels of ALT and AST compared with control group. Apparently they sick and did not develop properly. In conclusion, nCu concentration at 2 mg/L may be recommended for the agricultural, feed and medicine formulations to meet biological safety.

Keywords: ALT, AST, creatinine, nCu, chicken.

Citation: Nguyen Thi Xuan, Phi Thi Thu Trang, Le Thi Thu Hien, 2019. Effects of copper nanoparticles on the morphological and physiological changes in chicken. *Tap chi Sinh hoc*, 41(2): 71–78. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v41n2.13581>.

*Corresponding author email: hienlethu@igr.ac.vn

©2019 Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ ẢNH HƯỞNG CỦA DUNG DỊCH NANO ĐỒNG TRÊN GÀ

Nguyễn Thị Xuân^{1,2}, Phí Thị Thu Trang¹, Lê Thị Thu Hiền^{1,2,*}

¹Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam

Ngày nhận bài 22-1-2019, ngày chấp nhận 5-3-2019

TÓM TẮT

Nano đồng (nCu) được sử dụng phổ biến trong nhiều lĩnh vực như trồng trọt, chăn nuôi và y học. Trong chăn nuôi, nCu có vai trò như là một phụ gia kích thích tăng trưởng, kháng khuẩn và ngăn ngừa tiêu chảy. Trong nghiên cứu này, gà được thử nghiệm bằng cách cho uống dung dịch nước nCu với nồng độ 2 mg/L và 1.000 mg/L. Sau 5 tuần thử nghiệm, gà được đánh giá tỷ lệ nuôi sống, khối lượng, hàm lượng Cu có trong huyết tương và mô gan và chỉ số sinh hóa ALT, AST và creatinine có trong huyết tương. Kết quả cho thấy, nCu nồng độ 2 mg/L không ảnh hưởng tới chức năng sinh lý ở gà. Tuy nhiên, lượng nCu 1.000 mg/L gây tổn thương Cu và tăng nồng độ ALT và AST trong máu làm rối loạn quá trình sinh lý ở trong cơ thể khiến cho gà ốm yếu, chậm phát triển.

Từ khóa: ALT, AST, creatinine, nano đồng.

*Địa chỉ liên hệ email: hienlethu@igr.ac.vn

MỞ ĐẦU

Ngày nay, các nghiên cứu khoa học về hạt nano đã có những tiến bộ vượt bậc và nhanh chóng nhờ những ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như điện tử, mỹ phẩm, nông nghiệp, công nghiệp thực phẩm, y học và các lĩnh vực khác (Suh et al., 2009). So với các loại kim loại thường có kích thước lớn, hạt nano có các đặc tính sinh học, vật lý và hóa học ưu việt thuận lợi cho quá trình trao đổi chất của sinh vật, hoạt động của các enzyme trong cơ thể và khả năng hấp thụ các nguyên tố khoáng nên các loại hạt nano có tiềm năng ứng dụng cao (Aillon et al., 2009). Hạt nano bạc được sử dụng trong phòng và tiêu diệt nấm, vi khuẩn gây bệnh gia súc, gia cầm (Dobrzanski, 2010).

Để ngăn ngừa bệnh tiêu chảy, kích thích tăng trưởng và làm tăng sức đề kháng của lợn, thức ăn thường được bổ sung Zn dưới dạng

ZnO (You, 2012). Tuy nhiên, hạt nano có kích thước nhỏ cũng có thể xâm nhập vào cơ thể thông qua đường hô hấp, hấp thụ hoặc tiếp xúc qua da, tiếp cận các màng sinh học, tế bào, mô và phá hủy cấu trúc DNA, hay làm chết tế bào (Khan et al., 2015). Cùng với những ứng dụng rộng rãi của hạt nano trong nhiều lĩnh vực của đời sống, nhiều nghiên cứu đã tập trung vào việc đánh giá ảnh hưởng của hạt nano đến sức khỏe con người và môi trường.

