

Abstract

Doroshenko A. M. *,

¹⁾ Dybkova S. M.,

¹⁾ Rieznichenko L. S.,

¹⁾ Gruzina T. G.,

¹⁾ Ulberg Z. R.,

Chekman I. S.,

Bogomolets National Medical

University,

13 T. Shevchenko Boulevard, Kyiv,

01601, Ukraine;

¹⁾ *F. D. Ovcharenko Institute of*

Biocolloidal Chemistry of National

Academy of Sciences of Ukraine,

42 Vernadskoho Boulevard, Kyiv,

03142, Ukraine

INFLUENCE OF IRON NANOPARTICLES ON INTESTINAL MICROFLORA OF RATS WITH IRON DEFICIENCY ANEMIA

According to the WHO data, iron deficiency anemia (IDA) is one of the most widespread pathological states as well as social problem. IDA is also one of the most important causes of intestinal dysbacteriosis. Varieties of oral iron preparations are widely prescribed as a part of medical care for patients with IDA. However, iron of existing oral antianemic drugs is not usually effectively absorbed. It may lead to elevation of intestinal iron content. The excess of iron in intestine can also result in dysbacteriosis. Moreover, existing antianemic drugs are not usually effective and safe. Thus, either IDA or oral iron supplementation may cause intestinal dysbacteriosis. Therefore, synthesis and development of new classes of biosafe and biocompatible antianemic drugs is an urgent task. Iron nanoparticles are promising in this direction. Due to high biological activity of iron nanoparticles, preclinical study of their effectiveness and safety for IDA treatment should include determining of their impact on intestinal microflora. The aim of this work was to study the influence of iron nanoparticles on intestinal microflora under conditions of oral administration to rats with IDA.

Substance of 40 nm sized spherical zero-valent iron nanoparticles (FeNPs) used in this study have been synthesized according to the original protocol of chemical condensation in water medium by iron (III) chloride reduction. We studied biological activity of FeNPs, as potential pharmacological substance with antianemic properties, on the model of IDA using *Wistar* female rats. IDA in experimental animals was modelled using iron deficiency diet. The experimental treatment course of rats with IDA included 10 days oral administration of FeNPs at/in therapeutic (12 mg/kg) dose. Commercial preparation based on pharmacological substance *ferri (III) hydroxydi polymaltosum complexus* was used as comparison drug in therapeutic dose. The status of microflora in lower part of rats' gastrointestinal tract after experimental treatment course has been determined using standard microbiological protocols.

According to microbiological tests, rats fed with iron deficient diet demonstrated intestinal dysbiosis. In this case, there was a significant reduction of the protective microflora (bifidobacteria and lactobacilli). After 10 days of experimental treatment course (either with FeNPs or comparison drug), we observed normalization of quantitative parameters of protective and transient intestinal microorganisms in rats with IDA up to a level of healthy animals. However, recovery of number of sulphite-reductive clostridia in anemic animals' gut, which had been receiving FeNPs, was more effective than in the case of comparison drug administration. FeNPs are possessed by favourable

effect on the gastrointestinal tract microflora in case of IDA. Therefore, FeNPs are perspective as biosafe and biocompatible pharmacological substance for development of new class antianemic preparations.

Key words: iron nanoparticles, anemia, iron deficiency, dysbacteriosis, intestinal microflora, normalization.

Corresponding author: * amdor@mail.ru

Резюме

Дорошенко А. М. *,

¹⁾ Дибкова С. М.,

¹⁾ Резніченко Л. С.,

¹⁾ Грузіна Т. Г.,

¹⁾ Ульберг З. Р., Чекман І. С.,

Національний медичний

університет

ім. О. О. Богомольця,

бульвар Т. Шевченка, 13, Київ,

01601, Україна;

¹⁾ Інститут біологічної хімії

ім. Ф. Д. Овчаренка Національної
академії наук України,

бульвар Вернадського, 42, Київ,

03142, Україна

ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК ЗАЛІЗА НА СТАН МІКРОФЛОРИ КИШЕЧНИКА ЩУРІВ ІЗ ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНОЮ АНЕМІСІЮ

