UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ LEKARSKI

Dziedzina Nauk Medycznych i Nauk o Zdrowiu

Dyscyplina: Nauki Medyczne

lek. Klaudia Katarzyna Kitala–Tańska

Rozprawa doktorska

Cykl publikacji powiązanych tematycznie

Wpływ zwiększonej podaży miedzi w różnych grupach wiekowych

The impact of an increased copper intake in different age groups

Praca wykonana w Katedrze Farmakologii i Toksykologii

Promotor: **dr hab. n. med. Michał S. Majewski, prof. UWM, Katedra Farmakologii i Toksykologii, Wydział Lekarski, Collegium Medicum, UWM w Olsztynie**

Olsztyn, 2024

Serdeczne podziękowania dla Mojego Promotora
dr. hab. n. med. Michała Majewskiego
za poświęcony czas, cenne wskazówki oraz wsparcie i cierpliwość.

Spis treści

SPIS PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ 4

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW 5

STRESZCZENIE.....7

SUMMARY.....9

1. WPROWADZENIE 10

2. CELE BADAWCZE 12

3. MATERIAŁ I METODY 13

a) Materiał 13

b) Metody 13

c) Analiza danych i statystyka.....16

4. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA 17

Wyniki.....17

a) Praca 1 17

b) Praca 2.....18

Dyskusja.....19

5. WNIOSKI.....22

6. PIŚMIENNICTWO 23

7. SPIS RYCIN.....25

8. ZGODA LOKALNEJ KOMISJI ETYCZNEJ 26

9. ANKIETA PRACY ZAWODOWEJ I NAUKOWEJ 27

10. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI.....28

11. KOPIA POŚWIADCZENIA DOROBKU NAUKOWEGO 37

SPIS PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Podstawą prezentowanej rozprawy doktorskiej jest spójny tematycznie zbiór dwóch oryginalnych prac opublikowanych w 2024 roku, o łącznej punktacji **IF: 9.600 i MNiSW/KBN: 280.** W obu pracach jestem pierwszym autorem.

Tytuł rozprawy doktorskiej: **Wpływ zwiększonej podaży miedzi w różnych grupach wiekowych.**

Spis publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej:

Praca 1: **Kitala–Tańska, K.,** Socha, K., Juśkiewicz, J., Krajewska–Włodarczyk, M., & Majewski, M. (2024). The Effect of an Elevated Dietary Copper Level on the Vascular Contractility and Oxidative Stress in Middle–Aged Rats. *Nutrients*, *16*(8), 1172. https://doi.org/10.3390/nu16081172

(IF[1]=4,800, pkt.[2] =140)

Praca 2: **Kitala–Tańska, K.,** Hanć, A., Juśkiewicz, J., & Majewski, M. (2024). Prolonged Copper Supplementation Modified Minerals in the Kidney, Liver and Blood, and Potentiated Oxidative Stress and Vasodilation of Isolated Aortic Rings in Young Wistar Rats. *Nutrients*, *16*(19), 3230. https://doi.org/10.3390/nu16193230

(IF[1]=4,800, pkt.[2] =140)

[1] Wskaźnik *Impact Factor* czasopisma w roku publikacji
[2] Punkty Ministra Edukacji i Nauki zgodne z rokiem opublikowania pracy

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW

AAS – atomowa spektrometria absorbcyjna (*ang. atomic absorption spectroscopy*)

ACL – pojemność antyoksydacyjna substancji rozpuszczalnych w lipidach (*ang. antioxidant capacity of lipid–soluble compounds*)

ACW – pojemność antyoksydacyjna substancji rozpuszczalnych w wodzie (*ang. antioxidant capacity of water–soluble compounds*)

AUC – pole powierzchni pod krzywą (*ang. area under the curve*)

CAT – Katalaza (*ang. Catalase*)

CCRC – krzywa kumulacyjna dawka–odpowiedź (*ang. cumulative concentration–response curve*)

COX – Cyklooksygenaza (*ang. Cyclooxygenase*)

DMSO – dimetylosulfotlenek (*ang. dimethyl sulfoxide*)

DP – receptor prostaglandyny D_2 (*ang. prostaglandin D_2 receptor*)

EP – receptor prostaglandyny E_2 (*ang. prostaglandin E_2 receptor*)

FP – receptor prostaglandyny F (*ang. prostaglandin F receptor*)

GAPDH – Dehydrogenaza aldehydu 3–fosfoglicerynowego (*ang. Glyceraldehyde–3–phosphate dehydrogenase*)

H_2O_2 – nadtlenek wodoru (*ang. hydrogen peroxide*)

HO–1 – Oksygenaza hemowa typu 1 (*ang. Heme oxygenase–1*)

iCAM–1 – cząsteczki adhezji (*ang. Intercellular Adhesion Molecule–1*)

MDA – aldehyd malonowy (*ang. malondialdehyde*)

NO – tlenek azotu (*ang. nitric oxide*)

NOS3 – endotelialna syntaza tlenku azotu (*ang. Nitric oxide synthase 3, endothelial NOS*)

$O_2^{\bullet-}$ – anionorodnik ponadtlenkowy (*ang. superoxide anion*)

PG – prostaglandyna (*ang. prostaglandin*)

ROS – reaktywne formy tlenu (*ang. reactive oxygen species*)

SD – odchylenie standardowe (*ang. standard deviation*)

SEM – standardowy błąd pomiaru (*ang. standard error of measurement*)

SNP – nitroprusydek sodu (*ang. sodium nitroprusside*)

SOD – Dysmutaza ponadtlenkowa (*ang. Superoxide dismutase*)

TAS – całkowity status antyoksydacyjny (*ang. total antioxidant status*)

TCP – tranylcypromina (*ang. tranylcypromine*)

TD–NMR – jądrowy rezonans magnetyczny w domenie czasu (*ang. time domain nuclear magnetic resonance*)

STRESZCZENIE

Miedź jest niezbędnym pierwiastkiem śladowym, pełniącym kluczową rolę w organizmach zwierząt i ludzi. Wyżej wymieniony metal odgrywa ważną rolę w procesach oddychania komórkowego, usuwania wolnych rodników, produkcji energii, rozwoju tkanki łącznej, metabolizmie żelaza, dojrzewaniu macierzy zewnątrzkomórkowej oraz sygnalizacji neuroendokrynnej. Co więcej, miedź pełni szczególną rolę w układzie krążenia. Tkanka mięśnia sercowego potrzebuje dużo więcej miedzi niż inne tkanki do skurczu, biosyntezy hormonów peptydowych, a także ochrony przed stresem oksydacyjnym.

Celem niniejszych prac badawczych była ocena wpływu zwiększonej podaży miedzi w diecie (w ilości 200% zalecanego dziennego spożycia) na dojrzały organizm w wieku średnim oraz na młody organizm wchodzący w wiek dorosły, w modelu szczurzym. Do realizacji wyżej wymienionego celu posłużyły następujące zadania badawcze: oznaczenie zawartości wybranych mikro i makroelementów w wątrobie, nerce i surowicy, analiza markerów poziomu stresu oksydacyjnego, badania funkcjonalne kurczliwości izolowanej aorty i serca.

Dzięki uzyskanym wynikom poszerzono dotychczasową wiedzę na temat wpływu miedzi na organizmy w różnych grupach wiekowych, co pozwoliło także na ustalenie poniższych wniosków:

1. W grupie młodych szczurów, wchodzących w wiek dorosły, zwiększona dawka miedzi w diecie nie zmieniła siły skurczu izolowanych pierścieni aorty piersiowej w wyniku działania noradrenaliny, w przeciwieństwie do szczurów w wieku średnim. Natomiast w obu grupach wiekowych zaobserwowaliśmy zwiększoną relaksację aorty w wyniku działania acetylocholiny.
2. W grupie młodych szczurów zwiększona dawka miedzi nie zmieniła istotnie parametrów stresu oksydacyjnego we krwi i sercu, w przeciwieństwie do szczurów w wieku średnim. Natomiast w obu grupach wiekowych zaobserwowaliśmy zwiększoną produkcję nadtlenku wodoru, tlenku azotu i anionorodnika ponadtlenkowego w aorcie piersiowej szczura.
3. W grupie młodych szczurów zaobserwowaliśmy istotne zmiany stężenia potasu, żelaza, wapnia i chromu w nerkach oraz magnezu w wątrobie.

4. W obu grupach wiekowych zaobserwowaliśmy zwiększony poziom miedzi we krwi i wątrobie, co może być istotne w kontekście opisanych regulacji funkcji naczyniowych.

Słowa kluczowe: cyclooksygenaza, makroelementy, miedź, mikroelementy, pierścienie aorty

SUMMARY

Copper is an essential trace element that plays a key role in animal and human organisms. The aforementioned metal plays an important role in the process of cellular respiration, removal of free radicals, energy production, development of connective tissue, iron metabolism, maturation of the extracellular matrix, and neuroendocrine signaling. Moreover, copper plays a special role in the circulatory system. Cardiac muscle tissue requires much more copper than other tissues for contraction, biosynthesis of peptide hormones, and protection against oxidative stress.

This research aimed to assess the effect of increased copper supply in a diet (in the amount of 200% of the recommended daily intake) on a mature organism in middle age and on a young organism entering adulthood in a rat model, as well as to organize the state of knowledge about the effect of this metal on the cardiovascular system. The following research tasks were used to achieve the above–mentioned goal: determination of the content of selected micro– and macroelements in the liver, kidney, and serum; analysis of markers of oxidative stress level, functional tests of contractility of isolated aorta and isolated heart.

The obtained results extended the knowledge on the influence of copper on organisms in different age groups, which also allowed us to establish the following conclusions:

1. In the group of young rats entering adulthood, an increased dose of copper in the diet did not change the contractile force of isolated aortic rings as a result of noradrenaline action, in contrast to middle–aged rats. However, in both age groups, we observed increased vessel relaxation as a result of acetylcholine addition.
2. In the group of young rats, an increased dose of copper did not significantly change the parameters of oxidative stress in the blood and heart, in contrast to middle–aged rats. However, in both age groups, we observed increased production of hydrogen peroxide, nitric oxide, and superoxide anion radicals in the thoracic aorta of the rats.
3. In the group of young rats, we observed significant changes in the concentration of potassium, iron, calcium and chromium in the kidneys and magnesium in the liver.
4. In both age groups, we observed increased copper levels in the blood and liver, which may be important in the context of the described regulating vascular functioning.

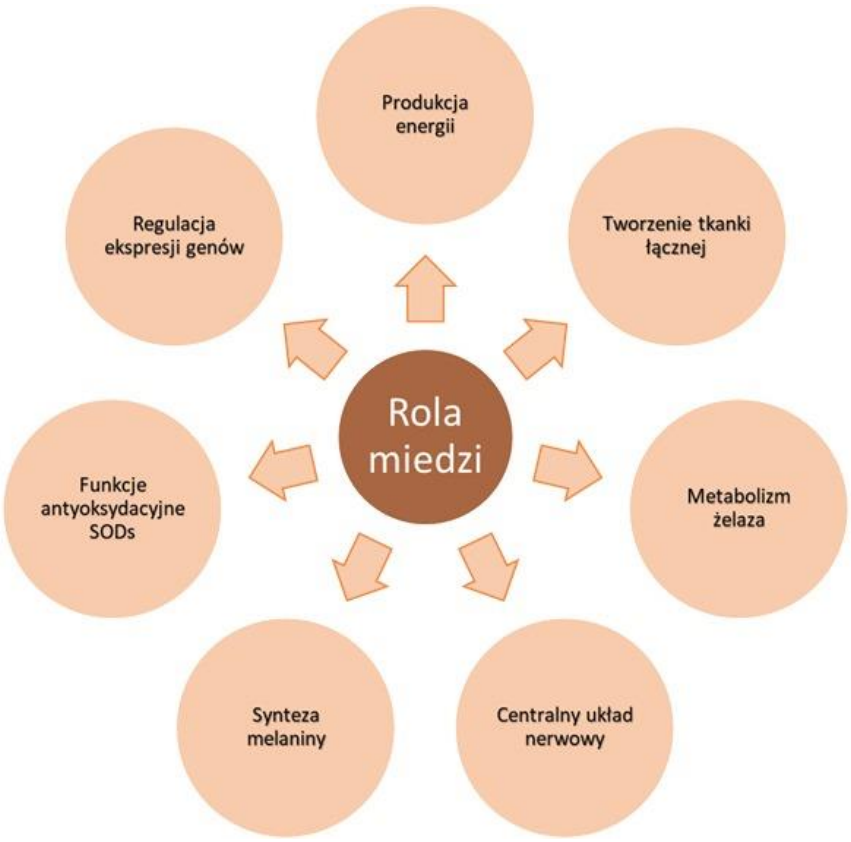
Keywords: cyclooxygenase, macroelements, copper, microelements, aortic rings

1. WPROWADZENIE

Podstawową funkcją układu sercowo–naczyniowego jest zapewnienie odpowiedniego krążenia krwi w całym organizmie. Proces krążenia płucnego ułatwia natlenienie krwi, podczas gdy krążenie systemowe zapewnia, że natleniona krew i niezbędne składniki odżywcze są dostarczane do wszystkich tkanek i narządów. Naczynia krwionośne są kluczowym elementem ciała ludzi i zwierząt, ponieważ regulują przepływ krwi do określonych obszarów. Do naczyń krwionośnych zaliczane są tętnice, naczynia włosowate i żyły (Chaudhry i wsp. 2022). Ze względu na budowę histologiczną naczyń krwionośnych o średnicy większej niż naczynia włosowate wyróżniamy trzy warstwy; należą do nich warstwa zewnętrzna zbudowana z tkanki łącznej, warstwa środkowa (mięśniowa) i warstwa wewnętrzna (śródbłonek). Na każdy z tych elementów budujących naczynie może oddziaływać wiele czynników, począwszy od hormonów, kończąc na małych cząsteczkach kationów mikro– i makroelementów.

Ludzie tak samo jak inne ssaki potrzebują odpowiedniej ilości mikroelementów w diecie dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Mikroelementy dostarczane do organizmu kontrolują wiele procesów związanych z metabolizmem tj. wytwarzanie enzymów i koenzymów, transport tlenu, procesy antyoksydacyjne, syntezą kwasów nukleinowych, kontrolą gospodarki elektrolitowej, przemiany energetyczne jak również kontrolą produkcji hormonów. Jednym z mikroelementów zaangażowanych w funkcje fizjologiczne i metaboliczne organizmu jest miedź (Rycina 1). Produkcja energii, oddychanie komórkowe, eliminacja wolnych rodników, wzrost tkanki łącznej, metabolizm żelaza i tlenu, dojrzewanie macierzy zewnątrzkomórkowej i neuropeptydów oraz sygnalizacja neuroendokrynna są jednymi z najbardziej istotnych procesów metabolicznych zależącymi od miedzi (Ingle i wsp. 2018). Ponadto angiogeneza i regulacja ekspresji genów to dwa procesy, w których miedź jest pośrednio niezbędna. Dodatkowo miedź jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego, pigmentacji skóry i rozwoju mózgu (Collins i wsp. 2010).

Do tej pory w wielu pracach naukowych wspomina się o znaczącej roli niedoboru miedzi w diecie, która może wywoływać wiele niepożądanych skutków w funkcjonowaniu organizmu. Niewiele prac natomiast porusza tematykę nadmiaru miedzi.



Rycina 1. Rola miedzi (Kitala i wsp. 2023).

Dotychczas przedstawione w literaturze dane jednoznacznie wskazują na znaczący wpływ miedzi na układ sercowo–naczyniowy, jednakże nie wystarczająca ilość doniesień naukowych na temat wpływu zwiększonej podaży tego pierwiastka na naczynia krwionośne i serce skłania do dalszych badań poszerzających wiedzę w tej dziedzinie (Kitala i wsp. 2023).

2. CELE BADAWCZE

Celem opublikowanych prac była:

1. Ocena wpływu zwiększonej podaży miedzi w diecie (w ilości 200% zalecanego dziennego spożycia) na dojrzały organizm w wieku średnim (szczury w wieku 10 miesięcy).
2. Ocena wpływu zwiększonej podaży miedzi w diecie (w ilości 200% zalecanego dziennego spożycia) na młody organizm wchodzący w wiek dorosły (szczury w wieku 3 miesięcy).

Hipoteza badawcza zakłada, iż zwiększona podaż miedzi w diecie powoduje zmiany w stężeniach mikro i makroelementów w organizmie, co może wpływać na parametry stresu oksydacyjnego i funkcjonalność układu sercowo–naczyniowego.

W celu zweryfikowania powyższej hipotezy zaplanowano i przeprowadzono następujące analizy:

- badania podstawowe
- oznaczenie zawartości wybranych mikro i makroelementów w wątrobie, nerce i surowicy
- oznaczenie poziomu markerów stresu oksydacyjnego
- badania funkcjonalne kurczliwości izolowanej aorty
- badania funkcjonalne izolowanego serca

3. MATERIAŁ I METODY

a) Materiał

Zwierzęta doświadczalne

Praca 1: Samce szczurów Wistar w wieku trzech – czterech tygodni (n/grupa = 12) przez 7 miesięcy były karmione standardową dietą dla gryzoni, zawierającą 6,45 mg miedzi/kg diety (100%). Następnie przez dodatkowe 8 tygodni, szczury z grupy kontrolnej kontynuowały dietę o standardowym składzie, natomiast szczury z grupy eksperymentalnej przyjmowały dietę zawierającą podwójną dawkę miedzi – 12,9 mg miedzi/kg diety (200%).

Praca 2: Samce szczurów Wistar w wieku trzech – czterech tygodni (n = 10) przez kolejno 8 tygodni otrzymywały w grupie kontrolnej standardową dietę dla gryzoni; natomiast szczury z grupy eksperymentalnej przyjmowały dietę zawierającą 12,9 mg miedzi/kg diety (200%).

Wykorzystane odczynniki

Chlorek acetylocholiny rozpuszczono w wodzie destylowanej, SC–560, AH–6809, TCP, AL–8810, NS–398, 1400W rozpuszczono w DMSO, 1400W rozpuszczono w metanolu, a noradrenalinę (jako chlorowodorek) rozpuszczono w roztworze soli fizjologicznej zawierającym chlorek sodu i kwas askorbinowy, odpowiednio w stężeniach 0,9% i 0,01% w/v. Zmierzone stężenie rozpuszczalnika wynosiło poniżej 0,01% (v/v). Roztwory przechowywano w temperaturze -20 °C. W dniu eksperymentu roztwory rozcieńczono w roztworze Krebsa–Henseleita, o następującym składzie (w mM): NaCl – 115; $CaCl_2$ – 2,5; KCl – 4,6; KH_2PO_4 – 1,2; $MgSO_4$ – 1,2; $NaHCO_3$ – 25; glukoza – 11,1. Wymienione substancje chemiczne zakupiono w Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

b) Metody

Pomiar masy i składu ciała

Szczury i organy wewnętrzne zważono pod koniec doświadczenia. W celu dokładnego pomiaru tłuszczowej i beztłuszczowej masy ciała u szczurów z zastosowaniem magnetycznego rezonansu jądrowego (TD–NMR) użyto aparatu Bruker Minispec LF (Ettlingen, Niemcy).

Reaktywność izolowanych naczyń

Wyizolowane pierścienie aorty piersiowej inkubowano w komorach o objętości 5 ml (Graz, Barcelona, Hiszpania) pod wstępnym obciążeniem 1 g (FT20, TAM–A, Hugo Sachs Elektronik, March, Niemcy). Integralność funkcjonalną pierścieni aorty potwierdzono przy użyciu wysokich stężeń związku obkurczającego naczynia krwionośne – chlorku potasu (75 mM) i środka rozszerzającego naczynia krwionośne – acetylocholiny (10 μM). Ponadto pierścienie aorty poddano 30–minutowej wstępnej inkubacji z różnymi substancjami, w tym z selektywnym inhibitorem COX–1 (SC–560, 10 μM), antagonistą EP i DP receptorów (AH–6809, 30 μM), inhibitorem syntezy prostacykliny (TCP, 10 μM), antagonistą receptorów FP (AL–8810, 10 μM), selektywnym inhibitorem COX–2 (NS–398, 10 μM) i selektywnym inhibitorem iNOS (1400 W, 1 μM). Odpowiedź rozkurczową izolowanych pierścieni aorty piersiowej analizowano poprzez dodanie wzrastających stężeń acetylocholiny i/lub SNP do komór inkubacyjnych (w zakresie stężeń od 0,1 nM do 10 μM). Badano również odpowiedź na działanie noradrenaliny (0,1 μM).

Perfuzja serca szczura w układzie Langendorffa

Po wyizolowaniu, serca poddano ważeniu, a następnie umieszczono w aparacie Langendorffa, gdzie monitorowano pracę przy użyciu oprogramowania ISOHEART 73–0161 (Hugo Sachs Elektronik, Niemcy). Ciśnienie rozkurczowe ustalono na poziomie 8–10 mmHg, poprzez odpowiednie napompowanie balonu. Pomiary ciśnienia skurczowego (mmHg), rozkurczowego (mmHg), średniego ciśnienia tętniczego (mmHg) i częstości akcji serca (uderzeń na minutę) były systematycznie dokumentowane.

Analiza stężenia mikro i makroelementów w wątrobie, nerce i surowicy szczura

Każda analizowana próbka wątroby i nerek została pocięta na małe kawałki za pomocą noża ceramicznego i zhomogenizowana w celu ujednorodnienia próbki. Dla każdego organu przygotowano trzy niezależne próbki (n = 3). Ilościowe oznaczenie stężeń pierwiastków przeprowadzono przy użyciu spektroskopii absorpcji atomowej (AAS) z rozpylaniem płomieniowym w płomieniu acetylenowo–powietrznym przy określonych długościach fal: 248,3 nm dla żelaza, 213,9 nm dla cynku. Dodatkowo zastosowano atomizację elektrotermiczną przy długości fali 324,8 nm dla miedzi i 196,0 nm dla selenu, włączając korektę tła Zeemana dla zwiększenia dokładności. Modyfikatory matrycy zostały włączone do analizy selenu, w

szczególności wykorzystując pallad w stężeniu 1500 ppm i magnez w stężeniu 900 ppm. Dokładność i precyzja metod zostały zweryfikowane poprzez użycie certyfikowanych materiałów odniesienia, w szczególności Seronorm Trace Elements Serum pochodzącego z Billingstad w Norwegii.

Stres oksydacyjny

Całkowity status antyoksydacyjny surowicy krwi oceniano przy użyciu zestawu Randox za pomocą techniki spektrofotometrycznej. Ocenę zdolności antyoksydacyjnej związków rozpuszczalnych w wodzie i rozpuszczalnych w lipidach przeprowadzono przy użyciu metody z wykorzystaniem fotochemiluminescencji. Technika ta identyfikuje wytwarzane wolne rodniki, które są następnie neutralizowane poprzez zastosowanie przeciwutleniaczy, takich jak kwas askorbinowy i TROLOX. Poziomy aldehydu malonowego oznaczono przy użyciu zestawu do analizy fluorymetrycznej (ab118970), zgodnie z wytycznymi producenta. Aktywność katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej oceniano przy użyciu zestawów diagnostycznych firmy Oxis International, Inc. (Portland, OR, USA), a także kolorymetrycznych zestawów diagnostycznych Ransel i Ransod firmy Randox (Warszawa, Polska).

Dostępne komercyjnie zestawy ELISA (Biorbyt) zostały użyte do ilościowego określenia aktywności COX–1, COX–2, HO–1, NOS3, GAPDH oraz ICAM–1 w pobranych próbkach surowicy krwi. Absorbancję mierzono ilościowo przy użyciu czytnika mikropłytek Thermo Scientific (Varioskan LUX, Brema, Niemcy) przy długości fali zgodnej z instrukcją podaną przez producenta.

Stężenia tlenku azotu, anionu ponadtlenkowego i nadtlenku wodoru oceniano *in situ* przy użyciu diaminofluoresceiny (DAF), dihydroetydyny (DHE) i 2′,7′–dichlorofluoresceiny diacetat (DCF). Materiał poddano inkubacji z barwnikiem jądrowym 4′,6–diamidino–2–fenyloindolem (DAPI, 10 µg/ml) w następujących kombinacjach: DAF + DAPI, DHE + DAPI i DCF + DAPI. Okres inkubacji prowadzono przez 30 minut w cieplarce utrzymywanej w temperaturze 37 °C. Obrazowanie fluorescencji przeprowadzono przy użyciu konfokalnego mikroskopu skaningowego laserowego Leica (TCS ST2DM IRE2), rejestrując dane przy długości fali 568 nm i w zakresie 410–475 nm dla barwnika DAPI.

c) Analiza danych i statystyka

Reakcje skurczowe naczyń na działanie noradrenaliny (0,1 μM) wyrażono w miligramach, podczas gdy relaksację naczyń wywołaną przez acetylocholinę przedstawiono jako procent odpowiedzi skurczowej po podaniu noradrenaliny do komór tkankowych. Krzywe kumulacyjne dawka–odpowiedź (ang. CCRC) oceniano przy użyciu funkcji logarytmicznej – agonista *vs* odpowiedź, stosując do analizy nieliniowy model regresji. Porównanie między grupami przeprowadzono przy użyciu testu t lub metody nieparametrycznej (test U Manna–Whitneya lub test Kruskala–Wallisa). CCRC analizowano za pomocą dwukierunkowej analizy wariancji z testem wielokrotnych porównań Šídáka. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM dla CCRC i średnie ± SD dla pozostałych wartości. Próg istotności statystycznej ustalono na poziomie $*p \leq 0,05$.

4. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Wyniki

a) Praca 1

Przygotowanie diety laboratoryjnej (w ilości 200% zalecanego dziennego spożycia) zwiększyło zawartość miedzi w diecie, co potwierdziła absorpcyjna spektrometria atomowa (AAS) z 7.83 ± 1.16 mg/kg do 17.86 ± 1.37 mg/kg.

Zwiększona podaż miedzi w diecie (w ilości 200% zalecanego dziennego spożycia) miała istotny wpływ na zawartość miedzi we krwi i wątrobie, na status antyoksydacyjny oraz reaktywność skurczową i rozkurczową pierścieni aorty piersiowej szczurów dojrzałych w wieku średnim.

W pracy wykazano, że we krwi szczurów po 8 tygodniach suplementacji, całkowity status antyoksydacyjny (TAS) wzrósł 1,6–krotnie (Randox). Ponadto zawartość miedź (x1,2) i cynku (x1,1), a także iloraz miedzi/cynku (x1,4) wzrosły (AAS). Wzrost miedzi (x1,12–krotny), a także ilorazu miedzi/cynku (x1,09–krotny) zaobserwowano również w wątrobie szczurów. Tymczasem aktywność COX–1 (0,7–krotnie), COX–2 (0,4–krotnie) i GAPDH (0,5–krotnie) zmniejszyły się (ELISA). Dodatkowo, zaobserwowaliśmy ujemną korelacja (r = –0,80, p = 0.006) między stężeniem miedzi i cynku w surowicy szczura (wzrost stężenia miedzi generował spadek zawartości cynku we krwi).

W badaniach funkcjonalnych (FT20, TAM–A, Hugo Sachs Elektronik), zwiększona podaż miedzi w diecie (w ilości 200% zalecanego dziennego spożycia) zmniejszyła siłę skurczu izolowanych pierścieni aorty piersiowej szczura poddanych działaniu noradrenaliny (x0,66–krotnie, p = 0,0234), poprzez modulację receptora FP (doświadczenie z AL–8810). Wstępna inkubacja, mająca na celu określić udział izoformy COX–2 (doświadczenie z NS–398), receptorów dla prostaglandyn typu EP i DP (doświadczenie z AH–6809) oraz PGI_2 (doświadczenie z TCP) wykluczyła udział tychże mechanizmów w opisanej obniżonej kurczliwości.

Odpowiedź relaksacyjna izolowanych pierścieni aorty po podaniu do komór inkubacyjnych wzrastających stężeń acetylocholiny (x1,13–krotnie, p = 0,015; AUC) i egzogennego donora tlenku azotu, nitroprusydku sodu (x1,10–krotnie, p = 0,035; AUC) zwiększyła się w wyniku

suplementacji, co wskazuje na działanie zależne od tlenku azotu. Pierścienie aorty wykazały również zwiększoną produkcję H_2O_2 (x2,33–krotnie), NO (x2,08–krotnie) i $O_2^{\bullet-}$ (x1,5–krotnie).

Parametry takie jak przyrost masy ciała, stosunek tłuszczowej do beztłuszczowej masy ciała i waga narządów wewnętrznych (serca, wątroby, śledziony, nerek, mózgu) nie różniły się znacząco między grupami. Badania funkcjonalne izolowanego serca nie wykazały zmian. Nie wykazano także statystycznie istotnych różnic w stężeniach HO–1, eNOS, iCAM–1 oraz żelaza, selenu, stosunku miedź/selen i selen/cynk we krwi. Zawartości cynku, żelaza i selenu w wątrobie nie różniła się pomiędzy grupami.

b) Praca 2

Zwiększona podaż miedzi w diecie (w ilości 200% zalecanego dziennego spożycia) miała istotny wpływ na zawartość mikro i makroelementów w nerkach, wątrobie i krwi, na zawartość reaktywnych form tlenu w aorcie piersiowej oraz na reaktywność rozkurczową pierścieni aorty piersiowej u młodych szczurów wchodzący w wiek dorosły.

We krwi odnotowaliśmy wzrost stężenia miedzi (1,21–krotnie), podczas gdy zawartość cynku i selenu nie zmieniła się w porównaniu do grupy kontrolnej. W wątrobie zawartość miedzi (1,15–krotnie) i magnezu (1,06–krotnie) zwiększyła się, podczas gdy nie uległa zmianie zawartość potasu, żelaza, wapnia, chromu, sodu, cynku, manganu, selenu, kobaltu, molibdenu i wanadu. W nerkach stężenie miedzi (1,23–krotnie), żelaza (1,13–krotnie) i potasu (1,08–krotnie) wzrosło, natomiast wapnia (0,88–krotnie) i chromu (0,77–krotnie) uległo obniżeniu. Nie uległa zmianie zawartość magnezu, sodu, cynku, manganu, selenu, kobaltu, molibdenu i wanadu.

Suplementacja miedzią zwiększyła produkcję NO (1,49–krotnie), $O_2^{\bullet-}$ (1,64–krotnie) i H_2O_2 (1,35–krotnie) w pierścieniach aorty; natomiast nie zmieniła się aktywność COX–1, COX–2, GAPDH, HO–1, NOS3, iCAM, ACW, ACL i TAS we krwi oraz MDA, CAT, SOD we krwi i sercu.

W badaniach funkcjonalnych na młodych szczurach wchodzących w wiek dorosły, zwiększona podaż miedzi w diecie zwiększyła odpowiedź relaksacyjną izolowanych pierścieni aorty po podaniu do komór inkubacyjnych wzrastających stężeń acetylocholiny ($p = 0.035$, AUC), poprzez zmniejszoną wrażliwość na działanie prostanoidów pochodzących ze szlaku przemian COX–2, na co wskazują wyniki wstępnej inkubacji z NS–398 i SC–560. Nie zmieniła się natomiast siła skurczu izolowanych pierścieni aorty piersiowej szczura po podaniu noradrenaliny.

Tak samo jak w wynikach *pracy 1*, parametry takie jak przyrost masy ciała, stosunek tłuszczowej do beztłuszczowej masy ciała i waga narządów wewnętrznych (serca, wątroby, śledziony, nerek, mózgu) nie różniły się znacząco między grupami. Badania funkcjonalne izolowanego serca nie wykazały zmian.

Dyskusja

Wyniki naszych badań wskazały, że podanie 200% miedzi w diecie istotnie zmieniło skurcz i rozkurcz naczyń u szczurów w średnim wieku. Efekt ten przypisano podwyższonym poziomom reaktywnych form tlenu (ROS) i syntezie prostaglandyn, co następnie wpłynęło na status antyoksydacyjny w tej grupie wiekowej. Niemniej jednak nie zmieniło to siły skurczu naczyń u młodych szczurów. We wcześniejszych badaniach wykazano, że miedź w stężeniu 10 i 16 µM (≈0,635 i 1,016 mg/l) hamuje skurcz wywołany przez podanie fenylefryny w sposób zależny od dawki w izolowanych pierścieniach aorty piersiowej szczura in *vitro* (Yan i wsp. 2001). Inne badanie w warunkach *in vitro* wykazało, że wstępne podanie miedzi antagonizowało skurcz naczyń wywołane działaniem noradrenaliny w sposób zależny i niezależny od biodostępności tlenku azotu, co sugeruje, że efekt wywołany miedzią był spowodowany przez mechanizm niezależny od tlenku azotu (Wang i wsp. 2013).

Zaobserwowany w naszych pracach trend wskazuje na wzrost relaksacji naczyń pod wpływem działania acetylocholiny, któremu towarzyszy zmniejszony wpływ wazodylatacyjnych prostanoidów pochodzących z COX–2. Możliwym mechanizmem kompensacyjnym dla opisanego efektu naczyniowego prostanoidów może być zwiększona zawartość tlenku azotu pochodząca z iNOS. Według Lamb i wsp. (2005), w pierścieniach tętnic szyjnych białych królików nowozelandzkich karmionych dietą bogatą w cholesterol, suplementacja miedzią zwiększała biodostępność tlenku azotu, tym samym ułatwiając rozkurcz tętnic. Bezpośredni wpływ miedzi na reaktywność naczyń krwionośnych tętnicy krezkowej szczura został zbadany także we wspomnianym wcześniej badaniu (Wang i wsp. 2013). Ekspozycja na chlorek miedzi powodowała, zależne od dawki, rozszerzenie naczyń krwionośnych pierścieni krezkowych (im wyższe stężenie miedzi, tym większy rozkurcz). Niemniej jednak efekt wazodylatacyjny był znacząco zmniejszony, gdy pierścienie krezkowe były wstępnie poddane działaniu L–NAME, inhibitora eNOS (Wang i wsp. 2013), co wskazuje, że w tym procesie jest aktywny mechanizm zależny od tlenku azotu. W innych badaniach, długotrwała inkubacja pierścieni aorty z siarczanem

miedzi(II) przy stężeniach miedzi(II) mniejszych niż 1 μM (≈0,0635 mg/l) skutkowała zmniejszoną odpowiedzią wazodylatacyjną na działanie acetylocholiny, co jest sprzeczne z wynikami wcześniej wspomnianego badania (Chiarugi i wsp 2002). Różnice pomiędzy opisanymi wynikami mogą wynikać z wpływu procesów starzenia na elastyczność naczyń, a także z tworzenia się blaszek miażdżycowych, co zmieniło reaktywność pierścieni aorty.

W dotychczasowych badaniach wykazano istnienie istotnego związku pomiędzy markerami stresu oksydacyjnego, w tym zwiększonym poziomem nitrotyrozyny (NT) i zmodyfikowanego TAS, a stałym wzrostem poziomu miedzi w diecie i surowicy (Bo i wsp. 2008). Zwiększony poziom TAS u szczurów w średnim wieku i brak statystycznie istotnych różnić u szczurów młodych, przy jednocześnie zwiększonym stężeniu wolnych rodników może wynikać z niedojrzałości pewnych mechanizmów enzymatycznych u szczurów i braku odpowiednich możliwości neutralizacji wolnych rodników przez młody organizm. Szczury zaczynają być uważane za dorosłe między 2 a 5 miesiącem życia (Sudakov i wsp. 2021), stąd też fizjologia zwierząt w *pracy 2* może odbiegać od fizjologii dojrzałych osobników. Galhardi i wsp. (2004) wyjaśnili, że zwiększona ekspozycja na miedź oraz towarzysząca cukrzyca są związane z dodatkowymi konsekwencjami, takimi jak zwiększony poziom reaktywnych form tlenu (ROS) i zmiany w markerach stresu oksydacyjnego. Zarówno u szczurów chorych na cukrzycę, jak i u szczurów, którym podawano 60 mg/kg miedzi, zaobserwowano zauważalny wzrost stężenia lipidów hydroperoksydowych w surowicy, któremu towarzyszył istotny spadek aktywności peroksydazy glutationowej i dysmutazy ponadtlenkowej, co świadczy o zwiększeniu stresu oksydacyjnego. Porównując do naszych badań, dawka miedzi podana przez Galhardi i wsp. była znacznie większa, co mogło wpłynąć na opisane różnice w wynikach. Dodatkowo cukrzyca sama w sobie jest już czynnikiem dodatkowo obarczającym i wpływającym na podniesienie poziomu stresu oksydacyjnego.

W obu przeprowadzonych analizach zaobserwowano modyfikacje w poziomach miedzi i cynku, a także ich stosunku molowego. Dowiedziono także związku między stężeniem miedzi a stężeniem cynku w organizmie u szczurów w wieku średnim. Cynk sprawia, że komórki jelitowe wytwarzają metalotioneinę, białko, które wiąże się z miedzią zawartą w pożywieniu lub miedzią, którą organizm uwalnia w sokach żołądkowych. Kompleks taki nie może przedostać się do krwi, a gdy komórki jelitowe obumierają, to wraz z kompleksem z miedzią są wydalane z organizmu

razem ze stolcem. Ponadto cynk może powodować wytwarzanie metalotioneiny przez hepatocyty, co może zmniejszyć szkodliwe działanie wolnej miedzi na te komórki (Lorincz 2018). Dodatkowo niedobór miedzi zmniejsza wchłanianie żelaza. Ponadto zidentyfikowano złożone połączenia między żelazem, miedzią i cynkiem, chociaż procesy molekularne regulujące te interakcje pozostają nieznane. Różne transportery zaangażowane w metabolizm żelaza, miedzi i cynku mogą również ułatwiać wchłanianie innych krytycznych pierwiastków śladowych (Nishito i Kambe 2018). Powyższe może tłumaczyć opisane przez nas zmiany w zawartości potasu, żelaza, wapnia i chromu w nerkach, a także magnezu w wątrobie młodszych szczurów.

5. WNIOSKI

- U szczurów dojrzałych w wieku średnim, zwiększona suplementacja miedzią w diecie miała istotny wpływ na zawartość miedzi we krwi i wątrobie, na status antyoksydacyjny i zawartość reaktywnych form tlenu w aorcie piersiowej oraz reaktywność skurczową i rozkurczową pierścieni aorty piersiowej.
- U młodych szczurów wchodzących w wiek dorosły, zwiększona suplementacja miedzią w diecie miała również istotny wpływ na zawartość miedzi we krwi i wątrobie, na zawartość reaktywnych form tlenu w aorcie piersiowej oraz na reaktywność rozkurczową pierścieni aorty piersiowej. Dodatkowe analizy wykazały istotne zmiany stężenia potasu, żelaza, wapnia i chromu w nerkach oraz magnezu w wątrobie.
- Wpływ zwiększonej podaży miedzi w diecie (w ilości 200% zalecanego dziennego spożycia) był bardziej widoczny u szczurów dojrzałych w wieku średnim.
- Przeważająca ilość prac badawczych opisuje wpływ niedoboru miedzi w diecie, aniżeli suplementację miedzią.
- Dostępna ilość prac badawczych opisujących *ex vivo* mechanizmy funkcjonalne izolowanych pierścieni aorty i serca jest niewystarczająca, by w pełni scharakteryzować rolę miedzi w regulacji pracy układu sercowo–naczyniowego oraz wpływ na stres oksydacyjny.
- Szczegółowe dane na temat stanu mikro– i makroelementów oraz ich interakcji u pacjentów w różnych grupach wiekowych są potrzebne w celu skutecznej interwencji żywieniowej jak i terapeutycznej.

6. PIŚMIENNICTWO

Bo, S., Durazzo, M., Gambino, R., Berutti, C., Milanesio, N., Caropreso, A., Gentile, L., Cassader, M., Cavallo-Perin, P., & Pagano, G. (2008). Associations of dietary and serum copper with inflammation, oxidative stress, and metabolic variables in adults. *The Journal of nutrition*, *138*(2), 305–310. https://doi.org/10.1093/jn/138.2.305

Chaudhry, R., Miao, J. H., Rehman, A. (2022). Physiology, cardiovascular. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.

Chiarugi, A., Pitari, G. M., Costa, R., Ferrante, M., Villari, L., Amico-Roxas, M., Godfraind, T., Bianchi, A., & Salomone, S. (2002). Effect of prolonged incubation with copper on endothelium-dependent relaxation in rat isolated aorta. *British journal of pharmacology*, *136*(8), 1185–1193. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704816

Collins, J. F., Prohaska, J. R., & Knutson, M. D. (2010). Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutrition reviews*, *68*(3), 133–147. https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00271.x

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 and chemical toxicology 42*(12), 2053–2060. https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.07.020

Kitala, K., Tanski, D., Godlewski, J., Krajewska-Włodarczyk, M., Gromadziński, L., & Majewski, M. (2023). Copper and Zinc Particles as Regulators of Cardiovascular System Function-A Review. *Nutrients*, *15*(13), 3040. https://doi.org/10.3390/nu15133040

Kitala-Tańska, K., Socha, K., Juśkiewicz, J., Krajewska-Włodarczyk, M., & Majewski, M. (2024). The Effect of an Elevated Dietary Copper Level on the Vascular Contractility and Oxidative Stress in Middle-Aged Rats. *Nutrients*, *16*(8), 1172. https://doi.org/10.3390/nu16081172

Kitala-Tańska, K., Hanć, A., Juśkiewicz, J., & Majewski, M. (2024). Prolonged Copper Supplementation Modified Minerals in the Kidney, Liver and Blood, and Potentiated Oxidative Stress and Vasodilation of Isolated Aortic Rings in Young Wistar Rats. *Nutrients*, *16*(19), 3230. https://doi.org/10.3390/nu16193230

Lamb, D. J., Tickner, M. L., Hourani, S. M., & Ferns, G. A. (2005). Dietary copper supplements modulate aortic superoxide dismutase, nitric oxide and atherosclerosis. *International journal of experimental pathology*, *86*(4), 247–255. https://doi.org/10.1111/j.0959-9673.2005.00432.x

Lorincz M. T. (2018). Wilson disease and related copper disorders. *Handbook of clinical neurology*, *147*, 279–292. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63233-3.00018-X

Nishito, Y., & Kambe, T. (2018). Absorption Mechanisms of Iron, Copper, and Zinc: An Overview. *Journal of nutritional science and vitaminology*, *64*(1), 1–7. https://doi.org/10.3177/jnsv.64.1

Sudakov, S. K., Alekseeva, E. V., Nazarova, G. A., & Bashkatova, V. G. (2021). Age-Related Individual Behavioural Characteristics of Adult Wistar Rats. *Animals*, *11*(8), 2282. https://doi.org/10.3390/ani11082282

Wang, Y. C., Hu, C. W., Liu, M. Y., Jiang, H. C., Huo, R., & Dong, D. L. (2013). Copper induces vasorelaxation and antagonizes noradrenaline-induced vasoconstriction in rat mesenteric artery. *Cellular physiology and biochemistry, 32*(5), 1247–1254. https://doi.org/10.1159/000354523

Yan, M., Liu, D. L., Chua, Y. L., Chen, C., & Lim, Y. L. (2001). Effects of micromolar concentrations of manganese, copper, and zinc on alpha1-adrenoceptor-mediating contraction in rat aorta. *Biological trace element research*, *82*(1-3), 159–166. https://doi.org/10.1385/BTER:82:1-3:159

7. SPIS RYCIN

Rycina 1. Rola miedzi.

8. ZGODA LOKALNEJ KOMISJI ETYCZNEJ

Komisja Etyczna ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie zatwierdziła protokół badań na zwierzętach (zgoda 90/2019 z dnia 26 listopada 2019 r.). Doświadczenie zostało przeprowadzone zgodnie z Dyrektywą UE (2010/63/UE) dotyczącą doświadczeń na zwierzętach oraz zgodnie z zasadą 3R i aktualnymi wytycznymi (ARRIVE, NIH nr 86-26).

9. ANKIETA PRACY ZAWODOWEJ I NAUKOWEJ

W 2022 roku ukończyłam studia na kierunku lekarskim na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie. Podczas studiów pełniłam funkcję przewodniczącej Studenckiego Koła Naukowego Geriatrii i Gerontologii. Następnie ukończyłam staż podyplomowy w Miejskim Szpitalu Zespolonym w Olsztynie. W 2023 roku rozpoczęłam specjalizację w dziedzinie Hematologii w Samodzielnym Publicznym Szpitalu Klinicznym im. A. Mielęckiego ŚUM w Katowicach.

W 2022 roku podjęłam także pracę w Katedrze Farmakologii i Toksykologii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, początkowo w charakterze nauczyciela akademickiego na umowie cywilno-prawnej, a następnie od 2023 roku jako asystent badawczo-dydaktyczny. Prowadziłam zajęcia dydaktyczne na 3 roku, kierunku lekarskiego polsko- i anglojęzycznym z przedmiotów Farmakologia z Toksykologią, Pharmacology and Toxicology oraz 5 roku kierunku lekarskiego z przedmiotu Clinical Pharmacology. Brałam udział w kliku konferencjach naukowych, m.in. w XXIX Kongresie Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego (Łódź, 2023 rok), gdzie zaprezentowałam wyniki swoich badań doktorskich: „Vascular effects of a prolonged dietary copper administration in young and aged rats”.

W ramach pracy akademickiej jestem autorką 6 artykułów naukowych o łącznym współczynniku IF = 21,4, z których w 4 jestem pierwszym autorem. Do cyklu prac włączono 2 prace oryginalne o łącznym współczynniku IF = 9,6.

10. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI

Załącznik nr 4 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, dn. 10.10.2024

Klaudia Kitala-Tańska

Nauki medyczne

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
prof. dr hab. n. med. Marcin Mycko
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem Kitala-Tańska, K., Socha, K., Juśkiewicz, J., Krajewska-Włodarczyk, M., Majewski, M. (2024). The Effect of an Elevated Dietary Copper Level on the Vascular Contractility and Oxidative Stress in Middle-Aged Rats. *Nutrients*, *16*(8), 1172 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy oraz przygotowaniu publikacji do druku.

Klaudia Kitala-Tańska

(podpis kandydata)

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1

do Uchwały Nr 362

Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

z dnia 27 czerwca 2023 roku

wprowadzającej procedurę postępowania

w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, dn. 10.10.2024

Dr hab. n. med. Michał S. Majewski, prof. UWM

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. n. med. Marcin Mycko

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy autorstwa ***Kitala-Tańska, K.,*** *Socha, K., Juśkiewicz, J., Krajewska-Włodarczyk, M., Majewski, M. (2024)* pod tytułem *The Effect of an Elevated Dietary Copper Level on the Vascular Contractility and Oxidative Stress in Middle-Aged Rats* opublikowanej w *Nutrients, 16(8), 1172* mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, pozyskiwaniu funduszy, opracowaniu metodologii, administracji projektem, nadzorze oraz przygotowaniu publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Klaudię Kitalę-Tańską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Klaudii Kitali-Tańskiej polegający na: opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy oraz przygotowaniu publikacji do druku.

.....

podpis/podpisy

KIEROWNIK
Katedry Farmakologii i Toksykologii
Wydziału Lekarskiego
dr hab. n. med. Michał S. Majewski, prof. UWM

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1

do Uchwały Nr 362

Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

z dnia 27 czerwca 2023 roku

wprowadzającej procedurę postępowania

w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, dn. 10.10.2024

Prof. dr hab. Katarzyna Socha

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. n. med. Marcin Mycko

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy autorstwa ***Kitala-Tańska, K.,*** *Socha, K., Juśkiewicz, J., Krajewska-Włodarczyk, M., Majewski, M. (2024)* pod tytułem *The Effect of an Elevated Dietary Copper Level on the Vascular Contractility and Oxidative Stress in Middle-Aged Rats* opublikowanej w *Nutrients, 16(8), 1172* mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Klaudię Kitalę-Tańską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Klaudii Kitali-Tańskiej polegający na: opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy oraz przygotowaniu publikacji do druku.

Katarzyna Socha

.....

podpis/podpisy

PODPIS ZAUFANY
MAGDALENA
KRAJEWSKA-WŁODARC
12.12.2024 09:32:45 (GMT+1)
Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1

do Uchwały Nr 362

Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

z dnia 27 czerwca 2023 roku

wprowadzającej procedurę postępowania

w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, dn. 10.10.2024

Dr hab. n. med. Magdalena Krajewska-Włodarczyk, prof. UWM

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. n. med. Marcin Mycko

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy autorstwa ***Kitala-Tańska, K.,*** *Socha, K., Juśkiewicz, J., Krajewska-Włodarczyk, M., Majewski, M. (2024)* pod tytułem *The Effect of an Elevated Dietary Copper Level on the Vascular Contractility and Oxidative Stress in Middle-Aged Rats* opublikowanej w *Nutrients, 16(8), 1172* mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na interpretacji wyników i pozyskiwaniu funduszy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Klaudię Kitalę-Tańską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Klaudii Kitali-Tańskiej polegający na: opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy oraz przygotowaniu publikacji do druku.

.....

podpis/podpisy

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1

do Uchwały Nr 362

Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

z dnia 27 czerwca 2023 roku

wprowadzającej procedurę postępowania

w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, dn. 10.10.2024

Prof. dr hab. inż. Juśkiewicz Jerzy

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. n. med. Marcin Mycko

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy pod tytułem Kitala-Tańska, K., Socha, K., Juśkiewicz, J., Krajewska-Włodarczyk, M., Majewski, M. (2024). The Effect of an Elevated Dietary Copper Level on the Vascular Contractility and Oxidative Stress in Middle-Aged Rats. *Nutrients*, *16*(8), 1172 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na opracowywaniu koncepcji tej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Klaudię Kitalę-Tańską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Klaudii Kitali-Tańskiej polegający na : opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy oraz przygotowaniu publikacji do druku.

podpis/podpisy

Załącznik nr 4 do Załącznika nr 1

do Uchwały Nr 362

Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

z dnia 27 czerwca 2023 roku

wprowadzającej procedurę postępowania

w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, dn. 10.10.2024

Klaudia Kitala-Tańska

Nauki medyczne

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. n. med. Marcin Mycko

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem Kitala-Tańska, K., Hanć, A., Juśkiewicz, J., Majewski, M. (2024). Prolonged Copper Supplementation Modified Minerals in the Kidney, Liver and Blood, and Potentiated Oxidative Stress and Vasodilation of Isolated Aortic Rings in Young Wistar Rats. *Nutrients, 16(19),* 3230 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy oraz przygotowaniu publikacji do druku.