Đồng (Cu) là một nguyên tố vi lượng cần thiết trong chức năng sinh lý bình thường ở cơ thể người, động vật và thực vật bao gồm sự hình thành hemoglobin, chuyển hóa thuốc, chuyển hóa carbohydrate, sinh tổng hợp catecholamine và chống lại quá trình oxy hóa (Uauy et al., 1998). Hiện nay, nano Cu (nCu) đã được sử dụng rộng rãi và khẳng định được vai trò quan trọng trong nông nghiệp, đặc biệt là khả năng tiêu diệt nấm và các vi khuẩn gây bệnh. Bên cạnh đó, hạt oxit Cu hoạt động như

chất kháng khuẩn tiềm năng chống lại các vi sinh vật truyền bệnh như *Syphillis typhus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibria cholera* (Cho et al., 2012; Bondarenko et al., 2013). Vì vậy, các hạt nCu và nCu oxide được ứng dụng rộng rãi trong ngành y sinh học và làm chất phụ gia trong thức ăn chăn nuôi. Tuy nhiên, nồng độ Cu tích lũy vượt quá mức cho phép sẽ gây ảnh hưởng tới cơ thể như gây phản ứng viêm, tán huyết, đau dạ dày và tổn thương chức năng ở gan và thận (Galhardi et al., 2004).

Mặc dù việc ứng dụng hạt nCu trong y sinh có một tiềm năng lớn, nhưng các nghiên cứu về độc tính của hạt nCu và Cu oxide chủ yếu được thực hiện trong phòng thí nghiệm. Các nghiên cứu cho thấy các hạt nCu ở nồng độ cao gây độc trên các dòng tế bào khác nhau (Cho et al., 2012). Một số nghiên cứu khác cũng chỉ ra sự dư thừa Cu trong cơ thể cũng có thể gây phản ứng viêm do kích thích các phân tử tín hiệu trung gian như yếu tố nhân kappa B (NF- κ B) (Li et al., 2017), dẫn đến sự xâm nhập và kích hoạt các tế bào miễn dịch ở các cơ quan bị viêm (Chen et al., 2015). Sau khi được kích hoạt, các tế bào miễn dịch sản sinh một lượng lớn các chất trung gian và các cytokin gây viêm làm tổn thương lâm sàng các loại mô sống khác nhau (Xuan et al., 2015). Các hạt nCu dư thừa trong cơ thể động vật làm cho nồng độ ALT (alanine transaminase) và AST (aspartate transaminase) ở gan và nồng độ creatinine ở thận tăng hoặc giảm bất thường dẫn đến sự tổn thương trầm trọng của hai cơ quan này (Meng et al., 2007). Sự tích tụ của Cu trong hệ thống tuần hoàn máu và các cơ quan khác trong cơ thể có thể gây ra chứng rối loạn trong quá trình phát triển. Vì vậy, cần nghiên cứu mức độ an toàn sinh học của Cu với mục đích dùng làm thức ăn chăn nuôi với các liều lượng khác nhau (Subramanian et al., 2002; Worthington et al., 2013).

Trong nghiên cứu này, dung dịch nCu được đánh giá an toàn trực tiếp trên gà bằng cách cho uống với nồng độ 2 mg/L và 1.000 mg/L. Sự phát triển thể trạng, sự tích lũy Cu trong gan và huyết tương cũng như các chỉ số sinh hóa gan, thận của gà được phân

tích nhằm đánh giá mức độ an toàn sinh học của dung dịch nCu khi sử dụng trực tiếp với nồng độ khác nhau.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sử dụng dung dịch nCu ở các nồng độ 2 mg/L và 1.000 mg/L do Viện Công nghệ môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp, trong đó các hạt nCu có kích thước khoảng 25–30 nm được làm tan đều trong nước bằng máy siêu âm (Ngo et al., 2014). Nồng độ 2 mg/L thuộc ngưỡng nồng độ thấp được đơn vị sản xuất (Viện Công nghệ môi trường) khuyến cáo sử dụng cho các ứng dụng trong nông nghiệp. Nồng độ 1.000 mg/L thuộc ngưỡng nồng độ cao (gấp 500 lần) được sử dụng để so sánh, đánh giá an toàn hay tác động bất lợi của sản phẩm. Nghiên cứu được thực hiện trên 54 con gà Ri 7 ngày tuổi mua tại Công ty Hạt thóc vàng, Hà Nội.