За даними експериментальних і клінічних досліджень як при залізодефіцитній анемії (ЗДА), так і при застосуванні пероральних препаратів заліза для її лікування чи профілактики може розвиватися кишковий дисбактеріоз. З огляду на підвищену біологічну і фармакологічну активність нанорозмірних частинок металів перспективними у розробленні протианемічного засобу є наночастинки заліза. Однак їх доклінічне дослідження як потенційної протианемічної субстанції повинне містити визначення особливостей впливу на показники кишкової мікрофлори при ЗДА, що й було метою цієї роботи. Наночастинки заліза розміром 40 нм синтезовані методом хімічної конденсації у водному середовищі. За допомогою стандартних мікробіологічних протоколів встановлено, що у щурів із аліментарною ЗДА розвивається дисбактеріоз. Експериментальний 10-денний курс лікування щурів із ЗДА наночастинками заліза або препаратом порівняння на основі заліза (III) гідроксиду полімальтозного комплексу в умовно-терапевтичній дозі (12 мг/кг/добу) призводив до нормалізації показників мікрофлори кишечника. При цьому відновлення кількості сульфитредукуючих клостридій у кишечнику анемічних тварин, яким вводили наночастинки заліза, було більш ефективним, ніж у разі введення препарату порівняння. Отримані дані щодо сприятливого впливу дослідженої субстанції наночастинок заліза стосовно показників кишкової мікрофлори дослідних тварин (щурів) свідчать про перспективність проведення подальших доклінічних досліджень наночастинок заліза як потенційної субстанції для створення високоефективного і безпечного протианемічного лікарського засобу.

Ключові слова: наночастинки заліза, анемія, дефіцит заліза, дисбактеріоз, кишкова мікрофлора, нормалізація.

Резюме

Дорошенко А. М. *,

¹⁾ Дибкова С. Н.,

¹⁾ Резніченко Л. С.,

¹⁾ Грузина Т. Г.,

¹⁾ Ульберг З. Р.,

Чекман И. С.,

Национальный медицинский

университет

им. А. А. Богомольца,

бульвар Т. Шевченка, 13, Киев,

01601, Украина;

1) Институт биокolloидной

химии им. Ф. Д. Овчаренка

Национальной академии наук

Украины,

бульвар Вернадского, 42, Киев,

03142, Украина

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЖЕЛЕЗА НА СОСТОЯНИЕ МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА КРЫС С ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИЕЙ

По данным экспериментальных и клинических исследований как при железодефицитной анемии (ЖДА), так и при применении пероральных препаратов железа для ее лечения или профилактики может развиваться кишечный дисбактериоз. Учитывая повышенную биологическую и фармакологическую активность наноразмерных частиц металлов, перспективными в разработке противоанемического средства являются наночастицы железа. Однако доклиническое исследование их как потенциальной противоанемической субстанции должно включать определение особенностей влияния на показатели кишечной микрофлоры при ЖДА, что и было целью данной работы. Наночастицы железа размером 40 нм синтезированы методом химической конденсации в водной среде. С помощью стандартных микробиологических протоколов установлено, что у крыс с алиментарной ЖДА развивается дисбактериоз. Экспериментальный 10-дневный курс лечения крыс с ЖДА наночастицами железа или препаратом сравнения на основе железа (III) гидроксида полимальтозного комплекса в условно-терапевтической дозе (12 мг/кг/сутки) приводил к нормализации показателей микрофлоры кишечника. При этом восстановление количества сульфитредуцирующих клостридий в кишечнике анемичных животных, которым вводили наночастицы железа, было более эффективным, чем в случае введения препарата сравнения. Полученные данные относительно благоприятного влияния исследованной субстанции наночастиц железа на показатели кишечной микрофлоры опытных животных (крыс) свидетельствуют о перспективности проведения дальнейших доклинических испытаний наночастиц железа как потенциальной субстанции для создания высокоэффективного и безопасного противоанемического лекарственного средства.

Ключевые слова: наночастицы железа, анемия, дефицит железа, дисбактериоз, кишечная микрофлора, нормализация.