Klaudia Kitala-Tańska

(podpis kandydata)

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1

do Uchwały Nr 362

Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

z dnia 27 czerwca 2023 roku

wprowadzającej procedurę postępowania

w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, dn. 10.10.2024

Dr hab. n. med. Michał S. Majewski, prof. UWM

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. n. med. Marcin Mycko

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy ***Kitala-Tańska, K.,*** *Hanć, A., Juśkiewicz, J., Majewski, M. (2024)* pod tytułem *Prolonged Copper Supplementation Modified Minerals in the Kidney, Liver and Blood, and Potentiated Oxidative Stress and Vasodilation of Isolated Aortic Rings in Young Wistar Rats* opublikowanej *Nutrients, 16(19), 3230* mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, pozyskiwaniu funduszy, opracowaniu metodologii, administracji projektem, nadzorze oraz przygotowaniu publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Klaudię Kitalę-Tańską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Klaudii Kitali-Tańskiej polegający na: opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy oraz przygotowaniu publikacji do druku.

.....

podpis/podpisy

KIEROWNIK
Katedry Farmakologii i Toksykologii
Wydziału Lekarskiego
dr hab. n. med. Michał S. Majewski, prof. UWM

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, dn. 17.10.2024

Dr hab. Anetta Hanć, prof. UAM

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
Wydział Chemii, Zakład Analizy Śladowej

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. n. med. Marcin Mycko

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy autorstwa *Kitala-Tańska, K., Hanć, A., Juśkiewicz, J., Majewski, M. (2024)* pod tytułem *Prolonged Copper Supplementation Modified Minerals in the Kidney, Liver and Blood, and Potentiated Oxidative Stress and Vasodilation of Isolated Aortic Rings in Young Wistar Rats* opublikowanej *Nutrients, 16(19), 3230* mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy oraz przygotowaniu publikacji do druku.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Klaudię Kitalę-Tańską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Klaudii Kitali-Tańskiej polegający na: opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy oraz przygotowaniu publikacji do druku.

PODPIS ZAUFANY
ANETTA MARIA
HANĆ
17.10.2024 12:58:57 (GMT+2)
Dokument podpisano elektronicznie
podpisem zaufanym

.....
podpis/podpisy

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 1

do Uchwały Nr 362

Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

z dnia 27 czerwca 2023 roku

wprowadzającej procedurę postępowania

w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, dn. 10.10.2024

Prof. dr hab. inż. Juśkiewicz Jerzy

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

prof. dr hab. n. med. Marcin Mycko

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy pod tytułem Kitala-Tańska, K., Hanć, A., Juśkiewicz, J., Majewski, M. (2024). Prolonged Copper Supplementation Modified Minerals in the Kidney, Liver and Blood, and Potentiated Oxidative Stress and Vasodilation of Isolated Aortic Rings in Young Wistar Rats. *Nutrients, 16(19),* 3230 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na opracowywaniu koncepcji oraz przygotowaniu publikacji do druku.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez Klaudię Kitalę-Tańską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata Klaudii Kitali-Tańskiej polegający na : opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy oraz przygotowaniu publikacji do druku.

.....

podpis/podpisy

11. KOPIA POŚWIADCZENIA DOROBKU NAUKOWEGO

BIBLIOTEKA UNIWERSYTECKA
UWM W OLSZTYNIE

Olsztyn, 08.11.2024 r.

lek. Klaudia Kitala-Tańska
Katedra Farmakologii i Toksykologii
Wydział Lekarski
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Analiza bibliometryczna publikacji naukowych lek. Klaudii Kitali-Tańskiej
sporządzona na podstawie bazy Bibliografia Publikacji Pracowników Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

I. Analiza cytowań:

Lp.	Rok	Tytuł publikacji	Ilość cytowań w Web of Science	Ilość cytowań w Scopus
1	2024	Characterizations of White Mulberry, Sea-Buckthorn, Garlic, Lily of the Valley … *Nutrients*	2	2
2	2024	Prevalence and Management of Chronic Pain, Including Neuropathic Pain, in Dialysis… *Medical Science Monitor*	1	1
3	2024	The Effect of an Elevated Dietary Copper Level on the Vascular… *Nutrients*	2	2
4	2023	Copper and Zinc Particles as Regulators of Cardiovascular System Function… *Nutrients*	12	15
		Suma cytowań:	17	20

Biblioteka Uniwersytecka
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
ul. Oczapowskiego 12B
10-719 Olsztyn

e-mail: bib.uwm@uwm.edu.pl
tel.: 89 523 33 09
tel./fax: 89 524 00 05
bu.uwm.edu.pl

Oprac.: mgr Monika Bartnik, Dział Informacji Naukowej BU UWM, tel. 89 523 49 57, 89 524 51 87; bib.oin@uwm.edu.pl

Raport cytowań w bazie **Web of Science Core Collection** przeprowadzony w dniu 08.11.2024

liczba prac cytowanych = 4	**liczba cytowań = 17**	**Index Hirscha (Index h) = 2**

Raport cytowań w bazie **Scopus** przeprowadzony w dniu 08.11.2024 r.

liczba prac cytowanych = 4	**liczba cytowań = 20**	**Index Hirscha (Index h) = 2**

II. Punktacja:

Zestawienie punktacyjne dorobku publikacyjnego

Typ publikacji	Łączna liczba prac	Łączna liczba prac z IF	Liczba prac z punktacją MNiSW	Łączna wartość IF	Łączna wartość punktacji MNiSW
artykuł w czasopiśmie polskim	1	0	1	0	40
artykuł w czasopiśmie zagranicznym	5	5	5	21.4	700
Razem:	**6**	**5**	**6**	**21.4**	**740**

III. Wykaz publikacji:

1.
IDT: 0000090075.
Rok: 2024
Autorzy: Kitala-Tańska Klaudia, Kania-Zimnicka Ewa, Tański Damian, Kwella Norbert, Stompór Tomasz, Stompór Małgorzata
Tytuł oryginału: Prevalence and Management of Chronic Pain, Including Neuropathic Pain, in Dialysis Patients with End-Stage Renal Disease
Czasopismo: Medical Science Monitor
Opis fizyczny: 2024, 30, s. 1-10 ; bibliogr. 53 poz. ; nr art. e943808
Adres url: https://medscimonit.com/abstract/full/idArt/943808
p-ISSN: 1234-1010
e-ISSN: 1643-3750
Język publikacji: ENG
DOI: 10.12659/MSM.943808
open-access-text-version: FINAL_PUBLISHED
open-access-licence: CC-BY-NC-ND
open-access-release-time: AT_PUBLICATION
open-access-article-mode: OPEN_JOURNAL
Data ukazania się publikacji: 2024.06.04
Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym
Charakt. merytoryczna: praca oryginalna
Inne bazy podające opis: Scopus
Impact Factor: 2.200
Punktacja MNiSW: 140.000
Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;nauki o kulturze fizycznej;nauki o zdrowiu;biotechnologia;nauki biologiczne;weterynaria
Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: MEDICAL SCIENCE MONITOR
Afiliacja: Kitala-Tańska Klaudia [*] 0009-0004-3566-2853 6374593a7523405a7dd1b006;336;23, **Kania-Zimnicka Ewa** [*];355;23, Tański Damian [ ] 0000-0001-5099-323X 5e7092d6878c28a04739dbb8;000;000, **Kwella Norbert** [*] 0000-0002-7256-5479 5e70921c878c28a047390186;334;23, **Stompór Tomasz** [*] 0000-0002-3944-0850 5e70921c878c28a0473900fc;334;23, **Stompór Małgorzata** [*] 0000-0001-7746-4506 5e709323878c28a0473a3778;334;23

2.
IDT: 0000089723.
Rok: 2024
Autorzy: Witkowska Aleksandra, Gryn-Rynko Anna, Syrkiewicz Patrycja, Kitala-Tańska Klaudia, Majewski Michał S.
Tytuł oryginału: Characterizations of White Mulberry, Sea-Buckthorn, Garlic, Lily of the Valley, Motherwort, and Hawthorn as Potential Candidates for Managing Cardiovascular Disease-In Vitro and

Ex Vivo Animal Studies
Czasopismo: Nutrients
Opis fizyczny: 2024, 16 (9), s. 1-19 ; bibliogr. 112 poz. ; nr art.1313
Adres url: https://www.mdpi.com/2072-6643/16/9/1313
p-ISSN: 2072-6643
Język publikacji: ENG
DOI: 10.3390/nu16091313
open-access-text-version: FINAL_PUBLISHED
open-access-licence: CC-BY
open-access-release-time: AT_PUBLICATION
open-access-article-mode: OPEN_JOURNAL
Data ukazania się publikacji: 2024.04.29
Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym
Charakt. merytoryczna: praca oryginalna
Impact Factor: 4.800
Punktacja MNiSW: 140.000
Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;nauki o zdrowiu;nauki o rodzinie;rolnictwo i ogrodnictwo;technologia żywności i żywienia;biotechnologia;nauki chemiczne;weterynaria
Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: Nutrients
Afiliacja: Witkowska Aleksandra [*] 6160fea975234017e050df0d;997;05, Gryn-Rynko Anna [*] 0000-0001-8766-4579 5e7093e7878c28a0473b303d;336;23, Syrkiewicz Patrycja [*] 6160fea975234017e050de6a;997;05, Kitala-Tańska Klaudia [*] 0009-0004-3566-2853 6374593a7523405a7dd1b006;997;05, Majewski Michał S. [*] 0000-0001-6304-0673 5e70921c878c28a047390128;336;23

3.
IDT: 0000091642.
Rok: 2024
Autorzy: Kitala-Tańska Klaudia, Hanć Anetta, Juśkiewicz Jerzy, Majewski Michał S.
Tytuł oryginału: Prolonged Copper Supplementation Modified Minerals in the Kidney, Liver and Blood, and Potentiated Oxidative Stress and Vasodilation of Isolated Aortic Rings in Young Wistar Rats
Czasopismo: Nutrients
Opis fizyczny: 2024, 16 (19), s. 1-14 ; bibliogr. 40 poz. ; nr art. 3230
Adres url: https://www.mdpi.com/2072-6643/16/19/3230
p-ISSN: 2072-6643
Język publikacji: ENG
DOI: 10.3390/nu16193230
open-access-text-version: FINAL_PUBLISHED
open-access-licence: CC-BY
open-access-release-time: AT_PUBLICATION
open-access-article-mode: OPEN_JOURNAL
Data ukazania się publikacji: 2024.09.25

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym
Charakt. merytoryczna: praca oryginalna
Impact Factor: 4.800
Punktacja MNiSW: 140.000
Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;nauki o zdrowiu;nauki o rodzinie;rolnictwo i ogrodnictwo;technologia żywności i żywienia;biotechnologia;nauki chemiczne;weterynaria
Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: Nutrients
Afiliacja: Kitala-Tańska Klaudia [*] 0009-0004-3566-2853 6374593a7523405a7dd1b006;336;23, Hanć Anetta [ ];000;000, Juśkiewicz Jerzy [ ] 3951529;000;000, Majewski Michał S. [*] 0000-0001-6304-0673 5e70921c878c28a047390128;336;23

4.
IDT: 0000089720.
Rok: 2024
Autorzy: Kitala-Tańska Klaudia, Socha Katarzyna, Juśkiewicz Jerzy, Krajewska-Włodarczyk Magdalena, Majewski Michał S.
Tytuł oryginału: The Effect of an Elevated Dietary Copper Level on the Vascular Contractility and Oxidative Stress in Middle-Aged Rats
Czasopismo: Nutrients
Opis fizyczny: 2024, 16 (8), s. 1-16 ; bibliogr. 40 poz. ; nr art. 1172
Adres url: https://www.mdpi.com/2072-6643/16/8/1172/pdf
p-ISSN: 2072-6643
Język publikacji: ENG
DOI: 10.3390/nu16081172
open-access-text-version: FINAL_PUBLISHED
open-access-licence: CC-BY
open-access-release-time: AT_PUBLICATION
open-access-article-mode: OPEN_JOURNAL
Data ukazania się publikacji: 2024.04.26
Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym
Charakt. merytoryczna: praca oryginalna
Impact Factor: 4.800
Punktacja MNiSW: 140.000
Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;nauki o zdrowiu;nauki o rodzinie;rolnictwo i ogrodnictwo;technologia żywności i żywienia;biotechnologia;nauki chemiczne;weterynaria
Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: Nutrients
Afiliacja: Kitala-Tańska Klaudia [*] 0009-0004-3566-2853 6374593a7523405a7dd1b006;336;23, Socha Katarzyna [ ];000;000, Juśkiewicz Jerzy [ ] 3951529;000;000, Krajewska-Włodarczyk Magdalena [*] 0000-0002-7857-347X 5e709409878c28a0473b53c6;479;23, Majewski Michał S. [*] 0000-0001-6304-0673 5e70921c878c28a047390128;336;23

5.
IDT: 0000089115.
Rok: 2024
Autorzy: Kacperczyk Justyna, Perdyan Adrian, Kitala-Tańska Klaudia, Kania-Zimnicka Ewa, Osowiecka Karolina, Wyszatycki Mateusz, Stompór Małgorzata
Tytuł oryginału: Metformin intake among geriatric patients may predispose to vitamin B12 deficiency: Polish population-based study
Czasopismo: Polish Annals of Medicine
Opis fizyczny: 2024, 31 (1), s. 1-6 ; bibliogr. 38 poz.
Adres url: http://www.paom.pl/pdf-176287-106608?filename=Metformin%20intake%20among.pdf
p-ISSN: 1230-8013
Język publikacji: ENG
DOI: 10.29089/paom/176287
open-access-text-version: FINAL_PUBLISHED
open-access-licence: CC-BY-NC-ND
open-access-release-time: AT_PUBLICATION
open-access-article-mode: OPEN_JOURNAL
Data ukazania się publikacji: 2024.03.04
Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie polskim
Charakt. merytoryczna: praca oryginalna
Inne bazy podające opis: Scopus
Punktacja MNiSW: 40.000
Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;nauki o zdrowiu
Afiliacja: Kacperczyk Justyna [*];355;23, Perdyan Adrian [ ];000;000, Kitala-Tańska Klaudia [*] 0009-0004-3566-2853 6374593a7523405a7dd1b006;336;23, Kania-Zimnicka Ewa [*];355;23, Osowiecka Karolina [*] 0000-0001-8931-9576 5e7094c0878c28a0473c32e5;449;25, Wyszatycki Mateusz [*];355;23, Stompór Małgorzata [*] 0000-0001-7746-4506 5e709323878c28a0473a3778;439;23

6.
IDT: 0000085311.
Rok: 2023
Autorzy: Kitala Klaudia, Tański Damian, Godlewski Janusz, Krajewska-Włodarczyk Magdalena, Gromadziński Leszek, Majewski Michał S.
Tytuł oryginału: Copper and Zinc Particles as Regulators of Cardiovascular System Function - A Review
Czasopismo: Nutrients
Opis fizyczny: 2023, 15 (13), s. 1-11 ; bibliogr. 64 poz. ; nr art. 3040
Adres url: https://www.mdpi.com/2072-6643/15/13/3040
p-ISSN: 2072-6643
Język publikacji: ENG
DOI: 10.3390/nu15133040
open-access-text-version: FINAL_PUBLISHED
open-access-licence: CC-BY

BIBLIOTEKA UNIWERSYTECKA
UWM W OLSZTYNIE

open-access-release-time: AFTER_PUBLICATION
open-access-months: 1
open-access-article-mode: OPEN_JOURNAL
Data ukazania się publikacji: 2023.07.06
Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym
Charakt. merytoryczna: praca przeglądowa
Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection ; Scopus
Impact Factor: 4.800
Punktacja MNiSW: 140.000
Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;nauki o zdrowiu;nauki o rodzinie;rolnictwo i ogrodnictwo;technologia żywności i żywienia;biotechnologia;nauki chemiczne;weterynaria
Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: Nutrients
Afiliacja: Kitala-Tańska Klaudia [*] 0009-0004-3566-2853 6374593a7523405a7dd1b006;355;23, Tański Damian [*] 0000-0001-5099-323X 5e7092d6878c28a04739dbb8;339;23, Godlewski Janusz [*] 0000-0001-6268-7694 5e7091f7878c28a04738dbfc;339;23, Krajewska-Włodarczyk Magdalena [*] 0000-0002-7857-347X 5e709409878c28a0473b53c6;479;23, Gromadziński Leszek [*] 0000-0002-8827-4203 5e709407878c28a0473b5164;451;23, Majewski Michał S. [*] 0000-0001-6304-0673 5e70921c878c28a047390128;336;23

nutrients

MDPI

Article

The Effect of an Elevated Dietary Copper Level on the Vascular Contractility and Oxidative Stress in Middle-Aged Rats

Klaudia Kitala-Tańska [1,*], Katarzyna Socha [2], Jerzy Juśkiewicz [3], Magdalena Krajewska-Włodarczyk [4] and Michał Majewski [1]

[1] Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 10-082 Olsztyn, Poland; michal.majewski@uwm.edu.pl
[2] Department of Bromatology, Medical University of Białystok, 15-222 Białystok, Poland; katarzyna.socha@umb.edu.pl
[3] Division of Food Science, Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, 10-748 Olsztyn, Poland; j.juskiewicz@pan.olsztyn.pl
[4] Department of Mental and Psychosomatic Diseases, Faculty of Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 10-082 Olsztyn, Poland; magdalenakw@op.pl
* Correspondence: klaudia.kitala@wp.pl

Abstract: Copper (Cu), being an essential mineral, plays a crucial role in maintaining physiological homeostasis across multiple bodily systems, notably the cardiovascular system. However, an increased Cu level in the body may cause blood vessel dysfunction and oxidative stress, which is unfavorable for the cardiovascular system. Middle-aged (7–8 months old) male Wistar rats (n/group = 12) received a diet supplemented with 6.45 mg Cu/kg (100% of the recommended daily dietary quantity of copper) for 8 weeks (Group A). The experimental group received 12.9 mg Cu/kg of diet (200%—Group B). An ex vivo study revealed that supplementation with 200% Cu decreased the contraction of isolated aortic rings to noradrenaline (0.7-fold) through FP receptor modulation. Vasodilation to sodium nitroprusside (1.10-fold) and acetylcholine (1.13-fold) was potentiated due to the increased net effect of prostacyclin derived from cyclooxygenase-1. Nitric oxide (NO, 2.08-fold), superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$, 1.5-fold), and hydrogen peroxide (H_2O_2, 2.33-fold) measured in the aortic rings increased. Blood serum antioxidant status (TAS, 1.6-fold), Cu (1.2-fold), Zn (1.1-fold), and the Cu/Zn ratio (1.4-fold) increased. An increase in Cu (1.12-fold) and the Cu/Zn ratio (1.09-fold) was also seen in the rats' livers. Meanwhile, cyclooxygenase-1 (0.7-fold), cyclooxygenase-2 (0.4-fold) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (0.5-fold) decreased. Moreover, a negative correlation between Cu and Zn was found (r = −0.80) in rat serum. Supplementation with 200% Cu did not modify the isolated heart functioning. No significant difference was found in the body weight, fat/lean body ratio, and organ weight for either the heart or liver, spleen, kidney, and brain. Neither Fe nor Se, the Cu/Se ratio, the Se/Zn ratio (in serum and liver), heme oxygenase-1 (HO-1), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), or intercellular adhesion molecule-1 (iCAM-1) (in serum) were modified. Supplementation with 200% of Cu potentiated pro-oxidant status and modified vascular contractility in middle-aged rats.

Keywords: copper; AH-6809; AL-8810; NS-398; TCP

check for updates

Citation: Kitala-Tańska, K.; Socha, K.; Juśkiewicz, J.; Krajewska-Włodarczyk, M.; Majewski, M. The Effect of an Elevated Dietary Copper Level on the Vascular Contractility and Oxidative Stress in Middle-Aged Rats. *Nutrients* **2024**, *16*, 1172. https://doi.org/10.3390/nu16081172

Academic Editor: Arrigo Cicero

Received: 29 February 2024
Revised: 4 April 2024
Accepted: 12 April 2024
Published: 15 April 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

In recent years, there has been a growing realization that the indispensable metallic micronutrients are of the utmost importance in various physiological processes. Copper is among the metallic elements found in this group. The significance of this phenomenon is readily apparent in both animal and human physiology. Copper, being an enzyme cofactor, plays a crucial role in the activation of various cuproenzymes (e.g., superoxide dismutase, ceruloplasmin, cytochrome-c oxidase). These cuproenzymes are responsible for facilitating important biological processes such as energy production, neuropeptide activation, iron

metabolism, neurotransmitter synthesis, and connective tissue synthesis [1,2]. Moreover, copper indirectly plays a crucial role in angiogenesis, the maintenance of neurohormone balance, and the control of gene expression. It is also essential for proper brain development, pigmentation, and the functioning of the immune system [2]. The distinctive characteristics of copper, specifically its facile transition between the two oxidation states, copper(I) and copper(II), have resulted in its incorporation as a cofactor in numerous enzymatic processes involving oxidation and reduction reactions [3]. Copper, an indispensable trace element, can elicit oxidative stress by producing reactive oxygen species when present in an excessive amount [4]. Copper-facilitated lipid peroxidation has been observed in various in vivo and in vitro investigations [5,6]. An additional possible mechanism for the potentially harmful impacts of copper involves the formation of a copper-homocysteine complex, which has been hypothesized to elicit endothelial dysfunction and cause damage to blood vessels [7]. The mechanism of this damage is not fully understood, but it may be related to free radicals [8]. Based on the available data, the observed dose–response relationship between copper exposure and its potential toxic impact on vascular health suggests a linear trend. It is noteworthy that even at lower levels of average exposure in either water or food, which are prevalent in various regions worldwide, this toxic metal may exert adverse effects on the cardiovascular system [5]. Moreover, the direct or indirect involvement of copper imbalance in the etiology of various disorders has been well-documented and encompasses severe blood disorders, liver injury, cardiovascular diseases, and neurodegenerative alterations associated with dysfunctions in copper-dependent enzymes and proteins [9].

Oxidative stress and inflammation are recognized as crucial mechanisms behind endothelial dysfunction and arterial damage. These mechanisms establish a connection between risk factors such as hyperlipidemia, diabetes mellitus, and the development of vascular disease, arterial stiffness, and the aging processes [10]. The decline in physiological function associated with aging is a universal phenomenon that affects all organ systems. The vascular system exhibits a progressive pathological remodeling process characterized by stiffness, commonly linked to abnormalities in the extracellular matrix components of collagen and elastin. This phenomenon is somewhat contingent upon cellular senescence and growth halt [11].

Several limited-scale studies examining the effects of copper supplementation on cardiovascular disease risk factors in individuals without pre-existing health conditions have yielded minimal evidence suggesting any significant influence [12]. Given the limited number of investigations on the effects of elevated copper levels on the cardiovascular system and oxidative stress in middle-aged rats, coupled with the conflicting nature of certain findings, our objective was to thoroughly investigate this particular influence.

2. Materials and Methods

2.1. Drugs and Chemicals

Acetylcholine chloride (ACh), noradrenaline hydrochloride (NA), AH-6809 (No.: 33458-93-4), AL-8810 (No.: 246246-19-5), NS-398 (No.: 123653-11-2), and tranylcypromine-TCP (No.: 1986-47-6) were shipped from Sigma-Aldrich (St. Louise, MO, USA). Stock solutions (10 mM) of AH-6809, AL-8810, NS-398, TCP were dissolved in DMSO. Noradrenaline was dissolved in a NaCl + ascorbic acid (0.9% + 0.01% *w*/*v*) solution. The solvent concentration was of less than 0.01% (*v*/*v*). These solutions were stored at −20 °C, and appropriate dilutions were made in Krebs–Henseleit solution (KH in mM: NaCl 115; $CaCl_2$ 2.5; KCl 4.6; KH_2PO_4 1.2; $MgSO_4$ 1.2; $NaHCO_3$ 25; glucose 11.1) on the day of the experiment [13]. Copper carbonate of ≥99% purity was obtained from Poch (Gliwice, Poland).

2.2. Animals and Experimental Treatments

Three-week-old male Wistar rats (Cmdb: Wi CMDB from Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany, n/group = 12) were fed a standard rat diet (Diet A) for 6–7 months with 6.45 mg copper/kg of diet (100% of the recommended daily dietary quantity of copper) and 15.9 mg zinc/kg of diet, according to the recommendations of previous studies [13–17]. For the

additional 8 weeks, rats from Group A were further supplemented with diet A. Meanwhile, rats from Group B received 12.9 mg copper/kg of diet (200% of the recommended daily dietary quantity of copper) and 15.9 mg zinc/kg of diet (Diet B) (see Table 1).

Table 1. The experimental diet composition.