Đánh giá khả năng sinh trưởng của gà

Gà thử nghiệm được nuôi bằng gạo, ngô với quy trình chăm sóc, nuôi dưỡng và phòng bệnh thực hiện theo khuyến cáo của Trung tâm Nghiên cứu Gia cầm Thụy Phương, Viện Chăn nuôi. Gà được nuôi đến khi có khối lượng mỗi con tương đối đồng đều, khoảng 1,1 kg, có thể chất khỏe mạnh, không bệnh tật, được lựa chọn và chia đều vào 3 lô, mỗi lô gồm 18 con. Lô 1 là nhóm đối chứng (ĐC) cho ăn thức ăn và nước uống bình thường. Lô 2 là nhóm thí nghiệm 1 (TN1): xử lý gà bằng cách cho uống dung dịch nCu với nồng độ 2 mg/L. Lô 3 là nhóm thí nghiệm 2 (TN2): xử lý gà bằng cách cho uống dung dịch nCu với nồng độ 1.000 mg/L. Số gà ở mỗi lô được chia đều vào 3 ô chuồng. Dung dịch nước uống được thay mới hàng ngày sau 12 giờ. Thời gian tiến hành thí nghiệm là 5 tuần. Kết thúc thí nghiệm, gà được đánh giá tỷ lệ nuôi sống, tỷ lệ ốm/chết và khối lượng cơ thể. Sau đó, gà được mổ để đánh giá cảm quan và cân khối lượng từng bộ phận gan và thận.

Xét nghiệm sinh hóa đối với huyết tương

Gà được thu mẫu máu (2 mL/con) và giữ trong ống EDTA. Mẫu máu ly tâm ở 5.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để thu huyết

tương và bảo quản ở (-)20°C cho đến khi tiến hành thí nghiệm đo chỉ số sinh hóa ALT, AST và creatinine.

Các xét nghiệm sinh hóa đối với huyết tương gà được thực hiện trên máy phân tích sinh hóa tự động Hitachi 7180 Biochemistry Automatic Analyser (Hitachi Ltd., Nhật Bản) bao gồm xác định nồng độ AST, ALT và creatinine.

Xác định hàm lượng kim loại Cu có trong mô gan và huyết tương gà

Hàm lượng Cu có trong mô gan và huyết tương gà được phân tích bằng máy khối phổ plasma cao tần (ICP-MS) của Hãng Agilent Technologies (Hoa Kỳ). Mẫu được sử dụng với khối lượng như nhau ở các điều kiện thí nghiệm và được phân hủy bởi dung dịch 67% HNO₃ và 30% H₂O₂ được đóng trong túi thủy tinh nhỏ. Sau 2 ngày, mỗi dung dịch phân hủy thu được đem đun ở nhiệt độ 80°C để làm bay hơi lượng acid còn trong dung dịch, bổ sung acid nitric 2% vào mẫu có chứa mô gan gà để đạt thể tích 10 mL và mẫu có chứa huyết tương để đạt thể tích 1 mL. Hàm lượng Cu có trong các mẫu được phân tích bằng hệ thống ICP-MS.