Автор, відповідальний за листування: * amdor@mail.ru

Вступ

Згідно з даними Всесвітньої організації охорони здоров'я залізодефіцитна анемія (ЗДА) має велике медико-соціальне значення, оскільки може призводити до порушення фізичного і психічного розвитку, зниження працездатності, зростання захворюваності й смертності населення [1]. Крім того, ЗДА є однією з причин кишкового дисбіозу, про що свідчать численні дані експериментальних і клінічних досліджень [2–5].

Складна екосистема кишкової мікрофлори забезпечує функціональний бар'єр, що запобігає проникненню патогенних мікроорганізмів із

зовнішнього середовища, а також бере участь в утворенні біологічно активних сполук [6, 7]. Залізо є важливим для життєдіяльності більшості мікроорганізмів, що конкурують за цей елемент, тому вміст заліза у кишечнику впливає на стан кишкового мікробіоценозу [8].

Для поповнення запасів заліза в організмі та нормалізації рівня гемоглобіну в пацієнтів із ЗДА проводять замісну терапію препаратами заліза, віддаючи перевагу пероральному шляху введення, оскільки при цьому залучені фізіологічні механізми регуляції всмоктування [9]. Однак значна частка заліза, що входить до складу сучасних протианемічних засобів, не

всмоктується, потрапляє в ободову кишку і стає доступним для засвоєння кишковою мікрофлорою [10]. У зв'язку із тим, що залізо впливає на життєдіяльність багатьох бактерій, надлишковий вміст цього металу в товстому кишечнику, що спостерігається під час застосування у профілактиці та лікуванні ЗДА препаратів заліза, може призводити до дисбіозу [8, 11, 12].

Недостатнє всмоктування існуючих препаратів заліза при пероральному застосуванні, а також значний ризик розвитку побічних ефектів з боку шлунково-кишкового тракту під час їх застосування у клінічній практиці [9, 13] роблять актуальним пошук більш ефективних і безпечних субстанцій з протианемічними властивостями. З огляду на підвищену біологічну й фармакологічну активність нанорозмірних частинок металів [14, 15], перспективними у розробленні протианемічного засобу є наночастинки заліза. Однак відомостей щодо фармакологічних властивостей цих нанооб'єктів на сьогодні недостатньо.

Отже, як при ЗДА, так і під час застосування пероральних препаратів заліза може спостерігатися дисбактеріоз, тому, враховуючи високу біологічну активність наночастинок заліза, їх доклінічне дослідження повинне містити визначення особливостей впливу на показники кишкової мікрофлори при ЗДА.

Метою цієї роботи було дослідження впливу наночастинок заліза як потенційної протианемічної субстанції на стан мікрофлори кишечника за умов перорального введення щурам із залізодефіцитною анемією.

Матеріали і методи

У дослідженні застосовано субстанцію сферичних наночастинок нуль-валентного заліза (НЧЗ) розміром 40 нм, синтезовану за оригінальною методикою в Інституті біоколоїдної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України методом хімічної конденсації у водному середовищі шляхом відновлення хлориду заліза (III) [16].

Згідно з критеріями Методичних рекомендацій «Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів», затверджених Науково-експертною радою Державного експертного центру МОЗ України (протокол № 8 від 26.09.2013 р.), субстанція НЧЗ охарактеризована як біобезпечна і біосумісна [17].

Досліди проводили з використанням 40 самок щурів лінії *Wistar* із початковою масою 60–90 г. ЗДА моделювали шляхом утримування дослідних тварин на залізодефіцитній дієті протягом 4 місяців. Контрольні умовно здорові тварини отримували корм із нормальним вмістом заліза. Розвиток ЗДА у тварин, які отримували залізодефіцитну дієту, було підтверджено на основі зниження, порівняно із умовно здоровими тваринами, основних маркерних показників крові, а саме: концентрації гемоглобіну – на 30 %, концентрації заліза сироватки крові – на 60 %, відсотка насичення трансферину – на 40–45 %. Кров для дослідження даних показників у тварин відбирали після евтаназії шляхом декапітації під хлороформним наркозом. Вищенаведені показники крові визначали з використанням наборів стандартних діагностикумів для клініко-діагностичних та біохімічних лабораторій виробництва ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика» (Дніпропетровськ, Україна) згідно з протоколами виробника.