	(%)		g/kg of Diet	
Casein	20		200	
DL-methionine	0.3		3.0	
Cellulose	5.0		50	
Sucrose	10		100	
Rapeseed oil	2.0		20	
Lard	6.0		60	
Vitamin mixture	1.0		10	
Mineral mixture *	3.5		35 †	
Choline chloride	0.2		2.0	
Corn starch	52 (to 100%)		520	
* Mineral mixture composition	% of mineral mixture		g/kg of diet	
Calcium carbonate ($CaCO_3$)	35.7		12.495	
Single-basic potassium phosphate (K_2HPO_4)	19.6		6.86	
Potassium citrate ($K_3C_6H_5O_7$)	7.078		2.4773	
Sodium chloride (NaCl)	7.4		2.59	
Potassium sulfate (K_2SO_4)	4.66		1.631	
Magnesium oxide (MgO)	2.4		0.84	
Micro mix **	1.8		0.63 ‡	
Corn starch	21.362 (to 100%)		7.4767 (to 35.0 †)	
** Micro mineral mixture composition	% of Diet A	% of Diet B	mg/kg of Diet A	mg/kg of Diet B
Iron citrate [16.7% Fe]	31.0	31.0	195.3	195.3
$ZnCO_3$ [56% Zn]	4.5	4.5	28.35	28.35
$MnCO_3$ [44.4% Mn]	23.4	23.4	147.42	147.42
$CuCO_3$ [55.5% Cu]	1.85	3.7	11.655	23.31
KJ	0.04	0.04	0.252	0.252
Citric acid	39.21 (to 100%)	37.36 (to 100%)	247.023 (to 630 ‡)	235.368 (to 630 ‡)

Rats were fed a standard rat diet for 6–7 months (Diet A). For additional 8 weeks, rats were supplemented with diet A (Group A) and diet B (Group B). †—refers to 35 g of mineral mixture, ‡—refers to 630 mg/kg of micro mineral mixture, * Mineral mixture composition, ** Micro mineral mixture composition.The rats were housed as previously described [13]. Food and tap water (from 20 years old plumbing with 0.35 mg copper/L) were given ad libitum. The blood was collected from the caudal vena cava of anesthetized animals. Intraperitoneal injections of ketamine (100 mg/kg BW) and xylazine (10 mg/kg BW) were used for anesthesia. During the experimentation period, two rats died from the control group (Group A), including one that died after anesthesia.

2.3. Vascular Reactivity Studies

Aortic rings were mounted in 5 mL chambers (Graz, Barcelona, Spain) under a preload tension of 1 g (FT20, TAM-A, Hugo Sachs Elektronik, March, Germany) as previously described [13]. High KCl (75 mM) and acetylcholine (10 μM) were used to check the functional integrity of aortic rings. Further, aortic rings were preincubated for 30 min with either the EP and DP receptor antagonist (AH-6809, 30 μM), the selective FP receptor antagonist (AL-8810, 10 μM), the selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor (NS-398, 10 μM), the prostacyclin (PGI_2) synthesis inhibitor (tranylcypromine, 10 μM) and con-

tracted with noradrenaline (0.1 μM). The cumulative concentrations (CCs) of acetylcholine (0.1 nM–10 μM) were added into the incubation chambers to analyze vasodilatory response [13].

2.4. The Langendorff Heart

The Langendorff system with the ISOHEART software 73-0161 (Hugo Sachs Elektronik, March, Germany) was used for isolated heart studies as previously described [13].

2.5. Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) for Cu, Zn, Fe, Se in Rat Serum and Liver

The concentration of elements was determined by AAS with flame atomization in acetylene–air flame at a wavelength of 248.3 nm (iron), 213.9 nm (zinc), and with electrothermal atomization at a wavelength of 324.8 nm (copper), and 196.0 nm (selenium), respectively, with a Zeeman background correction. Matrix modifiers were added for selenium analysis (palladium 1500 ppm, magnesium 900 ppm modifiers). The accuracy and precision of the methods were verified using certified reference materials (Seronorm Trace Elements Serum, Billingstad, Norway).

2.6. Total Antioxidant Status (TAS)

The Randox kit was used to measure the blood serum TAS by a spectrophotometric method.

2.7. ELISA Protocol

Commercial ELISA kits were used for COX-1, COX-2, heme oxygenase-1 (HO-1), endothelial nitric oxide synthase 3 (NOS3), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) determination in the blood serum (see Table S1). The absorbance in the ELISA test plate was measured by Thermo Scientific microplate readers (Varioskan LUX, Bremen, Germany) at a wavelength of λ = 450 nm.

2.8. Cu and Zn Determination in Rats' Feed

Wet mineralization of samples was performed in concentrated HNO_3 using the microwave technique in a closed system (Berghof, SpeedWave, Eningen, Germany). Zinc was determined by the AAS technique with atomization in an acetylene–air flame at a wavelength of 213.9 nm, and copper by the AAS method with electrothermal atomization in a graphite cuvette at a wavelength of 324.8 nm (Hitachi Z-2000, Tokyo, Japan).

2.9. Body Composition Analysis

Precise fat, fluid and lean tissue measurements on rats were performed with Bruker Minispec LF (Ettlingen, Germany) based on TD-NMR.

2.10. NO, $O_2^{\bullet -}$ and H_2O_2 Detection

Diaminofluorescein (DAF), dihydroethidium (DHE) and 2′,7′-dichlorofluorescein diacetate (DCF) were used to evaluate the nitric oxide, superoxide anion and hydrogen peroxide levels in situ, as previously described [18]. Incubation was also conducted with the nuclear dye 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 10 μg/mL) as DAF + DAPI, DHE + DAPI and DCF + DAPI for 30 min in the oven at 37 °C. The fluorescence images were obtained with a LEICA (TCS ST2DM IRE2) laser scanning confocal microscope (568 nm and 410–475 nm for the DAPI dye).

2.11. Data Analysis and Statistics

Vascular contraction to noradrenaline (0.1 μM) was expressed in mg of tension; vascular relaxation to acetylcholine was expressed as a percentage of the contractile response to noradrenaline. The cumulative concentration–response curves (CCRCs) were analyzed by a log agonist vs. response (nonlinear regression model). The group comparison was performed by either a parametric (*t*-test) or non-parametric test (Mann–Whitney U-test or

Kruskal–Wallis test). The number of animals varies due to technical reasons and material availability. CCRCs were analyzed by two-way ANOVA with Šídák's multiple comparisons test. The results are expressed as the means ± SEM (for CCRCs) and means ± SD. The level of significance was set as * $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Copper and Zinc Concentration in Rats' Feed (Atomic Absorption Spectroscopy—AAS)

In rats fed copper, the concentration was 7.83 ± 1.16 mg/kg of diet (in Group A) and increased to 17.86 ± 1.37 mg/kg of the diet (in Group B). Zinc was determined at similar levels of 25.59 ± 3.28 mg/kg (Group A) and 24.55 ± 3.58 mg/kg (Group B).

3.2. Animal Weight Gain and Body Composition (Time-Domain NMR)

The body weight gain, the weight of internal organs (heart, liver, spleen, kidney, brain), and the ratio of body fat to lean part (TD-NMR) did not change and were like those reported in previous studies [13,14] (see Table S2).

3.3. The Langendorff Heart

The values obtained from the isolated heart technique of the middle-aged rats (cardiac contractile strength and the heart rate) did not change between the groups (see Table S2).

3.4. Vascular Contraction

The vasoconstrictor response to high KCl (75 mM) did not differ between the groups (2.1 ± 0.05 g Group A vs. 2.2 ± 0.06 g Group B). However, noradrenaline (10 µM)-induced contraction decreased by 0.66-fold in the B Group (control conditions-CC) (see Figure 1a). Preincubation with NS-398 (0.5-fold, Figure 1b), AH-6809 (0.7-fold, Figure 1c), and TCP (0.6-fold, Figure 1d) decreased contraction similarly to CC, which points to the small effect of these factors on vascular contraction. In contrast, changes in vasoconstriction were not observed for AL-8810 (1.4-fold, Figure 1e), which points towards the FP receptors which modified this response (see Table 2).

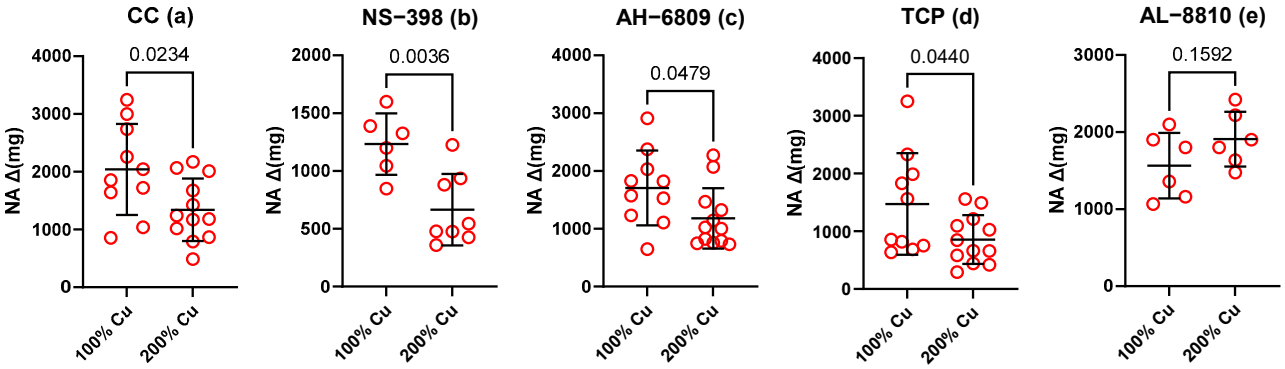


Figure 1. Vascular contraction to noradrenaline (NA, 0.1 µM) in the isolated thoracic arteries dissected from rats supplemented with 6.45 mg (100%—Group A) and 12.9 mg (200%—Group B) Cu/kg of diet for 8 weeks. Aortic rings were studied under the control conditions (**a**) or after preincubation with the selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor (NS-398, 10 µM) (**b**), the EP and DP receptor antagonist (AH-6809, 30 µM) (**c**), the prostacyclin (PGI2) synthesis inhibitor (tranylcypromine, 10 µM) (**d**), the selective FP receptor antagonist (AL-8810, 10 µM) (**e**). Values are means ± SD, $p \leq 0.05$ (*t*-test).

Table 2. Significant differences detected.

	100%—Group A *†			200%—Group B †					
	n	**Mean**	**"Std. Deviation"**	**n**	**Mean**	**"Std. Deviation"**	***t* Test**	***p* Value**	**x-Fold**
NA induced contraction Δ(mg)	9	2040	789.3	9	1342	539.6	Unpaired *t* test	0.0303	0.7
NS-398 Δ(mg)	6	1234	265.9	8	665.7	309.3	Unpaired *t* test	0.0036	0.5
AH-6809 Δ(mg)	10	1706	648.9	12	1181	521.3	Unpaired *t* test	0.0479	0.7
TCP Δ(mg)	10	1471	879.9	12	856.5	420.2	Unpaired *t* test	0.0440	0.6
AL-8810 Δ(mg)	6	1422	467.1	6	1938	453.1	Unpaired *t* test	0.1592	1.4
TAS (mmol/L) in rat serum	10	0.386	0.279	11	0.607	0.164	Unpaired *t* test	0.0374	1.6
Cu (mg/L) in rat serum	10	1.011	0.227	10	1.216	0.195	Unpaired *t* test	0.0445	1.2
Zn (mg/L) in rat serum	10	0.961	0.054	10	1.020	0.080	Mann–Whitney test	0.0137	1.1
Cu/Zn molar ratio in rat serum	9	1.018	0.211	9	1.396	0.479	Mann–Whitney test	0.0315	1.4
Cu (µg/g) in the liver	10	3.110	0.180	11	3.492	0.446	Mann–Whitney test	0.0159	1.12
Cu/Zn molar ratio in the liver	10	0.133	0.006	11	0.145	0.014	Mann–Whitney test	0.0295	1.09
COX-1 (ng/mL) in rat serum	9	1.823	0.607	9	1.315	0.285	Mann–Whitney test	0.0244	0.7
COX-2 (pg/mL) in rat serum	7	315.9	144.3	6	130.6	73.11	Mann–Whitney test	0.0082	0.4
GAPDH (ng/mL) in rat serum	8	0.506	0.302	8	0.240	0.166	Unpaired *t* test	0.0465	0.5
NO detection (DAF) in aortic rings	5	6212	1012	5	12,600	1209	Unpaired *t* test	0.0254	2.08
$O_2^{\bullet-}$ detection (DHE) in aortic rings	6	4026	358.8	5	6064	1789	Unpaired *t* test	0.0238	1.5
H_2O_2 detection (DCF) in aortic rings	5	6023	897.0	5	14,104	1187	Unpaired *t* test	0.0187	2.33

n varies: one rat died after oral glucose tolerance test, and one rat died after ketamine injection from the control group *. Moreover, a few simple lab mistakes occurred (aorta rupture, blood coagulation or not enough blood) †.

In the control group (Group A, Figure 2a), NS-398 and TCP decreased vascular contraction to NA compared to the control conditions by 0.6-fold and 0.7-fold, respectively. In the examined group (Group B, Figure 2b), contraction was decreased to a higher extent by 0.5-fold and 0.6-fold, respectively. Neither AH-6809 nor AL-8810 modified the contractile response to NA in Group A and Group B (see Table 2).

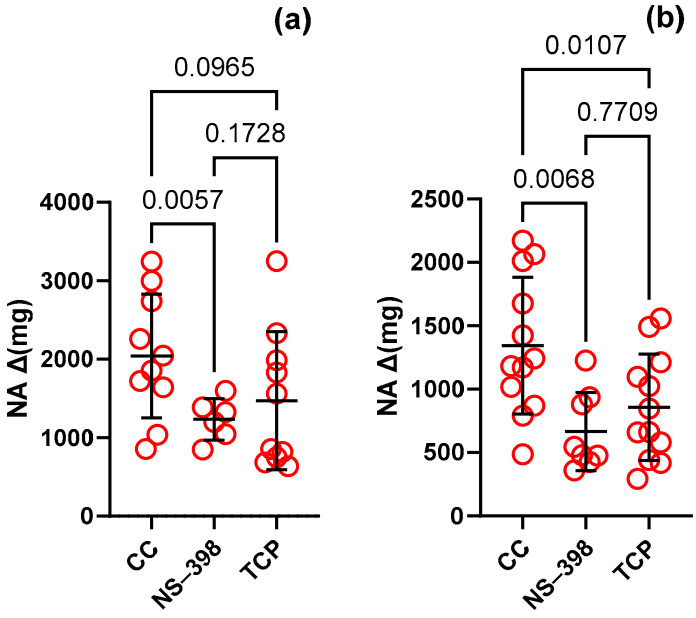


Figure 2. Vascular contraction to noradrenaline (NA, 0.1 µM) in the isolated thoracic arteries dissected from rats supplemented with 6.45 mg (100%—Group A) (**a**) and 12.9 mg (200%—Group B) (**b**) Cu/kg of diet for 8 weeks. Values are means ± SD, $p \leq 0.05$ (two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test).

3.5. Vascular Relaxation

The vasodilator response to acetylcholine (10–100 nM) and sodium nitroprusside was potentiated in Group B by 1.13-fold, $p = 0.0154$ (AUC), and 1.10-fold, $p = 0.0348$ (AUC), respectively (see Figure 3 and Table 3).

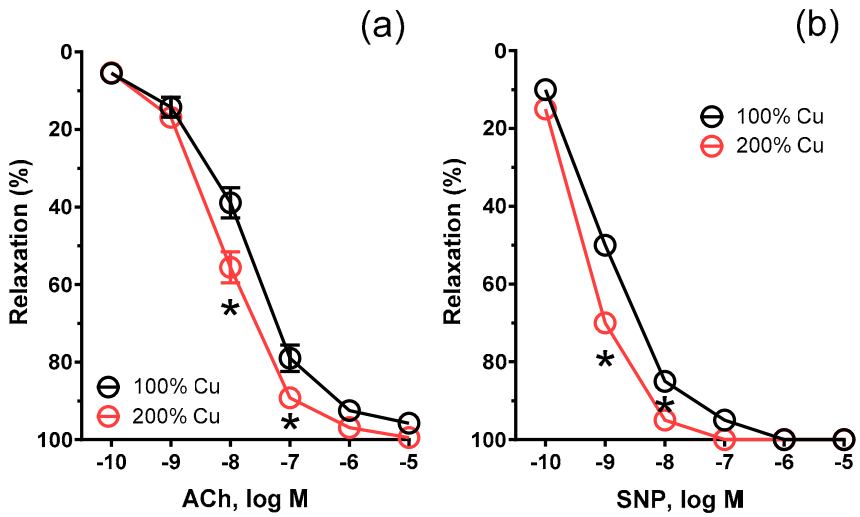


Figure 3. Vasodilation to cumulative concentrations of acetylcholine (ACh, 0.1 nM−10 µM) (**a**) and sodium nitroprusside (SNP, 0.1 nM−10 µM) (**b**) in the isolated thoracic arteries dissected from rats supplemented with 6.45 mg (100%—Group A) and 12.9 mg (200%—Group B) Cu/kg of diet for 8 weeks. Values are means ± SEM, n = 12, * vs. control diet (100% copper), $p \leq 0.05$ (two-way ANOVA with Šídák's multiple comparisons test).

Table 3. The influence of sodium nitroprusside (SNP) and the EP and DP receptor antagonist (AH-6809, 30 µM), the selective FP receptor antagonist (AL-8810, 10 µM), the selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor (NS-398, 10 µM), and the prostacyclin (PGI2) synthesis inhibitor (Tranylcypromine, 10 µM) on the vasorelaxant effects to acetylcholine (ACh, 0.1 nM–10 µM) of thoracic arteries from Wistar rats supplemented with 6.45 mg (100%) and 12.9 mg (200%) Cu/kg of diet for 8 weeks.

	100% Cu—Group A				200% Cu—Group B			
	n	**AUC**	**Emax (%)**	**pEC$_{50}$**	**n**	**AUC**	**Emax (%)**	**pEC$_{50}$**
Control Conditions	8	275.2 ± 33.58	94.33 ± 1.722	7.740 ± 0.062	9	310.1 # ± 23.95	97.94 ± 1.213	8.074 # ± 0.043
NS-398	6	295.6 ± 29.72	97.09 ± 2.412	7.906 ± 0.087	7	306.8 ± 40.23	98.44 ± 2.213	7.917 ± 0.080
AH-6809	10	244.7 * ± 37.1	90.98 * ± 2.835	7.497 * ± 0.104	12	241.2 * ± 44.0	93.81 ± 2.311	7.597 * ± 0.079
Tranylcypromine	9	251.8 ± 46.85	91.79 ± 1.906	7.641 ± 0.069	10	287.4 *# ± 22.91	96.76 ± 1.021	7.859 ± 0.035
AL-8810	6	272.6 ± 20.18	94.91 ± 1.743	7.709 ± 0.063	6	247.4 # ± 56.66	89.81 ± 3.853	7.685 ± 0.140
1400W	6	267.7 ± 42.35	96.36 ± 1.693	7.772 ± 0.055	6	253.3 ± 40.27	95.83 ± 1.385	8.126 # ± 0.053
SNP	6	385 ± 83.93	98.88 ± 1.417	8.661 ± 0.234	6	422.5 # ± 67.84	99.92 ± 3.626	9.397 # ± 0.263

Values are based on the concentration–response curves. Data are expressed as means ± SD where n represents the number of animals, n varies, $p \leq 0.05$ * vs. control conditions, # vs. the control Group A as determined by ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

Compared to the control conditions, preincubation with AH-6809 and TCP decreased vasodilation to acetylcholine in Group B by 0.8-fold, $p = 0.001$ and 0.9-fold, $p = 0.0389$, respectively. In the control group (Group A), a significant decrease was observed when aortic rings were pre-incubated with AH-6809 by 0.9-fold, $p = 0.05$ but not TCP. No significant difference was observed after preincubation with NS-398, AL-8810 or 1400W (see Figures 4 and S2).

Compared to Group A, no significant difference in vasodilation was observed after preincubation with NS-398, AH-6809, and AL-8810; the same was not observed with TCP (see Figure S1).

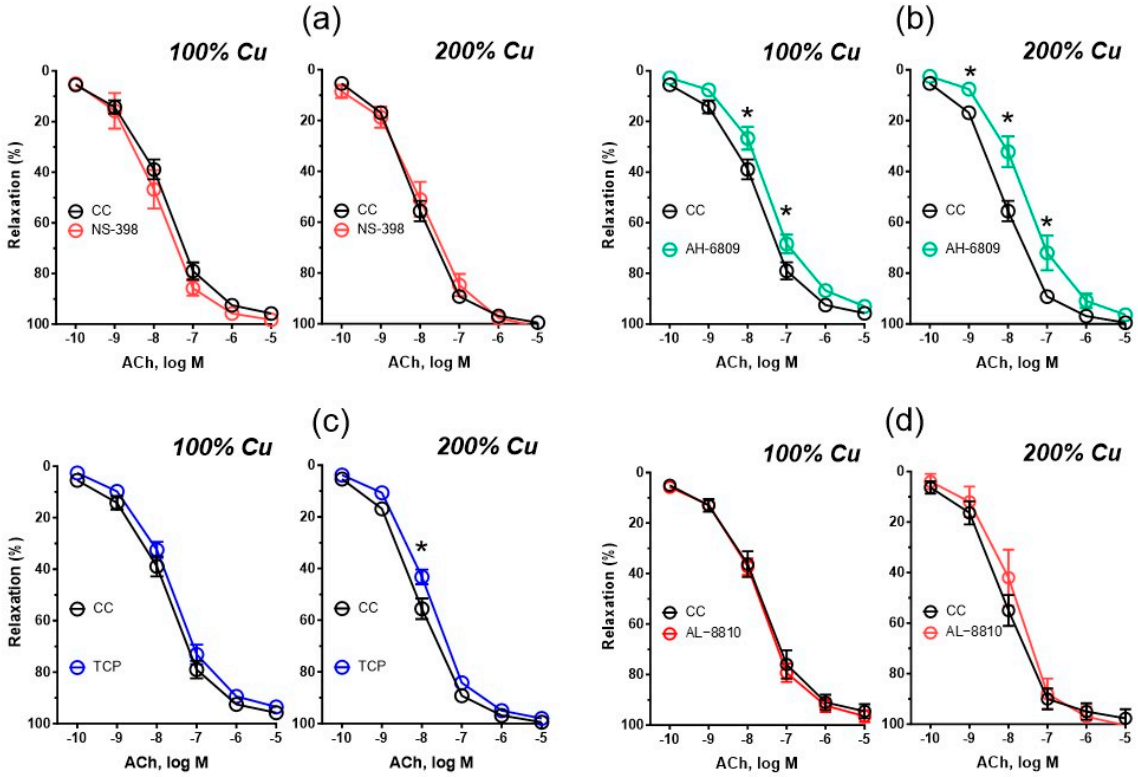


Figure 4. The cumulative concentration–response curves to acetylcholine (ACh, 0.1 nM–10 μM) in the isolated thoracic arteries dissected from rats supplemented with 6.45 mg (100%—Group A) and 12.9 mg (200%—Group B) Cu/kg of diet for 8 weeks. Aortic rings were preincubated (30 min) with the selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor (NS-398, 10 μM) (**a**), the EP and DP receptor antagonist (AH-6809, 30 μM) (**b**), the prostacyclin (PGI2) synthesis inhibitor (tranylcypromine, 10 μM) (**c**), the selective FP receptor antagonist (AL-8810, 10 μM) (**d**). Values are means ± SEM, n varies, * vs. control conditions, $p \leq 0.05$ (two-way ANOVA with Šídák's multiple comparisons test). CC—control conditions.

3.6. Total Antioxidant Status (TAS) in the Blood Serum

TAS increased in Group B by 1.6-fold compared to the control group (Group A) (see Figure 5). A positive correlation was detected between TAS and Fe in both studied groups (r = +0.7, $p = 0.024$, Group A and +r = 0.61, $p = 0.05$, Group B) (see Figure 6).

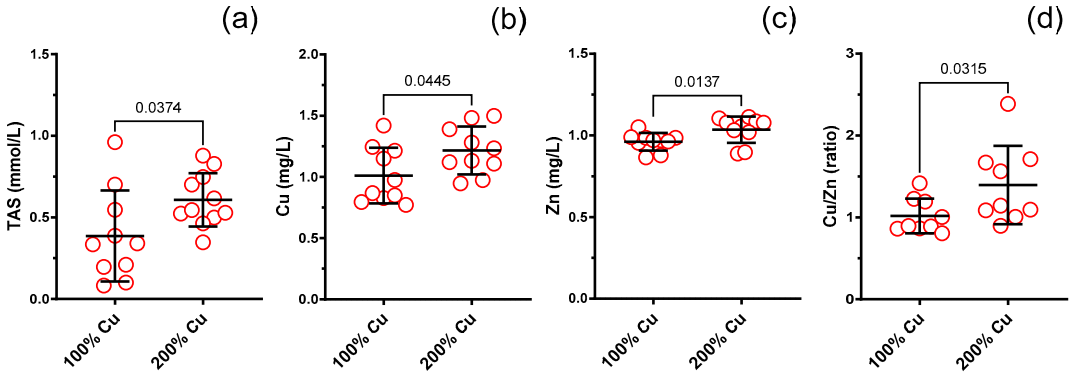


Figure 5. Total antioxidant status (TAS) (**a**), copper (Cu) (**b**), zinc (Zn) (**c**) and Cu/Zn molar ratio (**d**) measured in the blood serum of experimental rats supplemented with 6.45 mg (100%—Group A) and 12.9 mg (200%—Group B) copper/kg of diet for 8 weeks. Values are means ± SD, n varies, $p \leq 0.05$ (*t*-test).