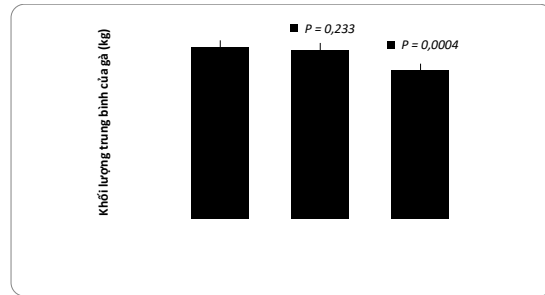
Kết quả của nghiên cứu được xử lý thống kê theo phương pháp student *t-test* hoặc ANOVA. Sự khác biệt có ý nghĩa khi giá trị của *P* < 0,05.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đánh giá tỷ lệ nuôi sống và sự thay đổi thể trọng của gà

Trong quá trình thử nghiệm, gà được theo dõi đánh giá về hình thái cũng như hoạt động

tại các lô thử nghiệm. Kết quả cho thấy, trong quá trình nuôi, gà tại lô TN1 và lô ĐC đều ăn uống, hoạt động, có phân và nước tiểu bình thường, không có biểu hiện ủ rũ, kém ăn. Tuy nhiên, khi đánh giá biểu hiện của gà tại lô TN2, gà sau uống nước chứa nCu hàm lượng 1.000 mg/L có biểu hiện ăn kém hơn so với hai lô còn lại.



Hình 1. Khối lượng của gà sau 5 tuần cho uống nước có chứa dung dịch nCu ở các lô thử nghiệm

Về tỷ lệ nuôi sống của gà, kết quả sau 5 tuần thí nghiệm cho thấy, trong 3 lô thử nghiệm, mỗi lô đều có 1 con bị chết vào tuần thứ 2 của đợt thử nghiệm. Sau 5 tuần thử nghiệm, khối lượng của 17 con gà trong mỗi lô thử nghiệm được đánh giá (bảng 1).

Kết quả phân tích thống kê cho thấy, sự thay đổi cân nặng của các cá thể gà ở lô TN1 và lô ĐC không có sự khác biệt (*P* = 0,233 > 0,05). Tuy nhiên, khi so sánh trọng lượng của gà ở lô TN2 và lô ĐC, chúng tôi thấy có sự khác biệt rõ rệt, khối lượng của gà ở lô TN2 thấp hơn so với gà ở lô ĐC (*P* = 0,0004 < 0,05).

Bảng 1. Khối lượng của gà sau 5 tuần cho uống nước chứa nCu từ các lô thử nghiệm

Lô	Khối lượng trung bình (kg)		Khối lượng thay đổi trung bình sau 5 tuần nuôi
	Ban đầu	Sau 5 tuần nuôi	
ĐC	1,100 ± 0,050	1,715 ± 0,019	0,615 ± 0,076
TN1	1,110 ± 0,016	1,688 ± 0,047	0,578 ± 0,045
TN2	1,150 ± 0,025	1,482 ± 0,108	0,332 ± 0,059

Kết quả trên cho thấy, sau 5 tuần thử nghiệm, gà tại lô TN 2 chậm phát triển hơn so

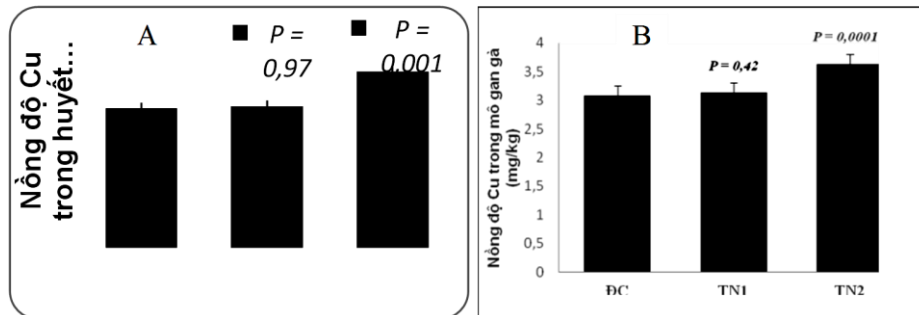
với gà ở lô TN 1 và lô ĐC. Điều này có thể được giải thích do gà được uống nước chứa nCu

ở nồng độ 1.000 mg/L có thể ảnh hưởng đến quá trình chuyển hóa trong cơ thể và sự phát triển của gà. Để đánh giá, chúng tôi tiến hành thu thập máu ngoại biên để tách huyết tương, thu gan và thận trong cơ thể gà thử nghiệm.