Як препарат порівняння застосовано протианемічний засіб, діючою речовиною якого є заліза (III) гідроксид полімальтозний комплекс (лікарська форма – сироп; концентрація Fe(III) – 10 мг/мл). Розрахунок дози НЧЗ для щурів здійснювали шляхом перерахунку рекомендованої середньої добової терапевтичної дози заліза (III) гідроксиду полімальтозного комплексу для людини (2,85 мг/кг) з урахуванням коефіцієнта видової стійкості [18]. Розрахована добова умовно-терапевтична доза субстанції НЧЗ і препарату порівняння для щурів становила 12 мг/кг.

Середня маса тварин на початку курсу експериментального лікування становила (220 ± 20) г. Дослідних тварин розподіляли на 4 групи:

Група 1 – контрольні умовно здорові тварини (n = 10).

Група 2 – контрольні тварини із ЗДА без експериментального лікування (контроль анемії, n = 10);

Група 3 – тварини із ЗДА, яким протягом 10 днів *per os* вводили субстанцію НЧЗ в умовно-терапевтичній дозі (12 мг/кг/добу) (n = 10);

Група 4 – тварини із ЗДА, яким протягом 10 днів *per os* вводили препарат порівняння в умовно-терапевтичній дозі (12 мг/кг/добу) (n = 10).

Тваринам із контрольних груп (групи 1 і 2) *per os* вводили еквівалентні об'єми розчинника субстанції – воду для ін'єкцій.

На наступну добу після завершення 10-денного курсу експериментального лікування субстанцією НЧЗ або препаратом порівняння шурів виводили з експерименту шляхом декапітації під хлороформним наркозом і здійснювали відбір проб вмісту сліпої кишки під час розтину.

Стан кишкової мікрофлори дослідних тварин визначали шляхом посіву вмісту сліпої кишки на селективні середовища [19] на наступну добу після завершення 10-денного курсу експериментального лікування наночастинками заліза або препаратом порівняння. Досліджувану стерильно зважену аліквоту вмісту сліпої кишки до 1 г вносили в агаризований (0,1 %) тіогліколево-фосфатний буфер у співвідношенні 1:10 та готували розведення на тіогліколево-фосфатному буфері від 10^{-1} до 10^{-10} . Отримані розведення висівали по 0,05 см³ на селективні середовища для кількісного підрахунку представників захисної та транзитної мікрофлори.

Під час проведення експерименту були дотримані основні положення Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та в інших наукових цілях, від 18.03.1986 р., Директиви ЄС № 609 від 24.11.1986 р., Наказу МОЗ України «Про затвердження Порядку проведення клінічних випробувань лікарських засобів та експертизи матеріалів клінічних випробувань і Типового положення про комісію з питань етики» № 66 від 13.02.2006 р., Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» 2006 р.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою комп'ютерних програм BioStat 2009 for Windows (v5.8.4) та Microsoft Office Excel 2007. Для визначення статистичної достовірності між величинами використовували параметричний критерій Стьюдента (t) [20]. Зміни показників вважали достовірними з рівнем значущості понад 95 % ($P < 0,05$).

Результати та їх обговорення

Розвиток ЗДА супроводжується проявом дисбактеріозів різного ступеня тяжкості. Крім того, протианемічні препарати, представлені на сучасному фармацевтичному ринку, можуть викликати побічні ефекти, наслідком яких є дисбіотичні порушення. Тому фармакологічний

ефект після перорального введення субстанції НЧЗ та препарату порівняння досліджували за зміною стану кишкової мікрофлори дослідних тварин.

Аналіз вмісту захисної мікрофлори (біфідобактерій та лактобацил) показав, що при ЗДА спостерігається істотне зниження кількості цих мікроорганізмів. Так, на початку експерименту в біотопі кишечника умовно-здорових тварин кількість лактобацил і біфідобактерій становила $3,5 \cdot 10^8$ та $4,7 \cdot 10^8$ КУО/г відповідно, а в анемічних тварин – на порядок менше і дорівнювала відповідно $2,2 \cdot 10^7$ і $3,4 \cdot 10^7$ КУО/г ($P < 0,05$) (табл. 1).