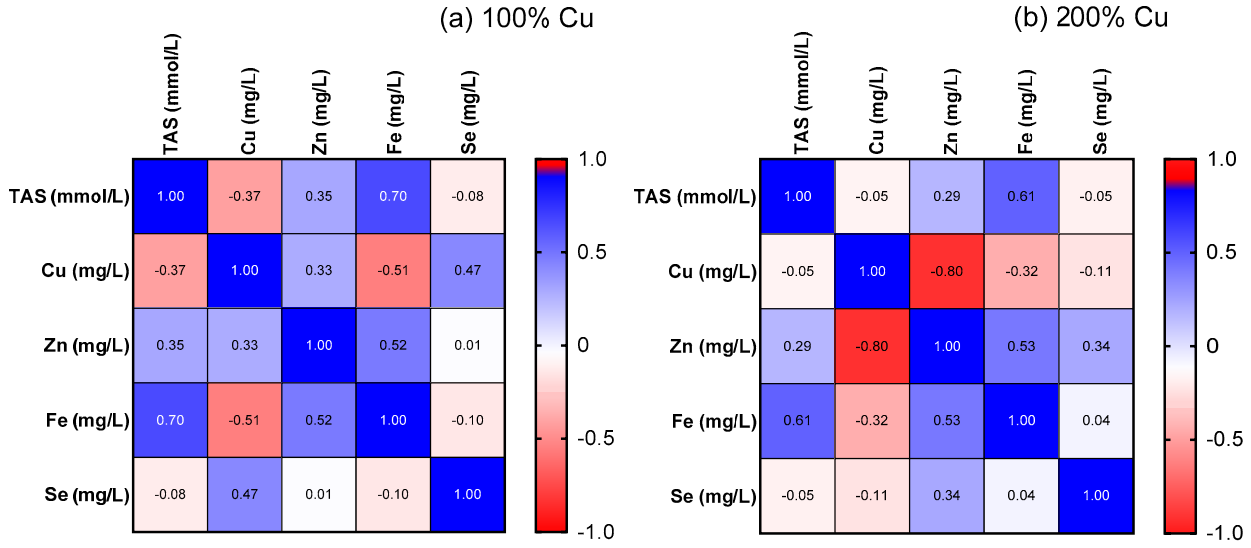


Figure 6. Correlation matrix. Pearson's r correlation. Rats were supplemented with 6.45 mg (100%—Group A) (**a**) and 12.9 mg (200%—Group B) (**b**) Cu/kg of diet for 8 weeks. Positive correlation was found between TAS and Fe in both studied groups. Negative correlation was observed between Cu and Zn in the 200% copper group. Cu—copper, Zn—zinc.

3.7. Cu, Zn, Fe, Se in the Rat Serum (AAS)

Copper (1.2-fold), zinc (1.1-fold) and copper/zinc molar ratio (1.4-fold) increased together with copper supplementation (Group B) (see Figure 5). Neither iron (1.0-fold) nor selenium (1.0-fold) were changed (see Table S2).

Moreover, a negative correlation (r = −0.80, $p = 0.006$) was found between copper and zinc in Group B, which was not observed in Group A (r = 0.33, $p = 0.3561$) (see Figure 6).

3.8. Cu, Zn, Fe, Se in Rat Liver (AAS)

Copper (1.12-fold) and the copper/zinc molar ratio (1.09-fold) increased together with copper supplementation (Group B) (see Figure 7). Neither zinc (1.05-fold) nor iron (1.05-fold) or selenium (1.0-fold) were changed (see Table S2).

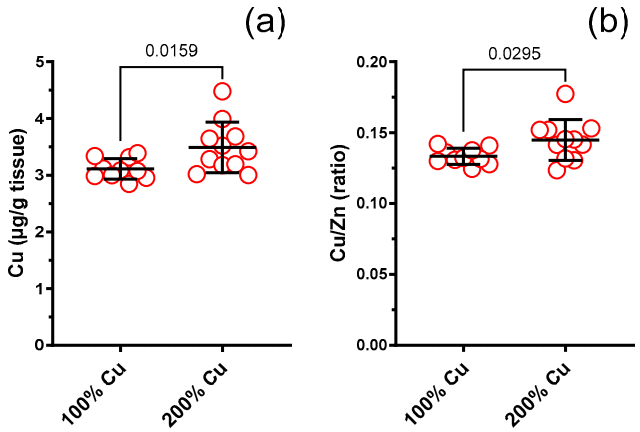


Figure 7. Copper (Cu) (**a**), and Cu/Zn molar ratio (**b**) measured in the liver of experimental rats supplemented with 6.45 mg (100%—Group A) and 12.9 mg (200%—Group B) Cu/kg of diet for 8 weeks. Values are means ± SD, n varies, $p \leq 0.05$ (*t*-test).

3.9. ELISA Studies

COX-1 (0.7-fold), COX-2 (0.4-fold), and GAPDH (0.5-fold) decreased in Group B (see Figure 8 and Table 2). Neither HO-1 nor NOS3 or iCAM-1 were modified (see Table S2).

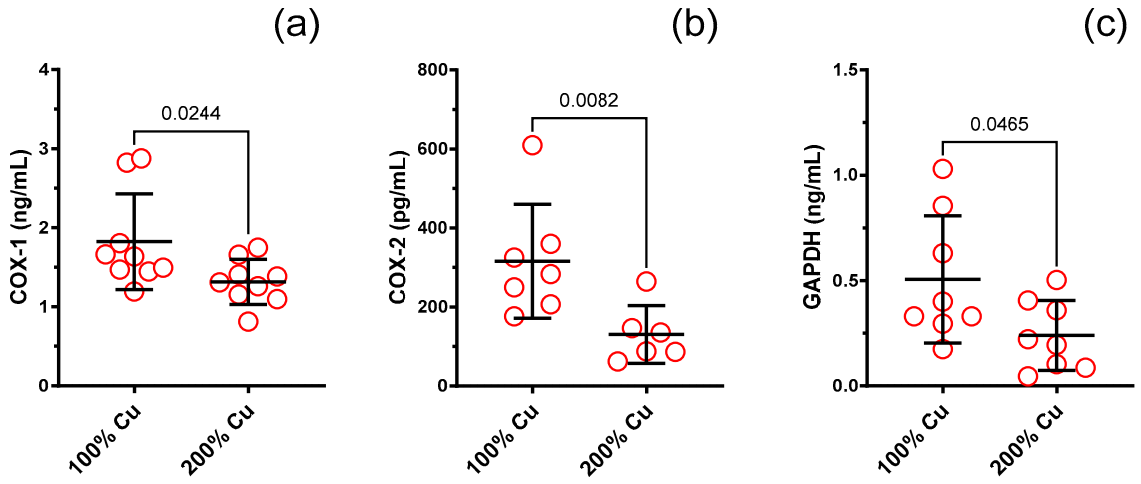


Figure 8. ELISA study. COX-1 (**a**), COX-2 (**b**) and GAPDH (**c**) measured in the blood serum of experimental rats supplemented with 6.45 mg (100%—Group A) and 12.9 mg (200%—Group B) Cu/kg of diet for 8 weeks. Values are means ± SD, n varies, $p \leq 0.05$ (*t*-test).

3.10. NO, $O_2^{\bullet -}$ and H_2O_2 Detection

The fluorescence technique revealed increased tissue concentration of NO (2.08-fold), $O_2^{\bullet -}$ (1.5-fold) and H_2O_2 (2.33-fold) with the increased Cu dose (see Table 2).

4. Discussion

The available literature lacks data on the effect of copper supplementation on aortic contractility and relaxation in the aging body; so, our research results fill this gap. It is worth emphasizing that the majority of feeding studies are conducted on young rats instead of aged animals, when pathological changes occur within the body. Aging processes modify the proper physiological vascular functioning, including increased vascular stiffness and decreased vascular response to noradrenaline and acetylcholine. In the presented study, increased copper intake resulted in a weaker vasoconstriction under the influence of noradrenaline. Similar to these results, copper at 10 and 16 µM (≈0.635 and 1.016 mg/L) has also been documented to inhibit phenylephrine-mediated contraction in a dose-dependent manner in isolated rings of rat thoracic aorta in vitro [19]. Another in vitro study revealed that copper pretreatment antagonized noradrenaline-induced vasoconstriction dependently and independently on the nitric oxide bioavailability, suggesting that the copper-induced effect was caused by a mechanism other than nitric oxide [20]. Moreover, these results have suggested that variations in the serum concentrations of copper might lead to changes in the alpha 1-adrenoreceptor-mediated vasoconstrictive response. It is worth mentioning that in our experimentation, supplementation increased the copper concentration in the blood serum (1.2-fold, from 1.011 mg/L to 1.216 mg/L), as well as in the liver (1.12-fold, from 3.110 µg/g to 3.492 µg/g). Afrin et al. reached different conclusions, as exposure to 6 µM copper(II) (≈0.381 mg/L) enhanced phenylephrine-induced contraction of rat aortic rings in organ baths. The authors concluded that both the increased intracellular calcium and reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS) may produce copper(II)-induced hypercontraction, contrary to the cyclooxygenase (COX)-mediated pathway, which has little effect on copper(II)-mediated aortic ring contraction [21]. Our results have shown that preincubation with the selective prostaglandin F (FP) receptor antagonist (AL-8810), made insignificant the vasoconstrictor response between the groups. This was contrary to COX-2 inhibitor (NS-398), the non-selective EP and DP1 receptor antagonist (AH-6809) and prostacyclin synthesis inhibitor (TCP), which did not change the observed differences in the noradrenaline-induced vasoconstriction of isolated aortic rings between the studied groups (100% vs. 200% Cu). This was reflected in the subsequent results on the increased

participation of ROS in the aortic rings of supplemented rats, namely, nitric oxide (NO, 2.08-fold), superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$, 1.5-fold) and hydrogen peroxide (H_2O_2, 2.33-fold).

The discrepancies described between the in vitro studies are difficult to explain. However, the differences between in vitro and in vivo studies might be due to the fact that during prolonged supplementation, other mechanisms related to vascular remodeling and activation of different enzymes may occur, opposite to in vitro studies, which do not modify the vascular structure or proteins but modify the ROS and RNS formation. Another explanation of the described discrepancies is based on differences in copper administration, rat strain and animal age.

Aging processes induce the impairment of endothelium-dependent vasodilation [22]. Decreased endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and endogenous nitric oxide bioavailability are key factors of endothelial dysfunction. Tian et al. observed an increased expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), which generates oxidative stress through the formation of the toxic oxidant molecule peroxynitrite ($ONOO^-$), which leads to a further decrease in nitric oxide bioavailability in the vascular tissues of elderly rats (24–25 months old, weight 400–500 g, Sprague Dawley rats). Furthermore, this study reported that the application of a potent, selective iNOS inhibitor (1400W) enhanced the functionality of endothelium-dependent vasodilation in aged animals due to the attenuation of $ONOO^-$ formation [22]. However, in our study, iNOS inhibition did not modify the vasodilator response to acetylcholine in both studied groups.

In our study (9–10-month-old middle-aged Wistar rats, weighing 471.1–588.1 g), the administration of an increased copper dose potentiated in a significant way the sensitivity of aortic rings to acetylcholine and sodium nitroprusside (SNP). Acetylcholine induces vasodilation of the smooth muscles in the vascular system by activating multiple pathways, including those dependent on and independent of either nitric oxide or prostanoids [23]. In contrast, SNP-induced vasodilation constitutes a NO-independent mechanism, since SNP is the exogenous donor of NO; so, the vasodilator response is not dependent on the impaired NO bioavailability. In line with the presented results, Lamb et al. showed that copper supplementation facilitates arterial relaxation by potentiating nitric oxide bioavailability in carotid aortic rings of New Zealand white rabbits fed with a cholesterol diet [24]. In another in vitro study, Wang et al. examined the direct impact of copper on the vasoreactivity of the rat mesenteric artery. The mesenteric rings exhibited vasodilation in a dose-dependent manner when exposed to copper chloride (the higher the copper concentration, the greater the relaxation). Nevertheless, this vasodilatory effect was significantly reduced when the mesenteric rings were pre-treated with L-NAME, an inhibitor of eNOS [20], which suggests that the nitric-oxide-dependent mechanism was involved in this process.

In opposition to the findings of the aforementioned study, prolonged incubation of aortic rings with copper(II) sulfate at concentrations of copper(II) lower than 1 µM (≈0.0635 mg/L) led to a decreased vasodilatory reaction to acetylcholine [25]. In contrast to these results, it has been observed that the presence of ionically bonded copper did not impede the nitric-oxide-mediated responses. In another experiment, the implementation of a standard copper dose compared to a copper-deficient diet (no added copper into the mineral matrix) potentiated vasodilation to acetylcholine and increased noradrenaline-induced contraction, together with an increase in the blood plasma copper from 3.4 µM (≈0.22 mg/L) to 18.3 µM (≈1.16 mg/L), ceruloplasmin, lipid hydroperoxides (LOOH) and malondialdehyde (MDA). Meanwhile, there was a decrease in superoxide dismutase (SOD) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) [14].

Another explanation of the observed potentiated changes in vasorelaxation to acetylcholine may be due to the fact that the aortic rings from our experimental group had a weaker response to noradrenaline both in the control group (control conditions) and after preincubation with NS-398, AH-6809 and TCP.

Interestingly, Majewski et al. described the advantageous administration of dietary resveratrol in conjunction with a standard copper dose, which manifested as enhanced vasodilation to acetylcholine and SNP, which, when together, constitute the mechanism in-

dependent on nitric oxide bio-availability, and decreased vasoconstriction to noradrenaline, along with reduced markers of lipid peroxidation in the blood plasma, reflected as decreased LOOH and MDA in supplemented rats (12 weeks of age Wistar rats) [15]. In the other study, the interaction between copper and homocysteine slowed down the endothelium-dependent arterial dilatation, which potentially facilitates the development of retinal vascular disease [26].

We have also investigated the COX pathway in which copper may exert an impact on the vasodilation of blood vessels in response to acetylcholine. During the process of preincubating aortic rings with various receptor inhibitors/antagonists (the selective COX-2 inhibitor NS-398, the non-selective EP1, EP2, EP3, and DP1 receptor antagonist AH-6809, and the selective FP receptor antagonist AL-8810), no statistically significant differences were observed in the vascular relaxation of precontracted aortic rings between the two analyzed copper groups. Interestingly, Nelson et al. in their study on the role of dietary copper found a possible involvement of copper deficiency in the reduction in prostacyclin secretion in the aortic rings [27]. In our study, arteries that were preincubated with the prostacyclin synthesis inhibitor tranylcypromine exhibited an increased vasodilator response to acetylcholine compared to the control group and a decreased vasodilator response compared to the control conditions, which indicates the involvement of the increased copper supplementation in the COX pathway and the increased participation of prostacyclin derived from COX-1, but not COX-2 in vasodilation, since the acetylcholine vasodilator response under the influence of the selective COX-2 antagonist (NS-398) was not modified. This points towards the prostacyclin pathway being involved in an increased vascular relaxation of 200% copper-supplemented rats. In previous studies, Majewski et al. demonstrated that prior exposure to inhibitors targeting both COX-2 and COX-1/2 reduced the vasodilatory response in copper nanoparticle-supplemented rats. Majewski et al. suggested that prostanoids derived from COX-2 play a significant role in the overall vasodilatory effect in copper-nanoparticle-fed rats [28], and this was due to the effect of nanoparticles rather than the copper ions themselves. Regrettably, the existing literature lacks additional references to the dietary ionic copper surplus in the COX pathway, leaving a notable dearth of research pertaining to the impact of elevated copper levels on vessels, as well as the underlying mechanisms behind this action.

Our findings have also revealed that an increased amount of dietary copper (200%) led to a reduction in the levels of COX-1, COX-2, and GAPDH within the blood serum of rats. No significant differences were observed regarding iCAM-1, HO-1, and eNOS when exposed to an excess of copper. Both COX-1 and COX-2, as pivotal enzymes in the cardiovascular system of arachidonic acid metabolism to prostaglandins, play a crucial role in a wide array of functions that can at times exhibit contrasting effects. The pro-thrombotic nature of the enzyme COX-2 in platelets is attributed to its ability to facilitate the synthesis of thromboxane. In contrast, it is noteworthy that the production of prostacyclin by COX-1 in endothelial cells exhibits antithrombotic properties. Additionally, within the kidney, COX plays a crucial role in regulating renal function and blood pressure [29]. A reduced concentration of COX-2 is the mechanism engaged in the control of enhanced oxidative stress when enzymes became depleted due to excessive exposure. Interestingly, Schuschke et al. reported an enhanced expression of COX-2 in response to insufficient dietary copper consumption [30], which may suggest that indeed copper excess may inhibit COX-2. On the other hand, a decrease in COX-1 isoform remains controversial, as it may have some adverse effects on the gastrointestinal tract and coagulation processes.

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is the enzyme essential for energy metabolism and cytoplasmic anaerobic glycolysis to produce ATP and pyruvate. GAPDH has many activities beyond energy metabolism. Increased GAPDH gene expression and enzymatic function are linked to cell proliferation and tumorigenesis, while increased oxidative stress impairs GAPDH catalytic activity and causes cellular aging and apoptosis [31]. This confirms the results of our studies, which indicate an increased presence of ROS and RNS in the aorta, and GAPDH in the blood. Khan et al. conducted a

study to evaluate the baseline skin perfusion and brachial artery flow-mediated dilatation (FMD) while also exploring potential associations between vascular responses and blood GAPDH Ct levels. Higher Ct values were observed to correspond to reduced levels of GAPDH mRNA, indicating a positive correlation between elevated values of FMD, and diminished expression of GAPDH in the bloodstream [32].

Changes in the total antioxidant status suggest the presence of an increased oxidative stress and heightened vulnerability to oxidative harm [33]. In our study, the total antioxidant status of blood was increased, indicating a significant enhancement of the body's ability to counteract oxidative damage. This outcome suggests that due to the presence of increased dietary copper, increased oxidative stress occurred. This was confirmed by the parallel increase in NO, $O_2^{\bullet -}$ and H_2O_2, which was determined in the aortic rings. Certain investigators have suggested a noteworthy correlation between indicators of oxidative stress, such as elevated levels of NT (nitro-tyrosine) and modified TAS, and a progressive rise in dietary and serum copper concentrations [34]. The relationship between excess copper and oxidative stress remains inadequately explicated in the existing body of scientific literature.

In addition, we noticed significant differences between the two groups of supplemented rats with regard to an increased concentration of copper, zinc, and the copper/zinc ratio in the blood, with no alterations in the concentration of either selenium or iron. Neither the copper/selenium nor the selenium/zinc ratio were changed by copper supplementation, which, at least in part, might be explained by the fact that zinc increased only 1.1-fold in this study. Additionally, a negative correlation between the copper and zinc concentration was observed in the blood serum of 200%-copper-supplemented rats which was not seen in the control group (100% copper). Interestingly, this experimentation has revealed a significant positive correlation between the total antioxidant status (TAS) and the iron concentration in the blood serum of rats from both studied groups, even though the serum iron was not modified by the increased copper intake, contrary to the increased TAS.

The concentration of elements, especially the concentration of copper, does not always allow us to properly assess their possible deficiency in the body; so, it is better to determine their content in the liver, as this allows to take a closer look at the processes taking place in the body. However, only copper increased in the rat liver. Neither zinc nor iron or selenium changed.

An elevated level of copper and decreased zinc represents a frequently encountered trace-metal imbalance [35]. Copper availability is subjected to numerous influencing factors, among which zinc supplementation emerges as a particularly noteworthy factor of clinical significance. The administration of zinc has been observed to stimulate the expression of the metal-binding protein known as metallothionein within the gastrointestinal tract, thereby leading a consequential reduction in the absorption of copper [36]. However, in this study, this was not the case since the rats were not supplemented with zinc. Although serum zinc increased in the entire group, the tendency within the group was a decrease in zinc with a concurrent copper increase.

There were no observed statistically significant variations in body weight gain, fat, or lean body composition. Furthermore, no noticeable discrepancies were detected in organ weight for either the heart or liver, spleen, kidney, and/or brain. The findings of earlier research corroborate the information presented in this report [37]. In line with our findings, Filetti et al. demonstrated that animals in both the control group and those that received varying doses of copper showed no significant differences in weight at the beginning and at the end of the treatment [38]. This is contrary to Banach et al., who found that excess body weight relates to an increased concentration of copper [39]. Interestingly, changes were also observed in copper-deficient mice, which exhibited notable variations in organ weight in comparison to the control group. During copper deficiency, there was an observed increase in both liver and heart weight when compared to the control group. The mice that were deficient in copper exhibited a decrease in absolute brain weight, while kidney weight remained unchanged without any significant alterations [40]. The Langendorff

technique (the isolated perfused heart assay) was also not modified. Interestingly, Filetti et al. suggested that copper administration over 4 weeks can impair cardiac contraction without altering vascular reactivity [38]. However, in this specific study, copper was injected via i.p. instead of given with food, and different concentrations were examined.

5. Conclusions

Our experimentation exposed that supplementation with 200% copper modified vascular contraction and relaxation, and this was due to increased ROS and prostaglandin formation, which modified the antioxidant status in middle-aged rats. It is imperative to conduct further investigations concerning the ramifications of elevated dietary copper on living organisms as a consequence of the escalating levels of environmental food and water contamination, as well as the presence of metabolic syndrome.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu16081172/s1, Table S1: The ELISA kits used for the determination of antioxidant status in the present study; Table S2: Significant differences not detected; Figure S1: The cumulative concentration–response curves to acetylcholine (ACh, 0.1 nM–10 μM) in the isolated thoracic arteries dissected from rats fed with experimental diets. Aortic rings were incubated with NS-398, AH-6809, TCP and AL-8810. Values are means ± SEM, n = 12, * vs. control diet (100% copper), $p \leq 0.05$ (two-way ANOVA with Šídák's multiple comparisons test); Figure S2: The cumulative concentration–response curves to acetylcholine (ACh, 0.1 nM–10 μM) in the isolated thoracic arteries dissected from rats fed with experimental diets. Aortic rings were incubated with 1400W. Values are means ± SEM, n varies, * vs. control conditions, $p \leq 0.05$ (two-way ANOVA with Šídák's multiple comparisons test).