Xác định hàm lượng Cu trong huyết tương và gan gà

Để xác định nguyên nhân chính khiến gà chậm tăng cân hơn so với bình thường, chúng tôi đã tiến hành đo hàm lượng Cu có trong huyết tương gà bằng phương pháp ICP-MS. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra sự tích lũy Cu vượt mức cho phép trong các cơ quan của cơ thể có ảnh hưởng đến quá trình sinh lý của động vật và là nguyên nhân dẫn đến một số căn bệnh nguy hiểm (Galhardi et al., 2004; Rout et al., 2013). Hiện nay, một số công bố cho thấy khi tăng nhẹ nồng độ Cu trong thức ăn có thể làm giảm nồng độ cholesterol và triglyceride trong máu của gà (Rahman et al., 2001; Skrivanova, 2004), nhưng hàm lượng nano Cu trong huyết tương tăng có thể làm tăng nồng độ calcium (Ca), phosphorus (P) và sắt (Fe) có trong gà thịt (Mroczek-Sosnowska

et al., 2013). Tương tự, thể trọng của gà, hàm lượng Cu có trong huyết tương (A) và gan (B) ở gà trong TN1 so với lô ĐC không có sự khác biệt (hình 2). Các nghiên cứu trước đây cũng đã chỉ ra khi cho gà uống nước chứa Cu có hàm lượng từ 5 đến 15 mg/L sẽ không gây ảnh hưởng tới nồng độ Cu có trong huyết tương gà (Ognik et al., 2016). Tuy nhiên, ở TN2, khi cho gà uống nước chứa nCu nồng độ 1.000 mg/L, hàm lượng Cu tích lũy trong huyết tương (A) và gan (B) tăng đáng kể so với nhóm đối chứng ($P < 0,05$), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê. Vì vậy, khi cho gà uống nước chứa nCu nồng độ 1.000 mg/L gây ra hiện tượng ứ đọng Cu trong huyết tương và gan gà. Điều này dẫn tới bệnh lý khiến gà kém ăn, quá trình hấp thu các chất dinh dưỡng bị ảnh hưởng và gà phát triển và tăng trưởng chậm. Các nghiên cứu trước đây cũng cho thấy việc cho gà uống nước chứa nCu có hàm lượng cao sẽ khiến nồng độ Cu có trong huyết tương tăng cao, khiến Cu tích tụ trong ruột làm giảm khả năng hấp thụ Ca và kẽm (Zn) trong cơ thể gà (Ognik et al., 2016).



Hình 2. Nồng độ Cu trong huyết tương (A) và gan (B) gà đo được khi gà uống nước nCu ở các lô thử nghiệm

Đánh giá hình thái và chức năng gan, thận của gà

Sau khi thu thập mẫu mô gan, thận của gà, chúng tôi tiến hành đánh giá hình thái và khối lượng của mẫu gan gà thử nghiệm. Về hình thái và kích thước, kết quả cho thấy không có sự khác biệt giữa 3 lô gà thử nghiệm. Tương tự, khối lượng của gan và thận ở lô gà thử nghiệm ở TN1 và TN2 so với lô ĐC cũng không có sự khác biệt ($P > 0,05$) (bảng 2).