Крім того, у вмісті сліпої кишки анемічних тварин встановлено збільшення на порядок кількості ентеробактерій разом із іншими ознаками розвитку дисбактеріозу – збільшенням кількості грибів та сульфитредукуючих кластридій (табл. 1).

Отримані результати щодо розвитку кишкового дисбіозу при модельній ЗДА в цілому узгоджуються з даними літератури. Як показано іншими авторами [2, 4], утримання дослідних тварин на залізодефіцитній дієті також призводило до кишкового дисбактеріозу, зокрема зростання вмісту ентеробактерій, та пригнічення утворення таких важливих мікробних метаболітів, як пропіонат і бутират. При цьому показники мікробіоценозу відновлювалися в умовах експериментального лікування сполуками заліза. У дослідженнях *in vitro* під час застосування моделі тривалої ферментації в ободовій кишці із застосуванням кишкової мікрофлори в умовах недостатньої кількості заліза у живильному середовищі встановлений різноспрямований вплив залізодефіциту на життєдіяльність різних мікроорганізмів, зокрема зниження кількості *Roseburia* spp./*Eubacterium rectale*, *Bacteroides* spp., тоді як вміст *Lactobacillus* spp. і *Enterobacteriaceae* зростав. Крім того, спостерігалось зниження концентрації бутирату і пропіонату [5].

Через 10 днів після перорального введення як субстанції НЧЗ, так і препарату порівняння у дослідних тварин з модельною ЗДА було виявлено нормалізацію кількісних показників захисної та транзитної мікрофлори до рівня показників умовно здорових тварин (табл. 1).

Таблиця 1

Склад мікрофлори нижніх відділів шлунково-кишкового тракту дослідних щурів

Мікроорганізми	Кількість мікроорганізмів у 1 г вмісту товстого кишечника (КУО/г)			
	Контрольні умовно здорові тварини	Контрольні анемічні тварини	Анемічні тварини, яким вводили наночастинки заліза	Анемічні тварини, яким вводили препарат порівняння
Загальна кількість анаеробних	$4,1 \cdot 10^9$	$2,0 \cdot 10^8$ *	$4,0 \cdot 10^9$ §	$3,9 \cdot 10^9$ §
Загальна кількість аеробних	$3,0 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^8$ *	$3,0 \cdot 10^8$ §.#	$3,4 \cdot 10^8$ §
Лактобацили	$3,5 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^7$ *	$3,4 \cdot 10^8$ §	$3,4 \cdot 10^8$ §
Біфідобактерії	$4,7 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^7$ *	$4,1 \cdot 10^8$ §	$3,9 \cdot 10^8$ §
Ешерихії	$4,4 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^3$ *	$3,7 \cdot 10^4$ §.#	$3,0 \cdot 10^4$ §
Ентеробактерії	$6,2 \cdot 10^4$	$6,8 \cdot 10^5$ *	$6,0 \cdot 10^4$ §	$6,0 \cdot 10^4$ §
Ентерококи	$4,3 \cdot 10^8$	$2,7 \cdot 10^8$ *	$4,0 \cdot 10^8$ §	$4,1 \cdot 10^8$ §
Сульфитредуючі клостридії	$3,3 \cdot 10^4$	$4,5 \cdot 10^5$ *	$3,8 \cdot 10^4$ §.#	$4,0 \cdot 10^4$ §
Стрептококи	$2,5 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^7$ *	$2,4 \cdot 10^7$ §	$2,3 \cdot 10^7$ §
Гриби, плісені	$1,1 \cdot 10^3$	$2,9 \cdot 10^5$ *	$1,8 \cdot 10^3$ §	$1,7 \cdot 10^3$ §
Стафілококи	$2,2 \cdot 10^3$	$3,7 \cdot 10^4$ *	$3,5 \cdot 10^3$ §.#	$3,0 \cdot 10^3$ §
Патогенні (шигела, сальмонела)	–	–	–	–

* – статистично достовірно щодо умовно здорових тварин (контролю), $P < 0,05$; § – статистично достовірно щодо тварин із анемією, $P < 0,05$; # – статистично достовірно щодо тварин із анемією, яким вводили препарат порівняння, $P < 0,05$

При цьому необхідно відмітити, що у тварин, яким вводили наночастинки заліза, спостерігали приріст біомаси лактобацил та біфідобактерій з дотриманням кількісної переваги біфідобактерій над лактобактеріями.