Author Contributions: Conceptualization, K.K.-T., J.J. and M.M.; Funding Acquisition, M.K.-W. and M.M.; Investigation, K.K.-T., K.S. and M.M.; Methodology, M.M.; Project Administration, M.M.; Resources, M.K.-W. and M.M.; Software, M.M.; Supervision, M.M.; Visualization, K.K.-T. and M.M.; Writing—Original Draft, K.K.-T. and M.M.; Writing—Review and Editing, K.K.-T. and M.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the UWM Statutory fundings, No. 61.610.007-110, granted to MM.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Experiments in Olsztyn, Poland (protocol code 90/2019 from 26 November 2019), and was conducted according to Directive 2010/63/EU for animal experiments. This study conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 86-26, revised 2014) and was conducted in compliance with the 3Rs rule and the ARRIVE guidelines.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in this study are included in the article/supplementary materials.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Prohaska, J.R. Copper. In *Present Knowledge in Nutrition*, 10th ed.; Erdman, J.W., Macdonald, I.A., Zeisel, S.H., Eds.; Wiley−Blackwell: Washington, DC, USA, 2012.
2. Collins, J.F. Copper. In *Modern Nutrition in Health and Disease*, 11th ed.; Ross, A.C., Caballero, B., Cousins, R.J., Tucker, K.L., Ziegler, T.R., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, MD, USA, 2014.
3. Fukai, T.; Ushio−Fukai, M.; Kaplan, J.H. Copper transporters and copper chaperones: Roles in cardiovascular physiology and disease. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2018**, *315*, 186–201. [CrossRef]
4. Jomova, K.; Valko, M. Advances in metal−induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* **2011**, *283*, 65–87. [CrossRef] [PubMed]
5. Chowdhury, R.; Ramond, A.; O'Keeffe, L.M.; Shahzad, S.; Kunutsor, S.K.; Muka, T.; Gregson, J.; Willeit, P.; Warnakula, S.; Khan, H.; et al. Environmental toxic metal contaminants and risk of cardiovascular disease: Systematic review and meta−analysis. *BMJ* **2018**, *362*, k3310. [CrossRef]

6. Fry, R.S.; Ashwell, M.S.; Lloyd, K.E.; O'Nan, A.T.; Flowers, W.L.; Stewart, K.R.; Spears, J.W. Amount and source of dietary copper affects small intestine morphology, duodenal lipid peroxidation, hepatic oxidative stress, and mRNA expression of hepatic copper regulatory proteins in weanling pigs. *J. Anim. Sci.* **2012**, *90*, 3112–3119. [CrossRef]
7. Kang, Y.J. Copper and homocysteine in cardiovascular diseases. *Pharmacol. Ther.* **2011**, *129*, 321–331. [CrossRef]
8. Konukoğlu, D.; Serin, O.; Ercan, M.; Turhan, M.S. Plasma homocysteine levels in obese and non−obese subjects with or without hypertension; its relationship with oxidative stress and copper. *Clin. Biochem.* **2003**, *36*, 405–408. [CrossRef]
9. Nunes, K.Z.; Fioresi, M.; Marques, V.B.; Vassallo, D.V. Acute copper overload induces vascular dysfunction in aortic rings due to endothelial oxidative stress and increased nitric oxide production. *J. Toxicol. Environ. Health A* **2018**, *81*, 218–228. [CrossRef]
10. Steven, S.; Frenis, K.; Oelze, M.; Kalinovic, S.; Kuntic, M.; Bayo Jimenez, M.T.; Vujacic−Mirski, K.; Helmstädter, J.; Kröller−Schön, S.; Münzel, T.; et al. Vascular Inflammation and Oxidative Stress: Major Triggers for Cardiovascular Disease. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2019**, *2019*, 7092151. [CrossRef]
11. Guzik, T.J.; Touyz, R.M. Oxidative Stress, Inflammation, and Vascular Aging in Hypertension. *Hypertension* **2017**, *70*, 660–667. [CrossRef]
12. DiSilvestro, R.A.; Joseph, E.L.; Zhang, W.; Raimo, A.E.; Kim, Y.M. A randomized trial of copper supplementation effects on blood copper enzyme activities and parameters related to cardiovascular health. *Metabolism* **2012**, *61*, 1242–1246. [CrossRef]
13. Majewski, M.; Gromadziński, L.; Cholewińska, E.; Ognik, K.; Fotschki, B.; Juśkiewicz, J. The Interaction of Dietary Pectin, Inulin, and Psyllium with Copper Nanoparticle Induced Changes to the Cardiovascular System. *Nutrients* **2023**, *15*, 3557. [CrossRef]
14. Majewski, M.; Ognik, K.; Juśkiewicz, J. Copper nanoparticles modify the blood plasma antioxidant status and modulate the vascular mechanisms with nitric oxide and prostanoids involved in Wistar rats. *Pharmacol. Rep.* **2019**, *71*, 509–516. [CrossRef] [PubMed]
15. Majewski, M.; Ognik, K.; Juśkiewicz, J. The interaction between resveratrol and two forms of copper as carbonate and nanoparticles on antioxidant mechanisms and vascular function in Wistar rats. *Pharmacol. Rep.* **2019**, *71*, 862–869. [CrossRef]
16. National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. 2, Nutrient Requirements of the Laboratory Rat. In *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*, 4th ed.; National Academies Press (US): Washington, DC, USA, 1995. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK231925 (accessed on 14 April 2024).
17. Majewski, M.; Ognik, K.; Juśkiewicz, J. The antioxidant status, lipid profile, and modulation of vascular function by fish oil supplementation in nano-copper and copper carbonate fed Wistar rats. *J. Funct. Foods* **2020**, *64*, 103595. [CrossRef]
18. Majewski, M.; Klett-Mingo, M.; Verdasco-Martín, C.M.; Otero, C.; Ferrer, M. Spirulina extract improves age-induced vascular dysfunction. *Pharm. Biol.* **2022**, *60*, 627–637. [CrossRef]
19. Yan, M.; Liu, D.L.; Chua, Y.L.; Chen, C.; Lim, Y.L. Effects of micromolar concentrations of manganese, copper, and zinc on alpha1−adrenoceptor−mediating contraction in rat aorta. *Biol. Trace Elem. Res.* **2001**, *82*, 159–166. [CrossRef]
20. Wang, Y.C.; Hu, C.W.; Liu, M.Y.; Jiang, H.C.; Huo, R.; Dong, D.L. Copper induces vasorelaxation and antagonizes noradrenaline−induced vasoconstriction in rat mesenteric artery. *Cell Physiol. Biochem.* **2013**, *32*, 1247–1254. [CrossRef]
21. Afrin, F.; Basir, S.F.; Khan, L.A. Copper−promoted hypercontraction of rat aortic rings and its mitigation by natural molecules. 2022; *Preprint*. [CrossRef]
22. Tian, J.; Yan, Z.; Wu, Y.; Zhang, S.L.; Wang, K.; Ma, X.R.; Guo, L.; Wang, J.; Zuo, L.; Liu, J.Y.; et al. Inhibition of iNOS protects endothelial−dependent vasodilation in aged rats. *Acta Pharmacol. Sin.* **2010**, *31*, 1324–1328. [CrossRef]
23. Holowatz, L.A.; Thompson, C.S.; Minson, C.T.; Kenney, W.L. Mechanisms of acetylcholine−mediated vasodilatation in young and aged human skin. *J. Physiol*, 2005; 563, Pt 3, 965–973. [CrossRef]
24. Lamb, D.J.; Tickner, M.L.; Hourani, S.M.; Ferns, G.A. Dietary copper supplements modulate aortic superoxide dismutase, nitric oxide and atherosclerosis. *Int. J. Exp. Pathol.* **2005**, *86*, 247–255. [CrossRef] [PubMed]
25. Chiarugi, A.; Pitari, G.M.; Costa, R.; Ferrante, M.; Villari, L.; Amico−Roxas, M.; Godfraind, T.; Bianchi, A.; Salomone, S. Effect of prolonged incubation with copper on endothelium−dependent relaxation in rat isolated aorta. *Br. J. Pharmacol.* **2002**, *136*, 1185–1193. [CrossRef] [PubMed]
26. Emsley, A.M.; Jeremy, J.Y.; Gomes, G.N.; Angelini, G.D.; Plane, F. Investigation of the inhibitory effects of homocysteine and copper on nitric oxide−mediated relaxation of rat isolated aorta. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *126*, 1034–1040. [CrossRef]
27. Nelson, S.K.; Huang, C.J.; Mathias, M.M.; Allen, K.G. Copper−marginal and copper−deficient diets decrease aortic prostacyclin production and copper−dependent superoxide dismutase activity, and increase aortic lipid peroxidation in rats. *J. Nutr.* **1992**, *122*, 2101–2108. [CrossRef]
28. Majewski, M.; Juśkiewicz, J.; Krajewska−Włodarczyk, M.; Gromadziński, L.; Socha, K.; Cholewińska, E.; Ognik, K. The Role of 20−HETE, COX, Thromboxane Receptors, and Blood Plasma Antioxidant Status in Vascular Relaxation of Copper−Nanoparticle−Fed WKY Rats. *Nutrients* **2021**, *13*, 3793. [CrossRef]
29. Mitchell, J.A.; Kirkby, N.S.; Ahmetaj−Shala, B.; Armstrong, P.C.; Crescente, M.; Ferreira, P.; Lopes Pires, M.E.; Vaja, R.; Warner, T.D. Cyclooxygenases and the cardiovascular system. *Pharmacol. Ther.* **2021**, *217*, 107624. [CrossRef]
30. Schuschke, D.A.; Adeagbo, A.S.; Patibandla, P.K.; Egbuhuzo, U.; Fernandez−Botran, R.; Johnson, W.T. Cyclooxygenase−2 is upregulated in copper−deficient rats. *Inflammation* **2009**, *32*, 333–339. [CrossRef]
31. Nicholls, C.; Li, H.; Liu, J.P. GAPDH: A common enzyme with uncommon functions. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2012**, *39*, 674–679. [CrossRef]

32. Khan, F.; Choong, W.L.; Du, Q.; Jovanovi'c, A. Real−time RT−PCR Ct values for blood GAPDH correlate with measures of vascular endothelial function in humans. *Clin. Transl. Sci.* **2013**, *6*, 481–484. [CrossRef]
33. Young, I.S. Measurement of total antioxidant capacity. *J. Clin. Pathol.* **2001**, *54*, 339. [CrossRef]
34. Bo, S.; Durazzo, M.; Gambino, R.; Berutti, C.; Milanesio, N.; Caropreso, A.; Gentile, L.; Cassader, M.; Cavallo−Perin, P.; Pagano, G. Associations of dietary and serum copper with inflammation, oxidative stress, and metabolic variables in adults. *J. Nutr.* **2008**, *138*, 305–310. [CrossRef]
35. Osredkar, J.; Sustar, N. Copper and zinc, biological role and significance of copper/zinc imbalance. *J. Clinic Toxicol.* **2011**, *S3*, 0495. [CrossRef]
36. McClain, C.J.; McClain, M.; Barve, S.; Boosalis, M.G. Trace metals and the elderly. *Clin. Geriatr. Med.* **2002**, *18*, 801–818. [CrossRef] [PubMed]
37. Agunbiade, J.A.; Babatunde, G.M. Copper and iron supplementation in the tropical environment effects on haematological measurements, organ weights, tissue copper and iron. *Niger. J. Anim. Prod.* **1995**, *22*, 49–55. [CrossRef]
38. Filetti, F.M.; Schereider, I.R.G.; Wiggers, G.A.; Miguel, M.; Vassallo, D.V.; Simões, M.R. Cardiovascular Harmful Effects of Recommended Daily Doses (13 μg/kg/day), Tolerable Upper Intake Doses (0.14 mg/kg/day) and Twice the Tolerable Doses (0.28 mg/kg/day) of Copper. *Cardiovasc. Toxicol.* **2023**, *23*, 218–229. [CrossRef] [PubMed]
39. Banach, W.; Nitschke, K.; Krajewska, N.; Mongiałło, W.; Matuszak, O.; Muszyński, J.; Skrypnik, D. The Association between Excess Body Mass and Disturbances in Somatic Mineral Levels. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7306. [CrossRef]
40. Cunnane, S.C.; McAdoo, K.R.; Prohaska, J.R. Lipid and Fatty Acid Composition of Organs from Copper−Deficient Mice. *J. Nutr.* **1986**, *116*, 1248–1256. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Table S1. The ELISA kits used for the determination of antioxidant status in the presented study.

	Antigen	ELISA kit catalogue number	Manufacturer, country	Assay range (pg/ml)
1.	Rat PTGS1 ELISA Kit	orb566784	Biorbyt, UK	0.156–10 ng/mL Intra–Assay: CV<8% Inter–Assay: CV<10%
2.	Rat PTGS2 ELISA Kit	orb1199748	Biorbyt, UK	78.1–5000 pg/mL Intra–Assay: CV<10% Inter–Assay: CV<12%
3.	Rat HO–1 ELISA Kit	orb567452	Biorbyt, UK	0.156–10 ng/mL Intra–Assay: CV<8% Inter–Assay: CV<10%
4.	Rat NOS3 ELISA Kit	orb566738	Biorbyt, UK	15.625–1000 pg/mL Intra–Assay: CV<8% Inter–Assay: CV<10%
5.	Rat GAPDH ELISA Kit	orb567887	Biorbyt, UK	0.156–11 ng/mL Intra–Assay: CV<8% Inter–Assay: CV<10%
6.	Rat ICAM–1 ELISA Kit	RAB0221–1KT	Sigma–Aldrich, Germany	28.81–7000 pg/mL inter–assay cv: <12% intra–assay cv: <10%

Table S2. Significant differences not detected.

	100% – Group A			200% – Group B					
	n	Mean	"Std. Deviation"	n	Mean	"Std. Deviation"	t test	p value	x–fold (B/A)
Body weight begin (g)	12	492.4	32.84	12	497.6	33.75	Unpaired t test	0.7080	1.0
Body weight final (g)	11	530.3	39.80	12	536.5	34.54	Mann Whitney test	0.7859	1.0
Body weight gain (g)	11	37.16	27.51	12	38.89	42.29	Unpaired t test	0.9093	1.0
Fat (g)	11	92.52	23.31	11	84.19	22.83	Unpaired t test	0.4072	0.9
Fat (%)	11	17.25	3.224	11	15.85	4.231	Unpaired t test	0.3929	0.9
Lean (g)	11	323.1	16.21	11	329.5	25.44	Unpaired t test	0.4946	1.0
Lean (%)	11	61.06	2.273	11	61.96	3.158	Unpaired t test	0.4490	1.0
F/L ratio	11	0.285	0.063	11	0.258	0.076	Mann Whitney test	0.6063	0.9
Heart (g)	11	1.110	0.074	12	1.140	0.120	Unpaired t test	0.4810	1.0
Liver small + large part(g)	11	22.92	3.302	12	22.94	2.995	Unpaired t test	0.9886	1.0
Spleen (g)	11	0.882	0.183	12	0.900	0.209	Mann Whitney test	0.9879	1.0
Kidney (g)	11	2.476	0.262	12	2.576	0.531	Mann Whitney test	0.9279	1.0
Brain (g)	11	2.028	0.086	12	2.042	0.090	Unpaired t test	0.7151	1.0
Fe (mg/L)	10	2.317	0.449	11	2.349	0.391	Unpaired t test	0.8643	1.0
Se (ug/L)	10	361.2	42.17	11	362.2	66.01	Unpaired t test	0.9689	1.0
Cu/Se (ratio)	10	2.813	0.5421	12	3.702	1.620	Mann Whitney test	0.1335	1.3
Se/Zn (ratio)	10	0.377	0.048	11	0.356	0.067	Unpaired t test	0.4348	0.9
Zn (μg/g of liver tissue)	9	23.14	1.151	10	24.30	1.328	Unpaired t test	0.0589	1.1
Fe (μg/g of liver tissue)	9	107.1	13.71	10	114.3	25.01	Unpaired t test	0.4581	1.1
Se (μg/g of liver tissue)	9	0.7519	0.064	10	0.7694	0.082	Unpaired t test	0.6132	1.0
HO–1 (ng/mL)	10	1.606	0.539	11	1.979	0.962	Mann Whitney test	0.3867	1.2
NOS3 (pg/mL)	10	92.18	20.85	12	86.32	27.67	Unpaired t test	0.5749	0.9
iCAM (pg/mL)	10	70.99	16.80	10	97.60	23.50	Unpaired t test	0.9638	1.4

n varies: rat died and/or a simple lab mistake occurred

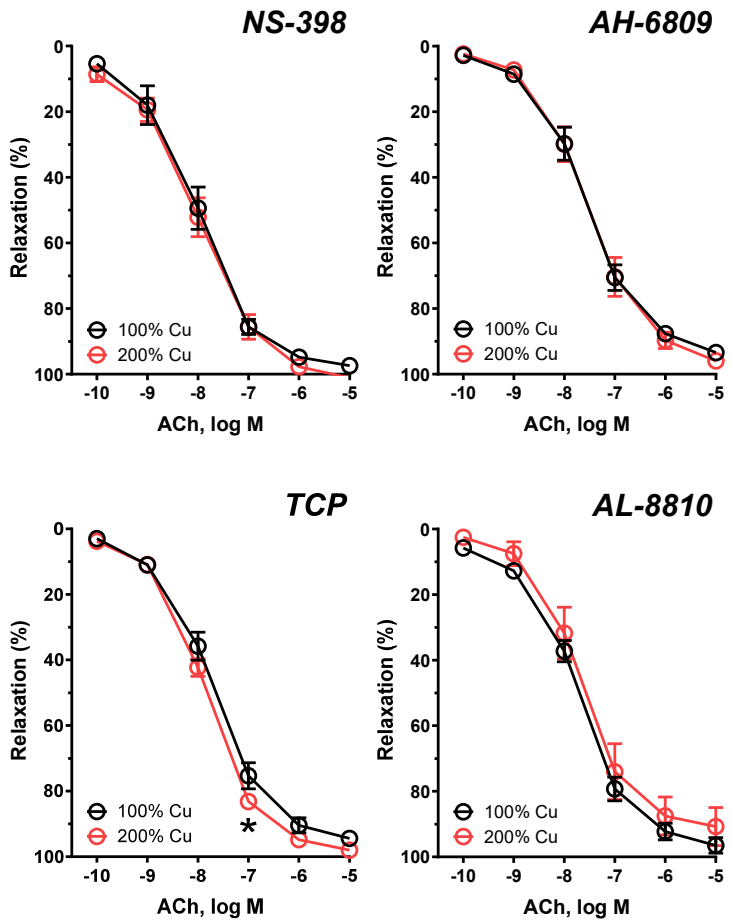


Figure S1. The cumulative concentration–response curves to acetylcholine (ACh, 0.1 nM–10 μM) in the isolated thoracic arteries dissected from rats fed with experimental diets. Aortic rings were incubated with NS–398, AH–6809, TCP and AL–8810. Values are means ± SEM, n = 12, * vs. control diet (100% copper), $p \leq 0.05$ (two–way ANOVA with Šídák's multiple comparisons test).

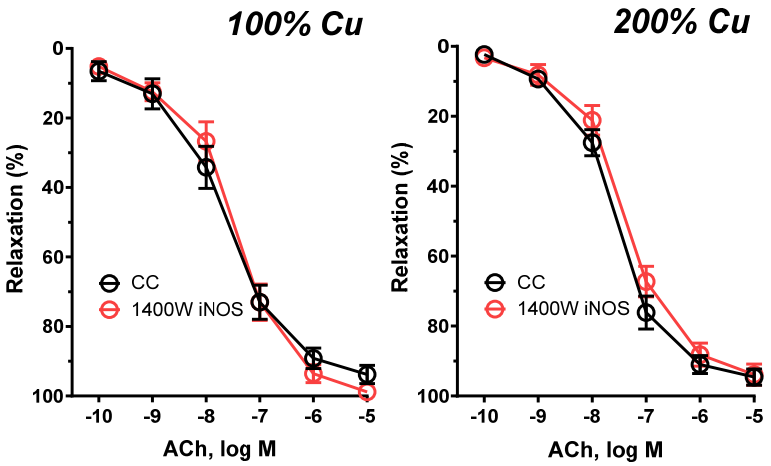


Figure S2. The cumulative concentration–response curves to acetylcholine (ACh, 0.1 nM–10 μM) in the isolated thoracic arteries dissected from rats fed with experimental diets. Aortic rings were incubated with 1400W. Values are means ± SEM, n = 12 (n varies), * vs. control conditions, $p \leq 0.05$ (two–way ANOVA with Šídák's multiple comparisons test).

nutrients

MDPI

Article

Prolonged Copper Supplementation Modified Minerals in the Kidney, Liver and Blood, and Potentiated Oxidative Stress and Vasodilation of Isolated Aortic Rings in Young Wistar Rats

Klaudia Kitala-Tańska [1], Anetta Hanć [2], Jerzy Juśkiewicz [3] and Michał Majewski [1,*]

[1] Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 10-082 Olsztyn, Poland; klaudia.kitala@wp.pl
[2] Department of Trace Analysis, Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, 61-614 Poznań, Poland; anetta.hanc@amu.edu.pl
[3] Division of Food Science, Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, 10-748 Olsztyn, Poland; j.juskiewicz@pan.olsztyn.pl
* Correspondence: michal.majewski@uwm.edu.pl; Tel.: +48-668-342-965

Abstract: Background: Previous studies have highlighted that copper supplementation at 200% of the recommended daily dietary allowance modified vascular contraction and relaxation through increased reactive oxygen species (ROS) and prostaglandin formation, which modified the antioxidant status of middle-aged Wistar rats. Methods: In this study, young (1 month old) male Wistar rats (n/group = 10) received a diet supplemented with 6.45 mg copper/kg (100% of daily recommendation—Group A) for 8 weeks. The experimental group received 12.9 mg copper/kg of diet (200% of the daily recommendation—Group B). Results: Experimental supplementation with 200% copper modified the copper concentration in the blood (1.21-fold, p = 0.04), liver (1.15-fold, p = 0.032), and kidneys (1.23-fold, p = 0.045), potentiated the ROS formation in the aortic rings, and enhanced the sensitivity of the aortic rings to the vasodilator acetylcholine. We observed an increased participation of nitric oxide (NO) derived from inducible NO synthase (iNOS) in vascular contraction and a decreased net effect of vasodilator prostanoids derived from cyclooxygenase-2 in vascular relaxation. In rat kidneys, the concentrations of potassium (1.08-fold, p = 0.001) and iron (1.13-fold, p = 0.046) were higher, while, calcium (0.88-fold, p = 0.001) and chromium (0.77-fold, p = 0.005) concentrations were lower. In the rat liver, magnesium (1.06-fold, p = 0.012) was higher. No differences were observed in the concentrations of sodium, zinc, manganese, selenium, cobalt, molybdenum, and vanadium. The antioxidant activity of water- and lipid-soluble compounds; total antioxidant status in the blood; and superoxide dismutase, catalase, and malondialdehyde levels in the heart did not change. Conclusions: In young rats, prolonged supplementation with 200% copper had a lesser effect than anticipated on oxidative stress and vascular reactivity. Detailed data on the status of trace elements and their interactions in patients of different age groups are strongly required for effective nutritional and therapeutic intervention.

Keywords: 1400 W; aortic rings; copper; COX; iNOS; NS-398; SC-560; trace elements; vascular studies

check for updates

Citation: Kitala-Tańska, K.; Hanć, A.; Juśkiewicz, J.; Majewski, M. Prolonged Copper Supplementation Modified Minerals in the Kidney, Liver and Blood, and Potentiated Oxidative Stress and Vasodilation of Isolated Aortic Rings in Young Wistar Rats. *Nutrients* **2024**, *16*, 3230. https://doi.org/10.3390/nu16193230

Academic Editor: Valerie Tikhonoff

Received: 7 August 2024
Revised: 13 September 2024
Accepted: 22 September 2024
Published: 24 September 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Understanding the impact of copper supplementation in different age groups and the impact of aging on copper pharmacokinetics remains a topic of ongoing research due to inaccurate findings from previous studies.

Copper is a vital dietary element for mammals, and therefore, insufficient or excessive consumption of this trace element can have negative effects on well-being. With a high copper intake, the body's ability to absorb copper decreases, while the elimination of copper increases. In contrast, when copper intake is low, the body reduces the excretion of copper through the bile and retains more copper [1]. Furthermore, considering the natural

tendency of copper to enhance the generation of detrimental oxygen free radicals, excessive amounts of copper have the potential to cause tissue damage and subsequent pathological consequences [2]. The inequitable production and elimination of reactive oxygen species (ROS) may result in the buildup of intermediate ROS products, which are considered harmful and have the potential to trigger oxidative stress [3]. Copper also has crucial functions in a multitude of physiological processes. These processes include respiration, removal of harmful free radicals, regulation of iron and oxygen metabolism, formation of connective tissues, maturation of the extracellular matrix, production of energy, synthesis of neuropeptides, and facilitation of neuroendocrine signaling [4]. The potential for oxidation exhibited by copper may contribute to its toxicity in instances of excessive ingestion. At elevated concentrations, copper has been observed to induce oxidative harm to biological systems through the peroxidation of lipids and other macromolecules [5].

Changes in copper pharmacokinetics may occur with aging. Available data point to no variations in copper absorption across different age groups; however, it was observed that serum copper levels were notably elevated in elderly men [6]. In addition, age had a significant impact on the measurement of ceruloplasmin [7].

Our aim was to analyze the impact of prolonged copper supplementation with 200% of the recommended daily dietary allowance on mineral concentration, oxidative stress, and cardiovascular function in young rats.

2. Materials and Methods

2.1. Substances

The following chemicals were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA), acetylcholine chloride, noradrenaline hydrochloride, selective inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitor (1400 W), selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor (NS-398), and selective COX-1 inhibitor (SC-560). NS-398 and SC-560 were dissolved in DMSO, and 1400 W was dissolved in methanol. Noradrenaline was dissolved in a solution of NaCl and ascorbic acid at concentrations of 0.9% and 0.01% *w*/*v*, respectively. The concentration of the solvent was less than 0.01% (*v*/*v*). The solutions were stored at −20 °C. On the day of the experiment, the solutions were diluted in Krebs-Henseleit solution (KHs in mM: NaCl—115; $CaCl_2$—2.5; KCl—4.6; KH_2PO_4—1.2; $MgSO_4$—1.2; $NaHCO_3$—25; glucose—11.1) [8].

2.2. Animals and Diet

A group of 20 male Wistar Han rats, aged 4 weeks, were provided with a standard rat diet (Diet A) that included 6.45 mg/kg copper, as per the guidelines outlined in references [8,9]. For an additional duration of 8 weeks, the rats in Group B (*n*/group = 10) were fed a diet containing 12.9 mg Cu/kg (200% of the recommended daily dietary quantity of copper), while those in Group A were fed a standard rat diet (Diet A). A copper carbonate sample, which had a purity of at least 99%, was acquired from Poch (Gliwice, Poland). The rats were housed in accordance with a previously described housing method [8]. Unrestricted access to food and tap water (a copper concentration of 0.35 mg/L) was provided. Blood samples were obtained from the caudal vena cava of anesthetized animals. Anesthesia was administered through intraperitoneal injections of ketamine and xylazine at dosages of 100 mg/kg and 10 mg/kg of body weight, respectively.

2.3. Body Weight and Body Composition

A Bruker Minispec LF (Ettlingen, Germany) was used to accurately measure fat, fluid, and lean tissues in rats using time domain−nuclear magnetic resonance (TD-NMR) [10].

2.4. Vascular Reactivity Studies

As previously described, the aortic rings were incubated in 5 mL chambers (Graz, Barcelona, Spain) under a preload tension of 1 g (FT20, TAM-A, Hugo Sachs Elektronik, March, Germany) [11]. The functional integrity of the aortic rings was assessed using high concentrations of the vasoconstrictor KCl (75 mM) and the vasodilator acetylcholine

(10 μM). In addition, the aortic rings were subjected to a 30 min preincubation with various substances, including a selective COX-1 inhibitor (SC-560, 10 μM), a selective COX-2 inhibitor (NS-398, 10 μM), and an iNOS inhibitor (1400 W, 1 μM). The vasodilatory response was analyzed by adding cumulative concentrations (CCs) of acetylcholine (ranging from 0.1 nM to 10 μM) to the incubation chambers [8]. The response to noradrenaline (0.1 μM) was also studied.

2.5. The Langendorff Heart Studies

The isolated heart studies were conducted using the Langendorff system equipped with ISOHEART software 73-0161 (Hugo Sachs Elektronik, March, Germany), following the methodology outlined in a previous study [8]. Balloon inflation was implemented to establish a diastolic pressure of 8–10 mmHg. The measurements included the heart rate, mean arterial pressure, diastolic pressure, and systolic pressure.