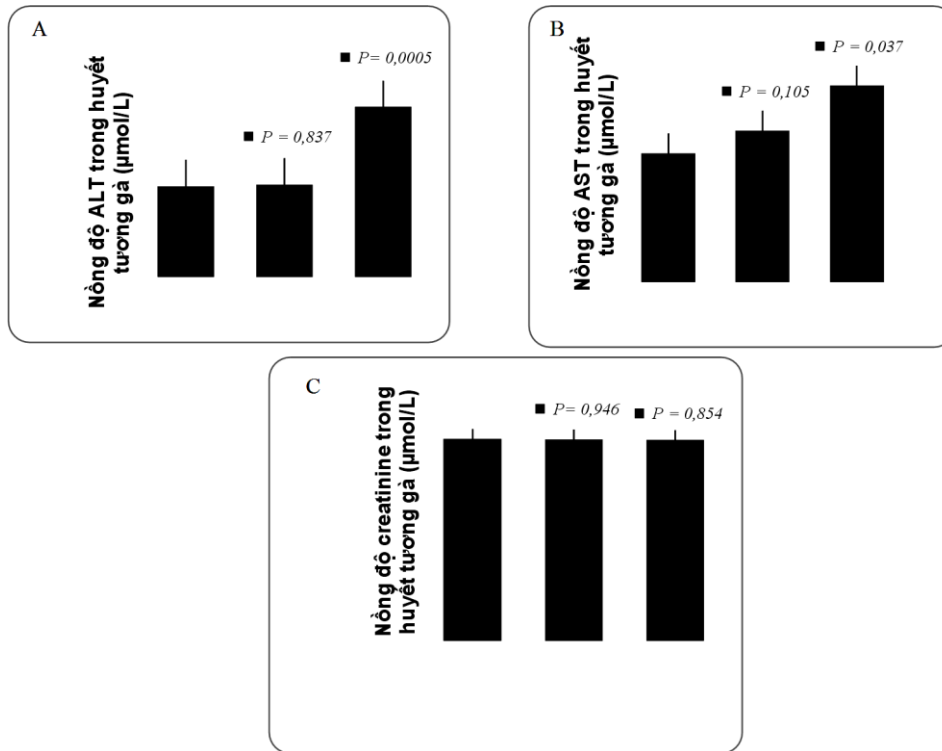
Để đánh giá mức độ tổn thương gan và thận ở gà, chúng tôi đã tiến hành phân tích các chỉ số sinh hóa ALT, AST và creatinine trong mẫu huyết tương. Kết quả cho thấy, tại lô TN1 khi so sánh với lô ĐC nồng độ ALT, AST gần như không thay đổi (hình 3A, 3B). Ở lô TN2, khi gà được uống nước chứa dung dịch nCu có nồng độ 1.000 mg/L, nồng độ enzyme ALT, AST cao hơn rất nhiều so với lô ĐC, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($P <$

0.05). Như vậy, chức năng gan của gà bị ảnh hưởng sau 5 tuần cho gà uống nước chứa dung dịch nCu có nồng độ 1.000 mg/L. Kết quả này tương tự với kết luận của Uauy et al.

(2008) đã chỉ ra việc sử dụng nCu có hàm lượng 1.000 mg/L sẽ gây tổn thương chức năng gan.

Bảng 2. Khối lượng của gan, thận gà ở các lô thử nghiệm

Lô	Gan		Thận	
	Khối lượng (g)	Giá trị P	Khối lượng (g)	Giá trị P
ĐC	13,56 ± 0,41		4,145 ± 0,634	
TN1	12,25 ± 0,86	0,278	4,048 ± 0,966	0,864
TN2	11,86 ± 0,77	0,334	4,143 ± 0,204	0,995



Hình 3. Nồng độ enzyme ALT (A), enzyme AST (B) và creatinine (C) trong huyết tương gà ở các lô thử nghiệm

Ngoài ra, để đánh giá chức năng thận của gà, chúng tôi đã đo hàm lượng creatinine có trong huyết tương gà. Kết quả cho thấy, không có sự khác biệt về hàm lượng creatinine giữa các lô thí nghiệm và lô ĐC ($P > 0,05$) (hình 3C). Như vậy, khi gà uống nước chứa dung dịch nCu có nồng độ 2 mg/L và 1.000 mg/L chưa gây ảnh hưởng đến chức năng thận của gà sau 5 tuần thử nghiệm.