Крім того, на фоні експериментального лікування як субстанцією НЧЗ, так і препаратом порівняння спостерігали позитивну динаміку зміни складу мікрофлори кишечника у щурів і за показниками кількості сульфитредуючих клостридій. Так, в анемічних тварин кількість таких анаеробних мікроорганізмів становила $4,5 \cdot 10^5$ КУО/г вмісту товстого кишечника, в умовно здорових тварин – $3,3 \cdot 10^4$ КУО/г, а у тварин, яким вводили НЧЗ, – $3,8 \cdot 10^4$ КУО/г. Зниження кількості сульфитредуючих клостридій у кишечнику анемічних тварин, яким вводили НЧЗ, було більш ефективним, ніж

у разі введення препарату порівняння ($4,0 \cdot 10^4$ КУО/г, $P < 0,05$).

Згідно з даними літератури застосування препаратів заліза для профілактики та лікування ЗДА може призводити до кишкового дисбактеріозу. Так, у дослідях на тваринах під час введення заліза сульфату порушувалося співвідношення між біфідобактеріями та лактобацилами по відношенню до ентеробактерій [12]. Крім того, у клінічних дослідженнях показано, що у немовлят, які отримували збагачене залізом коров'яче молоко, збільшувався вміст ентеробактерій по відношенню до біфідобактерій [11]. В іншому дослідженні у дітей шкільного віку, які отримували протягом 6 місяців печиво, збагачене електролітичним залізом, у зразках калу встановлена менша кількість лактобацил і



збільшення ентеробактерій порівняно із контролем [10].

Дослідження зі встановлення впливу НЧЗ на показники мікрофлори у щурів із модельною ЗДА проведені вперше. На відміну від наведених вище літературних даних введення НЧЗ і препарату порівняння у випробуваній дозі не призводило до порушення досліджених показників кишкової мікрофлори дослідних щурів, а навпаки – сприяло нормалізації кількісних співвідношень мікроорганізмів. Такі особливості впливу досліджуваних субстанцій заліза на стан мікрофлори дослідних тварин, порівняно із даними літератури, свідчать про визначальну роль фізико-хімічних характеристик субстанцій заліза у прояві їх біологічної дії.

Висновки

Отримані дані свідчать, що при аліментарному дефіциті заліза у дослідних тварин спостерігався розвиток дисбіозу кишечника. Пероральне введення як субстанції НЧЗ, так і препарату порівняння (заліза (III) гідроксиду полімальтозний комплекс) сприяло відновленню показників стану нормофлори у щурів з модельною залізодефіцитною анемією.

Перспективи подальших досліджень

Установлений сприятливий вплив дослідженої субстанції наночастинок заліза стосовно показників кишкової мікрофлори дослідних тварин (щурів) свідчить про доцільність проведення подальших доклінічних досліджень та визначення молекулярно-біохімічних механізмів впливу наночастинок заліза на біологічні системи різного рівня організації.

References (список літератури)