2.6. Analysis of Minerals in Rat Liver and Kidneys

2.6.1. Sample Preparation

Each analyzed liver and kidney sample was cut into small pieces using a ceramic knife and mixed to homogenize the sample. Three independent samples were prepared for each organ (n = 3). Approximately 0.2 g of the wet samples (kidney ~32% and liver ~40% water), 3 mL of 65% nitric acid, and 0.5 mL of 30% hydrogen peroxide were used for digestion. The digestion proceeded in two steps: permineralization for 3 h and mineralization in a closed system. The samples were mineralized using a microwave mineralizer (EthoS One, Milestone, Sorisole, Italy). The heating program during mineralization in the closed system was as follows: 20 min ramp time to 220 °C, 30 min at 220 °C, and 20 min of cooling. The power of the entire process was 1500 W. The digested samples were diluted with distilled water (Direct-Q-3 UV, Merck, Darmstadt, Germany) to a volume of 50 mL. The certified reference material ERM, BB184 Bovine Muscle (IRMM, Geel, Belgium), was used to evaluate the accuracy of the measurements and was prepared in the same way as the analyzed samples.

2.6.2. Elements Measurements

Inductively coupled plasma–mass spectrometry (ICP-MS 7100x Agilent, Santa Clara, CA, USA) was used for analysis. The instrumental parameters were automatically optimized using Tuning Solution (Agilent). For the reduction of interferences, helium mode was used. The interferences were reduced by using helium mode and an internal standard solution containing 10 μg/L Rh and Tb. Calibration solutions were prepared by the appropriate dilution of a 10 mg/L multielement standard solution (ICP Standard, Perkin Elmer, Darmstadt, Germany). Calibration curves were constructed in the range of 0.01–100 μg/L. High purity argon (99.999%) was used as the nebulizer, auxiliary, and plasma gas for the ICP-MS (Messer, Chorzów, Poland).

2.6.3. Quality Assessment

The validity of the analytical method was assessed by analyzing the certified reference material ERM BB184 Bovine Muscle (IRMM, Geel, Belgium). Validation parameters, such as linearity, precision, limit of detection (LOD), and trueness were evaluated. The linearity of the calibration curves, calculated as the correlation coefficient R, was greater than 0.9996 for all the analytes. The LOD was defined as 3.3 s/b, where s is the standard deviation corresponding to 10 blank injections and b is the slope of the calibration graph. The LODs were as follows: 0.008 μg/g for Cu, 0.012 μg/g for Zn, 0.075 μg/g for Se and 0.214 μg/g for Fe. The precision values were calculated as the coefficient of variation (CV) (%) and ranged from 1.2% to 3.4% for all the elements. Trueness was evaluated by applying the certified reference material and was expressed as recovery values (%) ranging from 95% to 103%.

2.7. Analysis of Minerals in Rat Blood

The concentration of elements in rat serum was determined by Atomic Absorption Spectroscopy, as previously described [9].

2.8. Oxidative Stress and Antioxidant Parameters

The blood serum total antioxidant status (TAS) was measured using a Randox kit through a spectrophotometric method. The antioxidant capacity of water (ACW) and lipid (ACL) soluble compounds was determined using the photo-chemiluminescence method, which detects generated free radicals that are removed with the use of the antioxidants ascorbic acid and Trolox. Malondialdehyde (MDA) was quantified with a fluorometric assay kit (ab118970), according to the manufacturer's instructions; catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities were measured using diagnostic kits from Oxis International, Inc. (Portland, OR, USA) and Ransel and Ransod colorimetric diagnostic kits from Randox (Warsaw, Poland) [8].

Blood serum was analyzed using commercial ELISA kits to determine the levels of COX-1, COX-2, heme oxygenase-1 (HO-1), endothelial nitric oxide synthase 3 (NOS3), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), see Table S1 [8]. A Thermo Scientific microplate reader (Varioskan LUX, Bremen, Germany) was used to measure the absorbance of the ELISA test plate at a wavelength of κ = 450 nm.

The levels of nitric oxide (NO), superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$), and hydrogen peroxide (H_2O_2) in situ were assessed using diaminofluorescein (DAF), dihydroethidium (DHE), and 2′,7′-dichlorofluorescein diacetate (DCF), following the methodology described in a previous study [9]. The cells were incubated with the nuclear dye 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 10 μg/mL) in the following combinations: DAF + DAPI, DHE + DAPI, and DCF + DAPI. The incubation was carried out for 30 min in an oven at 37 °C. Fluorescence images were acquired using a Leica (TCS ST2DM IRE2) laser scanning confocal microscope at wavelengths of 568 nm and 410–475 nm for the DAPI dye.

2.9. Data Analysis and Statistics

Vascular contraction in response to noradrenaline (0.1 μM) was quantified in milligrams of tension, while vascular relaxation in response to acetylcholine was measured as a percentage of the contractile response to noradrenaline. A log agonist vs. response (nonlinear regression model) was employed to analyze the cumulative concentration–response curves (CCRCs). Comparisons between groups were conducted using either a parametric test (*t*-test) or a nonparametric test (Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis test), with a sample size of n = 10 rats/group. The CCRCs were subjected to analysis via two-way ANOVA with Šídák's multiple comparisons test. The results are presented as the means ± SEMs (for CCRCs) or means ± SDs. The significance level was set at * $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Rat Characteristics

The control group (Group A) received 100% copper (6.45 mg copper/kg of diet) and was compared to the experimental group (Group B), which received 200% copper (12.9 mg copper/kg of diet).

The amount of daily food consumed did not differ between the groups. Body weight gain was not affected. The weights of the internal organs (the heart, liver, kidneys, spleen, and brain) did not change. Body fat and lean body parts were not modified.

3.2. Minerals

3.2.1. Serum

The copper concentration was higher in the rat blood serum (mg/L): 1.01 ± 0.31 vs. 1.22 ± 0.24 (1.21-fold, $p = 0.04$). The calculated copper-to-zinc ratio was also higher 1.02 ± 0.23 vs. 1.42 ± 0.356 (1.39-fold, $p = 0.04$).

No significant differences were observed in the zinc and selenium concentrations between the studied groups (Table S2).

3.2.2. Liver

The concentrations of copper (1.15-fold, $p = 0.032$) and magnesium (1.06-fold, $p = 0.012$) were higher in the study group. The calculated copper-to-zinc ratios were also higher (1.09-fold, $p = 0.014$); see Table S2.

No significant differences were observed in potassium, iron, calcium, chromium, sodium, zinc, manganese, selenium, cobalt, molybdenum, and vanadium concentrations between the studied groups, see Table S2.

3.2.3. Kidney

The concentrations of copper (1.23-fold, $p = 0.045$), iron (1.13-fold, $p = 0.046$), and potassium (1.08-fold, $p = 0.001$) were higher in the study group. The calculated copper-to-zinc ratio was also higher (1.16-fold, $p = 0.05$), while the concentrations of calcium (0.88-fold, $p = 0.001$) and chromium (0.77-fold, $p = 0.005$) were lower.

No significant difference exists in magnesium, sodium, zinc, manganese, selenium, cobalt, molybdenum, and vanadium concentrations between the studied groups, see Table S2.

3.3. Oxidative Stress and Antioxidant Parameters

The amounts of NO, $O_2^{\bullet -}$, and H_2O_2 were higher in the rat aortic rings. NO: 4265 ± 874 vs. 6342 ± 987 (1.49-fold, $p = 0.04$); $O_2^{\bullet -}$: 3254 ± 253 vs. 5324 ± 1034 (1.64-fold, $p = 0.023$); and H_2O_2: 5765 ± 753 vs. 7789 ± 1075 (1.35-fold, $p = 0.015$).

No significant differences were observed in the ELISA results for COX-1, COX-2, GAPDH, ICAM-1, HO-1, and eNOS in the rat serum between the studied groups (Table S2).

No significant differences were observed in TAS, ACW, ACL, MDA, SOD, and CAT levels between the studied groups in the rat serum or heart (Table S2).

3.4. The Isolated Perfused Heart

No significant differences were observed in the cardiac contractile strength and heart rate between the studied groups.

3.5. Vascular Contraction

We observed no significant difference in the NA-induced contraction between the studied groups under the control conditions (CC, Figure 1a) or when the aortic rings were preincubated with either selective COX-1 inhibitor (Figure 1c) or COX-1 plus COX-2 inhibitors simultaneously (Figure 1d). A selective COX-2 inhibitor (NS-398) decreased vascular contraction in both groups (Figure 2a,b), and a similar effect was observed when COX-1 and COX-2 were blocked simultaneously (Figure 2a,b).

Preincubation with the selective iNOS inhibitor potentiated vasoconstriction compared to that in the control group (Figure 1b). The effect of the selective iNOS inhibitor was also significantly greater in experimental group B, but not in control group A (Figure 2a,b).

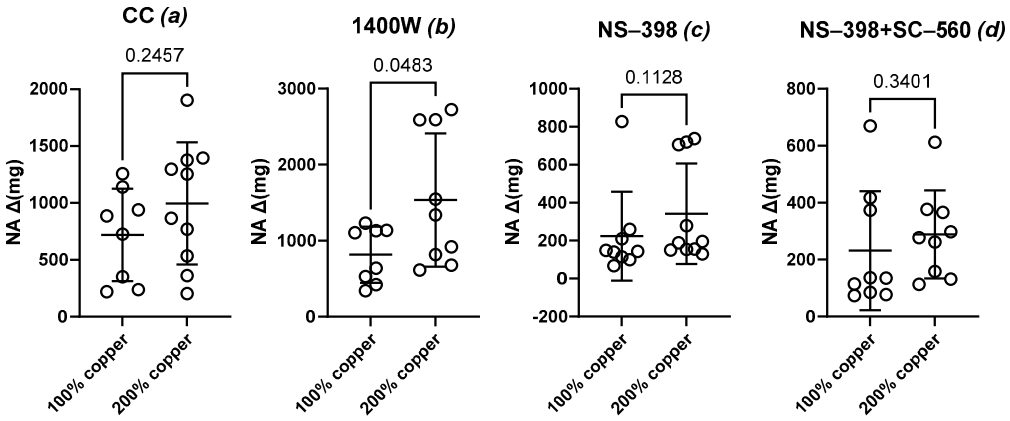


Figure 1. Vasoconstriction in response to noradrenaline (NA) either under the control conditions (**a**) or when subjected to preincubation with the inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitor (1400 W) (**b**), the selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor (NS-398) (**c**), and the sum of selective COX-2 and selective COX-1 (SC-560) inhibitors (**d**); *t*-test with $p \leq 0.05$. Preincubation with the selective iNOS inhibitor modified vasoconstriction.

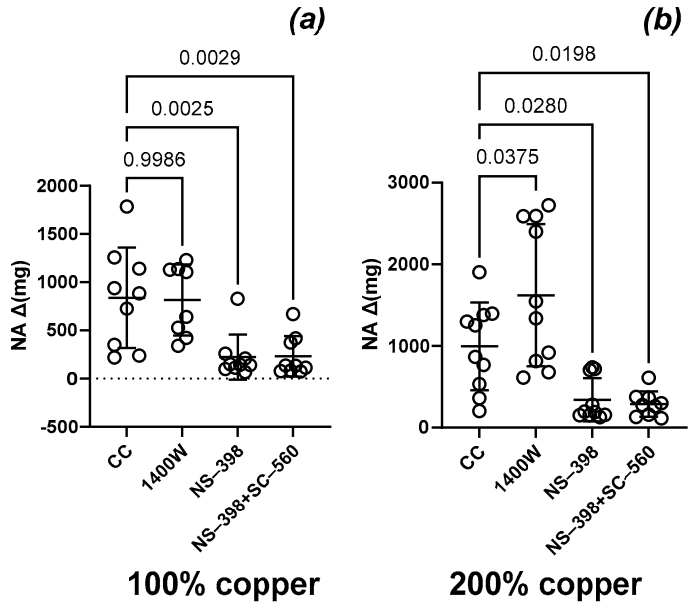


Figure 2. Vasoconstriction in response to noradrenaline (NA) in the control group with 100% copper (**a**) and the experimental group with 200% copper (**b**). Aortic rings were preincubated with the inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitor (1400 W), the selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor (NS-398), and the sum of selective COX-2 and selective COX-1 (SC-560) inhibitors. Two-way ANOVA with $p \leq 0.05$. Preincubation with the selective iNOS inhibitor modified vasoconstriction.

3.6. Vascular Relaxation

Supplementation with 200% copper potentiated the sensitivity to ACh compared to 100% copper (the control group), as shown in Figure 3 and Table 1. Preincubation with a selective COX-1 inhibitor (Figure 4a,b) and COX inhibition (COX-1 + COX-2 inhibitors, Figure 4c,d) attenuated the vasodilator response to acetylcholine. This effect was not observed with the iNOS inhibitor (Figure 4e,f).

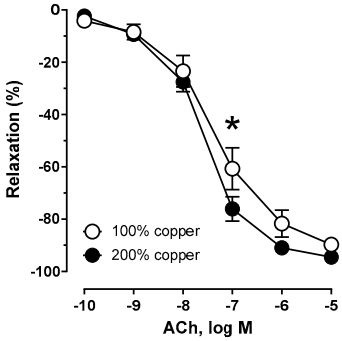


Figure 3. Vasodilator response to acetylcholine (ACh) of the isolated aortic rigs from copper-supplemented rats. Two-way ANOVA with * $p \leq 0.05$. Supplementation with 200% copper potentiated the sensitivity to ACh.

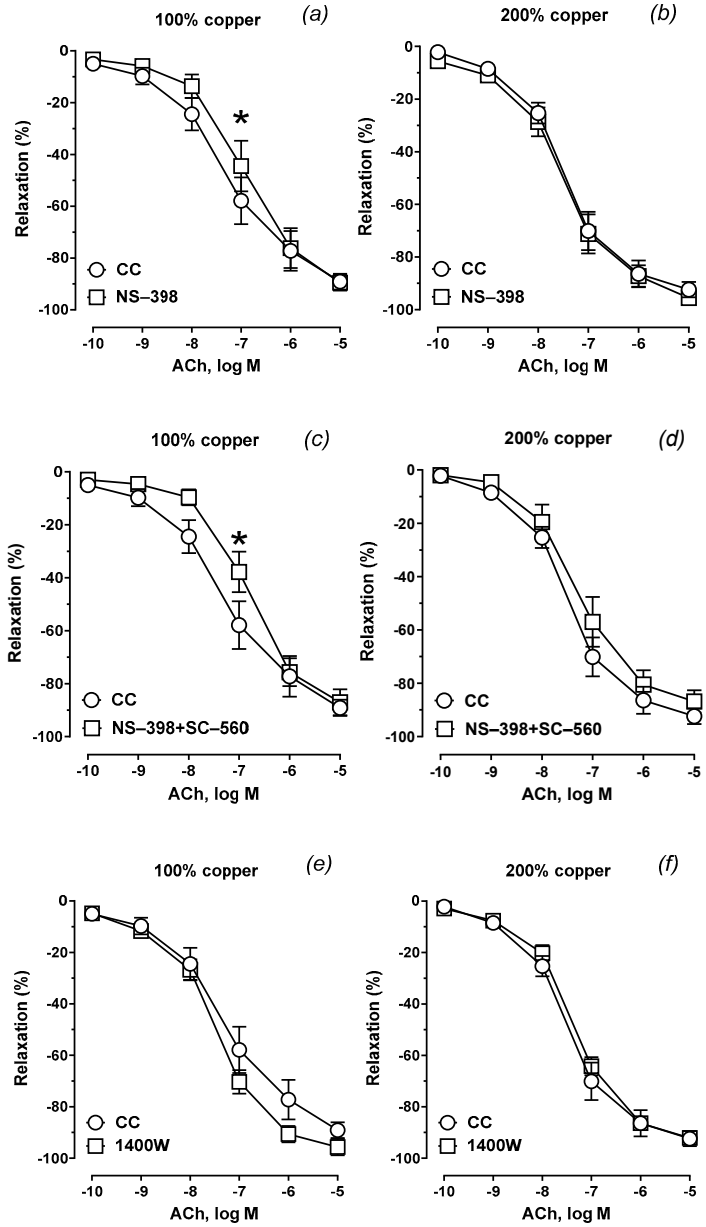


Figure 4. Vasodilator response to acetylcholine (ACh) of the isolated aortic rigs from copper-supplemented rats. Aortic rings were preincubated with the selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor (NS-398) (**a**,**b**), selective COX-1 (SC-560) and COX-2 inhibitors (**c**,**d**), and inducible nitric oxide

synthase (iNOS) inhibitor (1400 W) (**e**,**f**). Two-way ANOVA with * $p \leq 0.05$. Preincubation with a selective COX-1 inhibitor and a COX inhibitor, but not with an iNOS inhibitor, attenuated the vasodilator response to acetylcholine.

Table 1. The influence of COX and iNOS inhibition on the acetylcholine-induced vasodilation of isolated aortic rings from copper-supplemented young Wistar rats.

Group Copper Content		Control Conditions (CC) *			NS-398 **			NS-398 + SC-560 ***			1400 W ****		
		AUC	Emax (%)	pEC_{50}	AUC	Emax (%)	pEC_{50}	AUC	Emax (%)	pEC_{50}	AUC	Emax (%)	pEC_{50}
Group A 100% Cu	Mean	221.2	87.43	7.346	186.6 *	87.84	6.948	172.8 *	87.47	6.830	249.7	94.69	7.436
	SEM	22.26	3.695	0.131	23.76	4.658	0.139	18.36	3.883	0.112	16.09	2.391	0.082
Group B 200% Cu	Mean	252.4	94.31	7.576	248.7	92.71	7.498	206.1	85.60	7.306	226.0	91.35	7.346
	SEM	14.64	2.045	0.070	22.47	3.170	0.113	26.19	4.122	0.141	13.68	1.969	0.065
p		0.035	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Values are based on the concentration-response curves. Data are expressed as means ± SEM, $n = 8$, * $p \leq 0.05$ compared with the control conditions as determined by two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. ** selective COX-2 inhibition with NS-398, 10 μM, *** selective COX-1 (SC-560, 10 μM) and COX-2 inhibition (NS-398, 10 μM), **** iNOS inhibition with 1400 W, 1 μM. Abbreviations: AUC—area under the curve; CC—control conditions; COX—cyclooxygenase; Cu—copper; iNOS—inducible nitric oxide synthase; ns—not significant.

4. Discussion

Significant changes were observed in mineral concentrations in the kidney, liver, and blood; vascular reactivity; and oxidative stress markers. The results are summarized in the diagram (Figure 5).

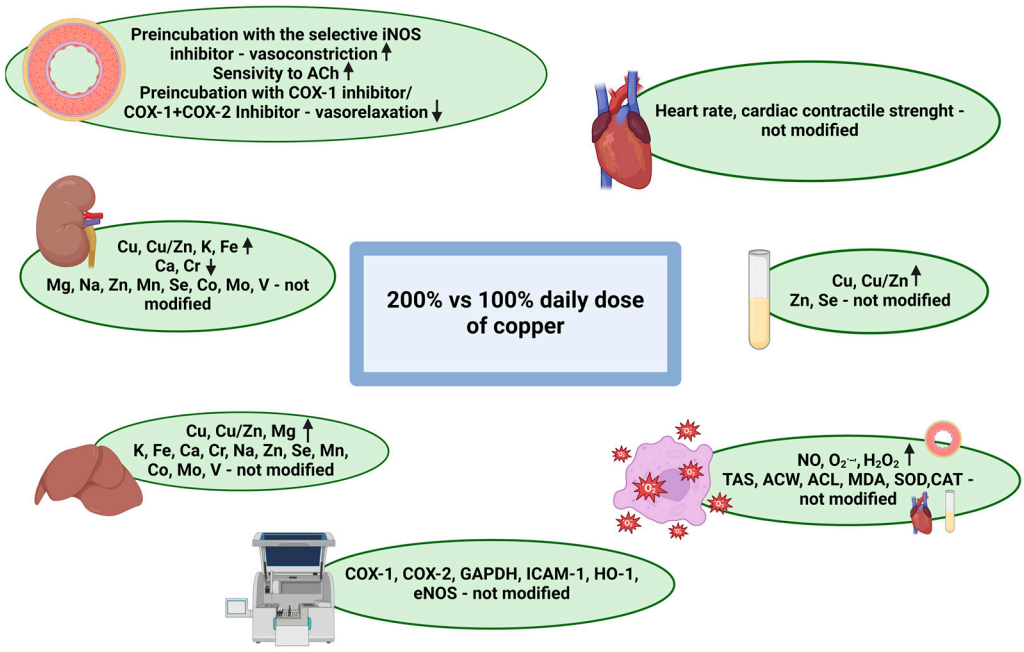


Figure 5. Summary of the results. Created in BioRender. Kitala-Tańska, K. (2024) www.BioRender.com/w45p634 [12].

Copper exerts a regulatory influence on the activity of nitric oxide synthase (NOS) and guanylyl cyclase (GC) in vascular structures [13]. The modified process of synthesizing and releasing vasoactive factors can potentially play a role in the impairment of blood vessel function, ultimately resulting in the emergence of cardiovascular disorders (CVDs), such as atherosclerosis, hypertension, and ischemia. To effectively develop prevention and

treatment strategies, it is imperative to comprehend the mechanisms by which elevated serum copper levels impact the risk of atherosclerotic CVD. There are several ways in which high serum levels of copper can potentially increase the risk of atherosclerotic CVD. One possible mechanism is through the oxidative modification of low-density lipoprotein cholesterol and the formation of free radicals, which can contribute to the development of atherosclerosis [14]. Another pathway involves inflammation, as copper is closely associated with ceruloplasmin, an acute-phase reactant [14]. Copper overload-induced T cell apoptosis and proliferation defects [15]. Additionally, copper has been linked to insulin resistance and the pathogenesis of diabetes, which are major risk factors for coronary heart disease (CHD) [16]. Finally, high levels of copper can lead to luminal narrowing of the arteries as it promotes the expansion of the arterial neointima, which is primarily composed of copper-containing extracellular matrix molecules [17]. High levels of copper can lead to the aging of endothelial cells and the release of a senescence-associated secretory phenotype. It can also impair the function of various blood vessels, including the production of NO, cellular movement and growth, and ability to withstand toxins within cells [18].

We have shown that the vasoconstrictor response to noradrenaline was similar across the two studied groups and that neither selective COX-2 inhibition nor COX inhibition (simultaneous COX-1 and COX-2 inhibition) modified the contractile response. In contrast to our research (with 1.2 mg of copper/L of rat serum detected), other in vitro studies demonstrated that copper concentrations of 10 and 16 μM (0.635 and 1.016 mg/L, respectively) exhibited a dose-dependent inhibitory effect on phenylephrine-induced contractions in isolated rings of the rat thoracic aorta [19]. A subsequent in vitro study demonstrated that copper pretreatment blocked vasoconstriction induced by noradrenaline, both dependently and independently of the bioavailability of NO. This suggests that the effect of copper pretreatment is attributed to a mechanism other than NO [13]. Earlier studies discovered that increased copper intake in middle-aged rats led to reduced vasoconstriction when exposed to noradrenaline. Additionally, preincubation with a prostaglandin F2α analog (which is a selective FP receptor antagonist) rendered the vasoconstrictor response insignificant across groups, suggesting that FP receptors are involved in reduced contraction in copper-supplemented middle-aged rats [9]. In the presented study, this was not the case, and surprisingly, a selective iNOS inhibitor potentiated vascular contraction in response to noradrenaline, indicating that increased production of NO derived from iNOS constitutes a compensatory mechanism in copper-supplemented rats. Furthermore, Cuzzocrea et al. confirmed the presence of a complex relationship between copper homeostasis and NO metabolism. Similar to NO, copper can also have either beneficial or toxic effects. This is dependent on the specific site and modality of action, such as the isoform involved, enzyme activity, or expression [20].

The vasodilatory response to acetylcholine tended to potentiate in the experimental group. It is worth mentioning that the increase in vasodilation in middle-aged rats was previously observed [9]. Both selective COX-2 inhibition and nonselective COX inhibition (simultaneous COX-1 and COX-2 inhibition) attenuated the vasodilator net effect of prostanoids on acetylcholine-induced vascular relaxation, indicating the decreased participation of vasodilator prostanoids derived from COX-2 in vascular tone regulation. To some extent, this finding adds to the abovementioned results, which indicate a reduced share of some substances with a vasodilatory effect, which may be compensated by an increase in the production of NO from iNOS. These substances are vasodilators derived from COX-2. Surprisingly, iNOS did not modify vascular relaxation as it did in the contractile response to noradrenaline, indicating that the primary molecules responsible for vasodilation are prostanoids and not NO from iNOS.

Our research has shown that higher dietary copper intake (200%) did not have any impact on the levels of COX−1, COX−2, GAPDH, iCAM−1, HO−1, or eNOS in the blood serum of rats. COX-2 is widely recognized as the primary regulator of endothelial prostacyclin synthesis, which helps maintain the balance of thromboxane synthesis mediated by COX-1 in platelets. Therefore, specific inhibition of COX-2 is believed to lead to vasocon-

striction and platelet aggregation, subsequently increasing the occurrence of cardiovascular events [21]. It has been widely observed that GAPDH is not just an average glycolytic enzyme. In fact, there is a growing body of evidence indicating that GAPDH has multiple functions. Its role as a mediator of cell death has also been emphasized. Over the past few years, numerous studies have indicated that a group of GAPDH molecules move to the nucleus in response to various stressors, many of which are linked to oxidative stress [22]. Unlike young rats, previous research on middle-aged rats showed that levels of COX-1, COX-2, and GAPDH were lower in the blood serum when the amount of dietary copper was doubled (200%) [9]. In our study, there was no change in TAS, which may be related to the lack of modification of iCAM1 concentration in the serum. ICAM-1 binds to lymphocyte function-associated antigen-1, an 82-integrin found on all leukocytes. Nonhematopoietic cells like fibroblasts, vascular ECs, and epithelial cells express ICAM-1 at low levels. Cytokines and endotoxins strongly upregulate ICAM-1 [23]. Endothelial dysfunction is characterized by increased expression of cellular adhesion molecules such as ICAM-1 and VCAM-1. These changes in the functional endothelium have been observed to be linked to barrier function, resulting in the movement of white blood cells and an increase in the contraction of blood vessels due to a decrease in the processing of substances that dilate blood vessels, like nitric oxide [24]. Various molecules within the ROS family play a role in regulating cellular functions, such as cell growth and intercellular adhesion molecules [24].