KẾT LUẬN

Việc sử dụng trực tiếp dung dịch nCu trong chăn nuôi gà với hàm lượng 2 mg/L không gây ảnh hưởng đến thể trọng, hình thái cũng như chức năng gan, thận gà. Tuy nhiên, sử dụng nCu với hàm lượng cao 1.000 mg/L có thể gây tổn thương gan do hàm lượng Cu ứ đọng trong máu và gan cao gây ra các rối loạn sinh lý trong cơ thể gà, khiến chúng chậm

phát triển. Nghiên cứu về ảnh hưởng nCu trong khẩu phần nước uống tới chức năng sinh lý của gà thử nghiệm góp phần tăng cường hiểu biết về cơ chế bệnh sinh gây ra do tác động từ sự tích lũy quá cao của Cu trong cơ thể, đây là cơ sở để sử dụng nCu như một chất phụ gia với nồng độ thích hợp phục vụ chăn nuôi, trồng trọt hay chăm sóc sức khỏe y tế cộng đồng.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện dưới sự hỗ trợ kinh phí của Dự án Khoa học công nghệ trọng điểm cấp Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ nano trong nông nghiệp”; Hợp phần IV: “Nghiên cứu cơ chế tác động và đánh giá an toàn sinh học của các chế phẩm nano được nghiên cứu trong dự án”, mã số: VAST.TĐ.NANO.04/15–18.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aillon K. L., Xie Y., El-Gendy N., Berkland C. J., Forrest M. L., 2009. Effects of nanomaterial physicochemical properties on *in vivo* toxicity. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 61: 457–466.
- Bondarenko O., Juganson K., Ivask A., Kasemets K., Mortimer M., Kahru A., 2013. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells *in vitro*: a critical review. *Arch. Toxicol.*, 87: 1181–1200.
- Chen G. F., Sudhakar V., Youn S. W., Das A., Cho J., Kamiya T., Urao N., McKinney R. D., Surenkhuu B., Hamakubo T., Iwanari H., Li S., Christman J. W., Shantikumar S., Angelini G. D., Emanuelli C., Ushio-Fukai M., Fukai T., 2015. Copper transport protein antioxidant-1 promotes inflammatory neovascularization via chaperone and transcription factor function. *Sci. Rep.*, 5: 14780.
- Cho W. S., Duffin R., Poland C. A., Duschl A., Oostingh G. J., Macnee W., Bradley M., Megson I. L., Donaldson K., 2012. Differential pro-inflammatory effects of metal oxide nanoparticles and their soluble ions *in vitro* and *in vivo*; zinc and copper nanoparticles, but not their ions, recruit eosinophils to the lungs. *Nanotoxicology*, 6: 22–35.
- Dobrzanski Z. Z. K., Patkowska-Sokola B., Nowakowski P., Janczak M., Sobczak A., Bodkowski R., 2010. The effectiveness of nanosilver and mineral sorbents in the reduction of ammonia emissions from livestock manure. *Przemysł Chemiczny*, 4: 348–351.
- Galhardi C. M., Diniz Y. S., Faine L. A., Rodrigues H. G., Burneiko R. C., Ribas B. O., Novelli E. L., 2004. Toxicity of copper intake: lipid profile, oxidative stress and susceptibility to renal dysfunction. *Food. Chem. Toxicol.*, 42: 2053–2060.
- Khan S., Chauhan N., Yallapu M. M., Ebeling M. C., Balakrishna S., Ellis R. T., Thompson P. A., Balabathula P., Behrman S. W., Zafar N., Singh M. M., Halaweish F. T., Jaggi M., Chauhan S. C., 2015. Nanoparticle formulation of ormeloxifene for pancreatic cancer. *Biomaterials*, 53: 731–743.
- Li S., Zhao H., Wang Y., Shao Y., Li J., Liu J., Xing M., 2017. The inflammatory responses in Cu-mediated elemental imbalance is associated with mitochondrial fission and intrinsic apoptosis in *Gallus gallus* heart. *Chemosphere*, 189: 489–497.
- Meng H., Chen Z., Xing G., Yuan H., Chen C., Zhao F., Zhang C., Zhao Y., 2007. Ultrahigh reactivity provokes nanotoxicity: explanation of oral toxicity of nano-copper particles. *Toxicol. Lett.*, 175: 102–110.
- Mroczek-Sosnowska N., Batorska M., Lukasiewicz M., Wnuk A., Sawosz E., Jaworski S., Niemiec J., 2013. Effect of nanoparticles of copper and copper sulfate administered *in ovo* on hematological and biochemical blood markers of broiler chickens. *Ann. Warsaw Univ. of Life Sci.-SGGW, Anim. Sci.*, 52: 141–149.
- Ngo Q. B., Dao T. H., Nguyen H. C., Tran X. T., Nguyen T. V., Khuu T. D., Huynh T.