1. Nissenson AR, Goodnough LT, Dubois RW. *Anemia: not just an innocent bystander?* *Arch Intern Med.* 2003;163(12):1400–1404.
2. Tompkins GR, O'Dell NL, Bryson IT, Pennington CB. *The effects of dietary ferric iron and iron deprivation on the bacterial composition of the mouse intestine.* *Curr Microbiol.* 2001;43(1):38–42.
3. Balamurugan R, Mary RR, Chittaranjan S, Jancy H, Shobana Devi R, Ramakrishna BS. *Low levels of faecal lactobacilli in women with iron-deficiency anaemia in south India.* *Br J Nutr.* 2010;104(7):931–934.
4. Dostal A, Chassard C, Hilty FM, Zimmermann MB, Jaeggi T, Rossi S, Lacroix C. *Iron depletion and repletion with ferrous sulfate or electrolytic iron modifies the composition and metabolic activity of the gut microbiota in rats.* *J Nutr.* 2012;142(2):271–277.
5. Dostal A, Fehlbaum S, Chassard C, Zimmermann MB, Lacroix C. *Low iron availability in continuous in vitro colonic fermentations induces strong dysbiosis of the child gut microbial consortium and a decrease of main metabolites.* *FEMS Microbiol Ecol.* 2013;83(1):161–175.
6. Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. *Review article: the role of butyrate on colonic function.* *Aliment Pharmacol Ther.* 2008;27(2):104–119.
7. Stecher B, Hardt WD. *The role of microbiota in infectious disease.* *Trends Microbiol.* 2008;16(3):107–114.
8. Andrews SC, Robinson AK, Rodriguez-Quinones F. *Bacterial iron homeostasis.* *FEMS Microbiol Rev.* 2003;27(2–3):215–237.
9. Santiago P. *Ferrous versus ferric oral iron formulations for the treatment of iron deficiency: a clinical overview.* *Scientific World Journal.* 2012;2012:846824.
10. Zimmermann MB, Chassard C, Rohner F, N'goran EK, Nindjin C, Dostal A, Utzinger J, et al. *The effects of iron fortification on the gut microbiota in African children: a randomized controlled trial in Cote d'Ivoire.* *Am J Clin Nutr.* 2010;92(6):1406–1415.
11. Mevissen-Verhage EA, Marcelis JH, Harmsen-Van Amerongen WC, de Vos NM, Verhoef J. *Effect of iron on neonatal gut flora during the first three months of life.* *Eur J Clin Microbiol.* 1985;4(3):273–278.
12. Lee SH, Shinde P, Choi J, Park M, Ohh S, Kwon IK, Pak SI, Chae BJ. *Effects of dietary iron levels on growth performance, hematological status, liver mineral concentration, fecal microflora, and diarrhea incidence in weanling pigs.* *Biol Trace Elem Res.* 2008;126(1):S57–68.
13. Geisser P, Burckhardt S. *The pharmacokinetics and pharmacodynamics of iron preparations.* *Pharmaceutics.* 2011;3(1):12–33.
14. Chekman IS. *Nanofarmakologija [Nanopharmacology].* Kyiv: Zadruga Publ., 2011. 424 p.
15. Chekman IS, Ulberg ZR, Malanchuk VO,



- Gorchakova NO, Zupanets IO. *Nanonauka, nanobiologiya, nanofarmatsiia* [Nanoscience, nanobiology, nanopharmacy]. Kyiv: Poligraf plus Publ., 2012. 328 p.
16. Rieznichenko LS, Dybkova SM, Doroshenko AM, Chekman IS, Ulberg ZR. [Synthesis of iron nanoparticles and characterization of their biosafety]. *Visnyk Problem Biologii i Medytsyny*. 2014;2(3):319–324.
17. Guidelines “Safety assessment of medical nanopreparations” approved by the Scientific Expert Council of the State Expert Centre of the Ministry of Health of Ukraine (protocol No. 8, dated 09.26.2013). Kyiv, 2013. 108 p.
18. Stefanov O, editors. *Doklinichni doslidzhennia likarskykh zasobiv (metodychni rekomendatsii)* [Preclinical studies of drugs (Guidelines)]. Kyiv: Avitsenna Publ., 2002. 527 p.
19. Labinskaia AS. *Mikrobiologiya s tekhnikai mikrobiologicheskikh issledovaniy* [Microbiology with technique of microbiological studies]. Moscow: Meditsina Publ., 1978. 394 p.
20. Lakin GF. *Biometriia: uchebnoe posobie dlia biologicheskikh spetsialnostei VUZov* [Biometrics: a training manual for biological specialties of universities]. Moscow: Vysshaya Shkola Publ., 1990. 352 p.

(received 15.07.2014, published online 15.10.2014)

(отримано 15.07.2014, опубліковано 15.10.2014)