HO-1 is responsible for the oxidative breakdown of heme into biliverdin, carbon monoxide, and iron. Furthermore, the removal of toxic heme is just one of the many functions of HO-1, and its products have recently been acknowledged for their significant roles in various organs [25]. In our study, no change in HO-1 concentration in serum was observed, despite a significant change in copper concentration. Studies conducted on transgenic HO-1 mice and individuals with HO-1 deficiency have revealed the significant impact of HO-1 activity on a wide range of anatomical and functional processes. One of the key consequences of HO-1 deficiency is the damage to the vascular endothelium, which can result in the development of cardiovascular diseases [25]. In the livers of copper-deficient rats, there was an observed increase in HO-1 activity. Although the cause of the increase in HO-1 activity remains unclear, it is possible that alterations in iron and selenium metabolism during copper deficiency may play a role. Moreover, in copper-deficient rats, a decrease in the activity of copper-dependent antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD)-1 and ceruloplasmin, leads to an increase in oxidative stress. This increase in oxidative stress may play a role in the activation of HO-1, an important enzyme in copper deficiency [26]. It is worth mentioning that HO-1 was the only enzyme mentioned above, which was higher in zinc-supplemented middle-aged rats [27]. In the same study, copper was lower, opposite to selenium and TAS, which were higher.

Reactive oxygen species (ROS) play a crucial role as reactive intermediates of molecular oxygen and serve as vital secondary messengers in cells. However, an imbalance between the production of ROS and the body's antioxidant defense systems can lead to endothelial dysfunction. This dysfunction is a major contributor to vascular damage in metabolic and atherosclerotic diseases [28]. There are multiple biomarkers and methods of measurement available to assess antioxidant status. Recent studies have utilized the TAS, ACW, and ACL [8,29], and we also used this method. In a previous study, it was discovered that TAS was higher in middle-aged rats [9]. However, in the present study, neither TAS nor ACW, ACL in the blood, nor MDA, SOD, and CAT levels in the arteries and heart of the rats were altered. Surprisingly, the levels of NO, $O_2^{\bullet -}$ and H_2O_2 were higher in the aortic rings. The existing scientific literature has not adequately explained the relationship between excess dietary copper and oxidative stress due to only a few studies have been conducted on this subject. Li et al. found that the ratio of reduced and oxidized glutathione (GSH/GSSG) of the copper treatment groups lowered as the copper concentration increased in porcine small intestinal epithelial cells. GSH, being an essential antioxidant, can undergo oxidation to GSSG during the oxidative stress induced by prolonged copper exposure, leading to a

reduction in GSH levels [30]. These authors concluded that an increased concentration of copper results in oxidative stress. In addition, Galhardi et al. demonstrated that there are other consequences of copper exposure and diabetes, including elevated levels of ROS and changes in indicators of oxidative stress. Both diabetic rats and rats treated with 60 mg/kg copper showed elevated lipid hydroperoxide levels in the serum, but markedly reduced glutathione peroxidase and SOD activities [31]. Furthermore, Yildiz et al. demonstrated a significant reduction in superoxide dismutase (SOD) activity in the liver was observed in the group exposed to copper sulfate. Consequently, copper sulfate also induces oxidative alterations in the liver [32].

The liver and kidneys were chosen as these two vital organs were proven to be affected by microelement dysregulation [33]. In our study, copper levels were higher in the blood, liver, and kidneys of experimental rats, with no difference in zinc levels. Compensatory mechanisms strictly regulate the serum concentrations of copper and zinc, ensuring that they remain stable within specific ranges corresponding to nutritional intake [27]. Nevertheless, there are mechanisms in the blood that are designed to reduce the amount of zinc and increase the amount of copper during inflammatory conditions. As a result, a common characteristic of various chronic diseases associated with aging is an elevated copper-to-zinc ratio [34]. Moreover, in rat kidneys, potassium, and iron concentrations were higher, while calcium and chromium concentrations were lower. In the rat liver, magnesium levels were higher. Sodium, zinc, manganese, selenium, cobalt, molybdenum, and vanadium were not modified, which is difficult to discuss as there are no available data regarding mineral concentrations in the liver or kidneys of copper-supplemented mammals. It has been recently proven that the status of trace elements in metabolic disorders should be carefully analyzed for effective nutritional and therapeutic strategies [35]. In addition to metabolic disorders, some trace element imbalances may also dysregulate the other. For instance, chromium supplementation compensates for the copper content in iron deficiency [35]. Excessive iron intake induces systemic copper deficiency and hypercholesterolemia [36]. Exposure to copper, manganese, and mercury, when they exceed the safety limits, induces changes in neurological tissue [37], and under certain conditions, chromium can act as a pro-oxidant agent [38].

In our study, no significant differences were found in body weight gain, fat content, or lean body composition. In addition, there were no differences in the weights of the brain, heart, kidneys, liver, or spleen. Previous studies with middle-aged rats support the data presented in this article [9]. Consistent with our research, Filetti et al. (2023) reported that there were no significant differences in weight between the control group and the groups that were administered different amounts of copper [39]. However, animals exposed to copper sulfate had significantly lower body weights compared to those in the control group [40].

There are a few limitations in our study due to only a few prior research available and the reliance on self-reported data. While copper deficiency is a well-studied topic, there is a lack of research on its chronic exposure to low concentrations, even though environmental pollution, such as copper contamination in water from aged pipes, is becoming more prevalent. The addition of other mineral(s) to the daily diet, together with increased copper, should be considered in further studies. In addition, varying doses of copper should be studied in both young and aged rats to obtain more precise data for further discussion.

5. Conclusions

Our study revealed that supplementation with 200% of the recommended daily dietary quantity of copper did not modify vascular contraction in young rats. Vascular relaxation tended to increase, while the participation of vasodilator prostanoids was attenuated. Increased nitric oxide derived from iNOS may constitute a compensatory mechanism for the decreased effect of COX-2-derived vasodilator prostanoids. Among the minerals examined, copper, potassium, iron, calcium, chromium, and magnesium were modified. No significant differences were observed in the concentrations of sodium, zinc, manganese,

selenium, cobalt, molybdenum, and vanadium between the studied groups in the rat plasma, rat kidneys, and liver. Detailed data on the status of trace elements and their interactions in patients of different age groups are strongly required for effective nutritional and therapeutic intervention.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu16193230/s1, Table S1: The ELISA kits used for the determination of antioxidant status in the presented study; Table S2: Results detected.

Author Contributions: Conceptualization: K.K.-T., J.J. and M.M. Data curation: K.K.-T. and M.M. Formal analysis, K.K.-T. and M.M. Funding acquisition, M.M. Investigation: K.K.-T., A.H. and M.M. Methodology, K.K.-T. and M.M. Project administration, M.M.; Resources, M.M. Software, A.H. and M.M.; Supervision, M.M.; Validation, M.M. Visualization: K.K.-T., A.H. and M.M. Writing—original draft: K.K.-T., A.H., J.J. and M.M. Writing—review and editing: K.K.-T. and M.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by UWM statutory funding, grant number 61.610.007-110, which was granted to M.M.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Ethics Committee of Olsztyn, Poland (90/2019 from 26 November 2019) and conformed to the European guidelines, including the ARRIVE guidelines.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Materials; further inquiries can be directed to the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Chen, L.; Min, J.; Wang, F. Copper homeostasis and cuproptosis in health and disease. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022**, *7*, 378. [CrossRef] [PubMed]
2. Wang, T.; Xiang, P.; Ha, J.H.; Wang, X.; Doguer, C.; Flores, S.R.L.; Kang, Y.J.; Collins, J.F. Copper supplementation reverses dietary iron overload-induced pathologies in mice. *J. Nutr. Biochem.* **2018**, *59*, 56–63. [CrossRef] [PubMed]
3. Hajam, Y.A.; Rani, R.; Ganie, S.Y.; Sheikh, T.A.; Javaid, D.; Qadri, S.S.; Pramodh, S.; Alsulimani, A.; Alkhanani, M.F.; Harakeh, S.; et al. Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. *Cells* **2022**, *11*, 552. [CrossRef] [PubMed]
4. Kitala, K.; Tanski, D.; Godlewski, J.; Krajewska-Włodarczyk, M.; Gromadziński, L.; Majewski, M. Copper and Zinc Particles as Regulators of Cardiovascular System Function—A Review. *Nutrients* **2023**, *15*, 3040. [CrossRef]
5. El-Ta'alu, A.; Ahmad, M.M. Age-Dependent Effects of Copper Toxicity on Connective Tissue Structural Stability in Wistar Rats Skin. *Niger. J. Physiol. Sci.* **2022**, *37*, 93–99. [CrossRef]
6. Turnlund, J.R.; Reager, R.D.; Costa, F. Iron and copper absorption in young and elderly men. *Nutr. Res.* **1988**, *8*, 333–343. [CrossRef]
7. Johnson, P.E.; Milne, D.B.; Lykken, G.I. Effects of age and sex on copper absorption, biological half-life, and status in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **1992**, *56*, 917–925. [CrossRef]
8. Majewski, M.; Gromadziński, L.; Cholewińska, E.; Ognik, K.; Fotschki, B.; Juśkiewicz, J. The Interaction of Dietary Pectin, Inulin, and Psyllium with Copper Nanoparticle Induced Changes to the Cardiovascular System. *Nutrients* **2023**, *15*, 3557. [CrossRef]
9. Kitala-Tańska, K.; Socha, K.; Juśkiewicz, J.; Krajewska-Włodarczyk, M.; Majewski, M. The Effect of an Elevated Dietary Copper Level on the Vascular Contractility and Oxidative Stress in Middle-Aged Rats. *Nutrients* **2024**, *16*, 1172. [CrossRef]
10. Gordon, C.J.; Phillips, P.M.; Johnstone, A.F. A noninvasive method to study regulation of extracellular fluid volume in rats using nuclear magnetic resonance. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **2016**, *310*, F426–F431. [CrossRef]
11. Majewski, M.; Juśkiewicz, J.; Krajewska-Włodarczyk, M.; Gromadziński, L.; Socha, K.; Cholewińska, E.; Ognik, K. The Role of 20-HETE, COX, Thromboxane Receptors, and Blood Plasma Antioxidant Status in Vascular Relaxation of Copper-Nanoparticle-Fed WKY Rats. *Nutrients* **2021**, *13*, 3793. [CrossRef] [PubMed]
12. Kitala-Tańska, K. Summary of the Results. 2024. Available online: https://app.biorender.com/citation/66e2f1c5ea3e111ddbda34e8 (accessed on 21 September 2024).

13. Wang, Y.C.; Hu, C.W.; Liu, M.Y.; Jiang, H.C.; Huo, R.; Dong, D.L. Copper induces vasorelaxation and antagonizes noradrenaline-induced vasoconstriction in rat mesenteric artery. *Cell. Physiol. Biochem.* **2013**, *32*, 1247–1254. [CrossRef]
14. Kunutsor, S.K.; Dey, R.S.; Laukkanen, J.A. Circulating Serum Copper Is Associated with Atherosclerotic Cardiovascular Disease, but Not Venous Thromboembolism: A Prospective Cohort Study. *Pulse* **2021**, *9*, 109–115. [CrossRef]
15. Li, L.; Shi, J.; Liu, W.; Luo, Y.; Gao, S.; Liu, J.X. Copper overload induces apoptosis and impaired proliferation of T cell in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* **2024**, *267*, 106808. [CrossRef] [PubMed]
16. Tanaka, A.; Kaneto, H.; Miyatsuka, T.; Yamamoto, K.; Yoshiuchi, K.; Yamasaki, Y.; Shimomura, I.; Matsuoka, T.A.; Matsuhisa, M. Role of copper ion in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr. J.* **2009**, *56*, 699–706. [CrossRef] [PubMed]
17. Ferns, G.A.; Lamb, D.J.; Taylor, A. The possible role of copper ions in atherogenesis: The Blue Janus. *Atherosclerosis* **1997**, *133*, 139–152. [CrossRef]
18. Chen, Z.; Li, Y.Y.; Liu, X. Copper homeostasis and copper-induced cell death: Novel targeting for intervention in the pathogenesis of vascular aging. *Biomed. Pharmacother.* **2023**, *169*, 115839. [CrossRef]
19. Yan, M.; Liu, D.L.; Chua, Y.L.; Chen, C.; Lim, Y.L. Effects of micromolar concentrations of manganese, copper, and zinc on alpha1-adrenoceptor-mediating contraction in rat aorta. *Biol. Trace Elem. Res.* **2001**, *82*, 159–166. [CrossRef]
20. Cuzzocrea, S.; Persichini, T.; Dugo, L.; Colasanti, M.; Musci, G. Copper induces type II nitric oxide synthase in vivo. *Free. Radic. Biol. Med.* **2003**, *34*, 1253–1262. [CrossRef]
21. Luo, W.; Liu, B.; Zhou, Y. The endothelial cyclooxygenase pathway: Insights from mouse arteries. *Eur. J. Pharmacol.* **2016**, *780*, 148–158. [CrossRef]
22. Hara, M.R.; Cascio, M.B.; Sawa, A. GAPDH as a sensor of NO stress. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1762*, 502–509. [CrossRef] [PubMed]
23. Couffinhal, T.; Duplàa, C.; Moreau, C.; Lamazière, J.M.; Bonnet, J. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **1994**, *74*, 225–234. [CrossRef] [PubMed]
24. Habas, K.; Shang, L. Alterations in intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in human endothelial cells. *Tissue Cell.* **2018**, *54*, 139–143. [CrossRef] [PubMed]
25. Loboda, A.; Jazwa, A.; Grochot-Przeczek, A.; Rutkowski, A.J.; Cisowski, J.; Agarwal, A.; Jozkowicz, A.; Dulak, J. Heme oxygenase-1 and the vascular bed: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **2008**, *10*, 1767–1812. [CrossRef] [PubMed]
26. Johnson, W.T.; DeMars, L.C. Increased heme oxygenase-1 expression during copper deficiency in rats results from increased mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 1328–1333. [CrossRef]
27. Borkowska-Sztachańska, M.; Thoene, M.; Socha, K.; Juśkiewicz, J.; Majewski, M.S. Decreased vascular contraction and changes in oxidative state in middle-aged Wistar rats after exposure to increased levels of dietary zinc. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2024**, *491*, 117049. [CrossRef]
28. Incalza, M.A.; D'Oria, R.; Natalicchio, A.; Perrini, S.; Laviola, L.; Giorgino, F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul. Pharmacol.* **2018**, *100*, 1–19. [CrossRef]
29. Karaaslan, F.; Demir, F.; Yılmaz, R.; Akıl, E. Total oxidant/antioxidant status, copper and zinc levels in acute ischemic stroke patients after mechanical thrombectomy. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **2023**, *229*, 107718. [CrossRef]
30. Li, R.; Wen, Y.; Lin, G.; Meng, C.; He, P.; Wang, F. Different Sources of Copper Effect on Intestinal Epithelial Cell: Toxicity, Oxidative Stress, and Metabolism. *Metabolites* **2020**, *10*, 11. [CrossRef] [PubMed]
31. Galhardi, C.M.; Diniz, Y.S.; Faine, L.A.; Rodrigues, H.G.; Burneiko, R.C.M.; Ribas, B.O.; Novelli, E.L. Toxicity of copper intake: Lipid profile, oxidative stress and susceptibility to renal dysfunction. *Food Chem. Toxicol.* **2004**, *42*, 2053–2060. [CrossRef]
32. Yildiz, M.; Boyacioglu, M.; Avcioglu, M.; Elmas, S. Changes Induced by Copper Toxicity in the Rat Liver and the Effects of Panax Ginseng on These Changes. *Biol. Bull. Russ. Acad Sci.* **2023**, *50*, S694–S707. [CrossRef]
33. Zou, Y.; Wu, S.; Xu, X.; Tan, X.; Yang, S.; Chen, T.; Zhang, J.; Li, S.; Li, W.; Wang, F. Cope with copper: From molecular mechanisms of cuproptosis to copper-related kidney diseases. *Int. Immunopharmacol.* **2024**, *133*, 112075. [CrossRef] [PubMed]
34. Malavolta, M.; Piacenza, F.; Basso, A.; Giacconi, R.; Costarelli, L.; Mocchegiani, E. Serum copper to zinc ratio: Relationship with aging and health status. *Mech. Aging Dev.* **2015**, *151*, 93–100. [CrossRef]
35. Staniek, H. The Combined Effects of Cr(III) Supplementation and Iron Deficiency on the Copper and Zinc Status in Wistar Rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **2019**, *190*, 414–424. [CrossRef]
36. Lee, J.; Jang, H.; Doo, M.; Kim, B.H.; Ha, J.H. High Iron Consumption Modifies the Hepatic Transcriptome Related to Cholesterol Metabolism. *J. Med. Food.* **2024**, *27*, 895–900. [CrossRef] [PubMed]
37. Draper, M.; Bester, M.J.; Van Rooy, M.J.; Oberholzer, H.M. Adverse neurological effects after exposure to copper, manganese, and mercury mixtures in a Spraque-Dawley rat model: An ultrastructural investigation. *Ultrastruct. Pathol.* **2023**, *47*, 509–528. [CrossRef]
38. Majewski, M.; Gromadziński, L.; Cholewińska, E.; Ognik, K.; Fotschki, B.; Juśkiewicz, J. Dietary Effects of Chromium Picolinate and Chromium Nanoparticles in Wistar Rats Fed with a High-Fat, Low-Fiber Diet: The Role of Fat Normalization. *Nutrients* **2022**, *14*, 5138. [CrossRef]

39. Filetti, F.M.; Schereider, I.R.G.; Wiggers, G.A.; Miguel, M.; Vassallo, D.V.; Simões, M.R. Cardiovascular Harmful Effects of Recommended Daily Doses (13 µg/kg/day), Tolerable Upper Intake Doses (0.14 mg/kg/day) and Twice the Tolerable Doses (0.28 mg/kg/day) of Copper. *Cardiovasc. Toxicol.* **2023**, *23*, 218–229. [CrossRef]
40. Kumar, V.; Kalita, J.; Misra, U.K.; Bora, H.K. A study of dose response and organ susceptibility of copper toxicity in a rat model. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2015**, *29*, 269–274. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Table S1. The ELISA kits used for the determination of antioxidant status in the presented study

	Antigen	ELISA kit catalogue number	Manufacturer, country	Assay range (pg/ml)
1.	Rat PTGS1 ELISA Kit	orb566784	Biorbyt, UK	0.156–10 ng/mL Intra-Assay: CV<8% Inter-Assay: CV<10%
2.	Rat PTGS2 ELISA Kit	orb1199748	Biorbyt, UK	78.1–5000 pg/mL Intra-Assay: CV<10% Inter-Assay: CV<12%
3.	Rat HO-1 ELISA Kit	orb567452	Biorbyt, UK	0.156–10 ng/mL Intra-Assay: CV<8% Inter-Assay: CV<10%
4.	Rat NOS3 ELISA Kit	orb566738	Biorbyt, UK	15.625–1000 pg/mL Intra-Assay: CV<8% Inter-Assay: CV<10%
5.	Rat GAPDH ELISA Kit	orb567887	Biorbyt, UK	0.156–11 ng/mL Intra-Assay: CV<8% Inter-Assay: CV<10%
6.	Rat ICAM-1 ELISA Kit	RAB0221-1KT	Sigma-Aldrich, Germany	28.81–7000 pg/mL Intra-assay cv: <10% Inter-assay cv: <12%

Table S2. Results detected.

	100% Cu (Group A)		**200% Cu (Group B)**				
	Mean	"Std. Deviation"	Mean	"Std. Deviation"	x–fold (B/A)	Δ	p value
COX–1$_{(b)}$ (ng/mL)	1.823	0.607	1.315	0.285	0.72	-0.28	0.291
COX–2$_{(b)}$ (pg/mL)	101.6	18.50	82.0	19.22	0.81	-0.19	0.324
GAPDH$_{(b)}$ (ng/mL)	0.123	0.090	0.097	0.041	0.78	-0.22	0.334
HO–1$_{(b)}$ (ng/mL)	1.409	0.364	1.663	0.351	1.18	0.18	0.156
NOS3$_{(b)}$ (pg/mL)	92.30	21.97	93.88	23.23	1.02	0.02	>0.999
iCAM$_{(b)}$ (pg/mL)	72.01	18.12	97.03	19.12	1.35	0.35	0.435
MDA$_{(h)}$ (μmol/kg)	3.408	1.151	3.291	1.249	0.97	-0.03	>0.999
MDA$_{(b)}$ (μmol/L)	1.721	0.328	1.823	0.875	1.06	0.06	0.535
CAT$_{(h)}$ (U/g protein)	449.9	92.79	456.8	149.4	1.02	0.02	>0.999
CAT$_{(b)}$ (U/mL)	105.1	34.02	88.11	23.11	0.84	-0.16	0.364
SOD$_{(h)}$ (U/g protein)	605.4	115.5	590.0	63.98	0.97	-0.03	0.998
SOD$_{(b)}$ (U/mL)	48.31	9.02	55.12	11.00	1.14	0.14	0.342
ACW$_{(b)}$ (μg/mL ascorbic acid)	2.946	0.717	2.859	0.840	0.97	-0.03	0.989
ACL$_{(b)}$ (μg/mL Trolox)	3.637	0.326	3.571	0.265	0.98	-0.02	0.969
TAS$_{(b)}$ (mmol/L)	0.500	0.461	0.559	0.116	1.12	0.12	0.179
Cu$_{(l)}$ (μg/g)	**3.110**	**0.180**	**3.579**	**0.522**	**1.15**	**0.15**	**0.032**
Cu$_{(k)}$ (μg/g)	**6.255**	**0.907**	**7.707**	**1.676**	**1.23**	**0.23**	**0.045**
K$_{(l)}$ (μg/g)	2859	191.2	2888	223.6	1.01	0.01	0.753
K$_{(k)}$ (μg/g)	**2700**	**105.2**	**2909**	**145.9**	**1.08**	**0.08**	**0.001**
Fe$_{(l)}$ (μg/g)	109.1	14.36	115.9	23.08	1.06	0.06	0.609
Fe$_{(k)}$ (μg/g)	**93.02**	**9.633**	**104.8**	**26.40**	**1.13**	**0.13**	**0.046**
Ca$_{(l)}$ (μg/g)	35.89	5.896	37.95	6.839	1.06	0.06	0.293
Ca$_{(k)}$ (μg/g)	**82.00**	**11.23**	**71.92**	**8.514**	**0.88**	**-0.12**	**0.001**
Cr$_{(l)}$ (ng/g)	24.05	8.916	19.8	8.730	0.82	-0.18	0.637
Cr$_{(k)}$ (ng/g)	**62.91**	**18.14**	**48.29**	**14.23**	**0.77**	**-0.23**	**0.005**
Mg$_{(l)}$ (μg/g)	**189.0**	**14.33**	**199.4**	**20.38**	**1.06**	**0.06**	**0.012**
Mg$_{(k)}$ (μg/g)	175.9	15.42	178.1	14.96	1.01	0.01	0.925
Na$_{(l)}$ (μg/g)	540.4	44.06	567.5	95.31	1.05	0.05	0.193
Na$_{(k)}$ (μg/g)	1034	205.9	962.3	136.6	0.93	-0.07	0.182
Zn$_{(l)}$ (μg/g)	23.35	1.273	24.55	2.134	1.05	0.05	0.085
Zn$_{(k)}$ (μg/g)	23.02	1.388	24.43	1.708	1.06	0.06	0.135
Mn$_{(l)}$ (μg/g)	1.944	0.221	1.909	0.264	0.98	-0.02	0.999
Mn$_{(k)}$ (μg/g)	0.9046	0.101	0.9170	0.135	1.01	0.01	0.359
Se$_{(l)}$ (ng/g)	756.1	62.28	762.4	83.30	1.01	0.01	0.894
Se$_{(k)}$ (ng/g)	1886	122.6	1830	234.3	0.97	-0.03	0.806
Co$_{(l)}$ (ng/g)	6.526	2.126	5.008	2.592	0.77	-0.23	0.107
Co$_{(k)}$ (ng/g)	64.56	10.95	59.16	11.82	0.92	-0.08	0.140
Mo$_{(l)}$ (ng/g)	357.1	46.52	373.4	67.32	1.05	0.05	0.210
Mo$_{(k)}$ (ng/g)	237.6	18.42	247.8	24.96	1.04	0.04	0.156
V$_{(l)}$ (ng/g)	5.114	0.834	4.428	0.801	0.87	-0.13	0.119
V$_{(k)}$ (ng/g)	14.38	2.717	13.95	2.394	0.97	-0.03	0.965
b – blood plasma **h – heart** **l – liver** **k – kidney**							