- H., 2014. Effects of nanocrystalline powders (Fe, Co, and Cu) on the germination, growth, crop yield and product quality of Soybean (DT-51). *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, 5(1):015016.
- Ognik K., Stepniowska A., Cholewinska E., Kozlowski K., 2016. The effect of administration of copper nanoparticles to chickens in drinking water on estimated intestinal absorption of iron, zinc, and calcium. *Poult. Sci.*, 95: 2045–2051.
- Rahman Z. U., Besbasi F., Afan A. M., Bengali E. A., Zendah M. I., Hilmy M., Mukhtar M. R., Jaspal S. A. S., Aslam N., 2001. Effects of copper supplement on haematological profiles and broiler meat composition. *Int. J. Agric. Biol.*, 203–205.
- Rout J. R., Ram S. S., Das R., Chakraborty A., Sudarshan M., Sahoo S. L., 2013. Copper-stress induced alterations in protein profile and antioxidant enzymes activities in the *in vitro* grown *Withania somnifera* L. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 19: 353–361.
- Skrivanova M. S., Marounek M., Tumova E., Sevcikova S., 2004. Influence of dietary vitamin E and copper on fatty acid profile and cholesterol content of raw and cooked broiler meat. *Czech J. Anim. Sci.*, 49: 71–79.
- Subramanian I., Vanek Z. F., Bronstein J. M., 2002. Diagnosis and treatment of Wilson's disease. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, 2: 317–323.
- Suh W. H., Suslick K. S., Stucky G. D., Suh Y. H., 2009. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Prog. Neurobiol.*, 87: 133–170.
- Uauy R., Maass A., Araya M., 2008. Estimating risk from copper excess in human populations. *Am. J. Clin. Nutr.*, 88: 867S–871S.
- Uauy R., Olivares M., Gonzalez M., 1998. Essentiality of copper in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 67: 952S–959S.
- Worthington K. L., Adamcakova-Dodd A., Wongrakpanich A., Mudunkotuwa I. A., Mapuskar K. A., Joshi V. B., Allan Guymon C., Spitz D. R., Grassian V. H., Thorne P. S., Salem A. K., 2013. Chitosan coating of copper nanoparticles reduces *in vitro* toxicity and increases inflammation in the lung. *Nanotechnology*, 24: 395101.
- Xuan N. T., Wang X., Nishanth G., Waisman A., Borucki K., Isermann B., Naumann M., Deckert M., Schluter D., 2015. A20 expression in dendritic cells protects mice from LPS-induced mortality. *Eur. J. Immunol.*, 45: 818–828.
- You Z. T., Hu H. C., Song J., Luan Z. S., 2012. Effects of nano zinc oxide on performance, diarrhea, intestinal microflora and permeability of weanling pigs. *Chin. J. Anim. Sci.*, 21: 43–46.