

ЭР, ЭМ, ХҮҮ ЖОНШИНД ХИЙСЭН ШИНЖ ЧАНАРЫН СУДАЛГААНД ҮНДЭСЛЭН ЭР ЖОНШИЙГ НАНО БҮТЦЭД ОРУУЛАХ АРГА БОЛОВСРУУЛАХ НЬ

Д.Хандмаа^{1,2,3#}, Л.Хүрэлбаатар^{3#}, Б.Оюунчимэг^{1,2,3}, Ким Хэ-вон^{1,2}

¹Эдийн инженерчлэлийн хүрээлэн, Данкүүк Их Сургууль, БНСУ

²Нанобиоанагаахын сургууль, Данкүүк Их сургууль, БНСУ

³Эм судлалын хүрээлэн, Монос групп, Монгол Улс

e-mail: khandmaa@naver.com; 82-10-7183-6336

METHOD OF NANOSIZED CALCIUM SALT (CALCITE) PREPARATION BASED ON THE CHARACTERIZATION OF NATURAL SPAR (CALCITE), FLUORSPAR, FELDSPAR

D.Khandmaa^{1,2,3#}, L.Khurelbaatar^{3#}, B.Oyunchimeg^{1,2,3}, KimHae-Won^{1,2}

¹ Institute of tissue regeneration engineering, Dankook University , South Korea

² Department of Nanobiomedical Science, Dankook University, South Korea

³Drug Research Institute, Monos group, Mongolia

**Corresponding author: e-mail: khandmaa@naver.com; 82-10-7183-6336*

Abstract

Calcium salt composite/calcite or spar is one of traditionally used therapeutic material for hard tissue repair and regeneration due to its abundant calcium content. There are several types of calcite (fluorspar or calcite fluoride, cobaltoan calcite, etc) exist in the nature and their therapeutic effects are different depending on their basic properties. For instance, calcium carbonate based calcite used to treat damaged hard tissue in the traditional medicine. Here, we would like to investigate characterizations of three different types of calcites gathered from the nature. For this purpose, collected calcium salt composites (calcite, fluorspar, feldspar) were examined their surface properties, morphology and size by the scanning electron microscopy. Energy-dispersive X-ray spectroscopy was used to determine their elemental analysis and X-ray diffraction was carried out to characterize their crystallinity structure. Based on the calcium contents, calcium carbonate-based calcite was selected to form nano-sized calcite and study their toxicity by using mesenchymal stem cell. Throughout this study, we identified properties of three different calcites and successfully reduced size in nanoscale which helps to use in the future treatment of osteoporosis or to stimulate osteogenesis.

Keywords: calcite, natural product, bone regeneration, nanoscale

Үндэслэл

Эрт дээр үеэс уламжлалт анагаах ухаанд ясны гэмтэл бэртэл болон хорыг тайлах, хор харшсан, усан хаван гэх мэт өвчлөлүүдэд

эмчилгээний зориулалтаар хэрэглэгдэж ирсэн жонш нь өнгө, бүтцээсээ хамааран / эр, эм, хүү, манин гэх мэт/ хэд хэдэн төрлөөр байгальд оршдог.

Эдгээрийн дотроос нүүрс хүчлийн давсны төрлийн эрдэс болох эр жоншийг яс залгах, биемахбод тэгшитгэх, бэртэл гэмтэл зэрэгт түлхүү хэрэглэж иржээ^{1,2,3}. Уламжлалт анагаах ухаанд жоншийг эмийн бэлдмэл болгон хэрэглэхдээ архи болон сүүнд номхотгон хоргүйжүүлж хэрэглэдэг^{4,5}. Тэгвэл уламжлалт анагаах ухаанд харьцангуй сайн судлагдсан эр, эм, хүү жоншнуудын үндсэн шинж чанар болоод номхотголын горимыг орчин цагийн биоматериал судлалын шинжлэх ухаанд тулгуурлан материал судлалын аргаар дэлгэрэнгүй судалгаа хийх шаардлага тулгарч буйд үндэслэн дараах судалгааг хийв.

Ингэхдээ электрон микроскоп (scanning electron microscope) болон энерги дисперсийн рентгений аргаар судлахад эр жоншны агууламжинд кальцийн карбонат ихээр агуулагддаг нь батлагдсан ба номхотголын аргаар шатаасны дараа кальцийн агууламж илүү нэмэгдэж байв. Харин эм болон хүү жоншинд кальцийн фтор ихээр агуулагдаж байсан тул номхотгосны дараа кальцийн хэмжээ харьцангуй бага нэмэгдсэн.

Мөн эрдсийн бүрдлийн судалгааг рентген дифракцийн багаж ашиглан дээж тус бүрд тодорхойлсон ба цаашдын судалгаанд эр жоншийг сонгон авч шатаахын өмнөх ба дараах агууламжийг тодорхойлж үр дүнг харьцуулав.

Судалгааны материал ба арга зүй

Судалгаанд хэрэглэгдсэн гурван төрлийн /эр, эм, хүү/ жоншийг Монос Группын Эм судлалын хүрээлэнд бэлдсэн.

Уг дээжүүдийн найрлагын судалгааг БНСУ-ын Данкүүк их сургууль дахь нано-биоанагаахын сургуулийн лабораторид хийсэн ба туршилтын өмнө дээжний гадаргууг алтаар бүрж скан электрон микроскоп (SEM;-JSM6330F, JEOL) ашиглан зураг авав. Мөн

энерги дисперсийн рентгений арга ашиглан химийн элементийн анализ хийв.

Мөн эдгээр дээжний эрдсийн бүрдлийн найрлагыг тодорхойлохдоо уг лабораторийн рентген дифракцийн багаж ашиглан (XRD, Philips MRD CuK α , 40 kV, 20 mA) хийж гүйцэтгэв^{6,7}.

Үндсэн дээжүүдийн найрлага, бүтцийг тодорхойлсны дараа эр жоншийг сонгон авч 900°C-д шатаан номхотгосны дараа нано хэмжээст оруулав. Шатаах зууханд 900°C хүртэл 2 цагийн хурдаар шатааж уг температурт 3 цаг барьсаны дараа 12-24 цагийн турш температурыг аажмаар бууруулсан.

Нано хэмжээст оруулахын тулд 2 мм ба 30 мкм хэмжээтэй 2 төрлийн циркон бөмбөлөгийг эр жонштой хамт хольж этанол (99%) нэмээд 48 цагийн турш 350 эрг/мин хурдаар холигч ашиглан бутлав. Үүний дараа материалын шинж чанар тодорхойлох туршилтуудыг давтан хийсэн.

Нано бүтцийг тогтоох туршилтын дараа хархны чөмөгнөөс ялгасан үүдэл эсэд эр жоншны хортой нөлөөлөл үзүүлэх нөлөөллийг тогтоох туршилт хийв. Эр жоншны дээжийг 20, 40, 80, 160, 320 мг/мл концентрациар эс өсгөвөрлөх тэжээлт орчинд 24 цагийн турш уусгаж бэлдээд шүүж урьдчилан өсгөвөрлөсөн чөмөгний үүдэл эс (Human mesenchymal stem cells) рүү нэмж, дахин 1 ба 3 хоног өсгөвөрлөсний дараа эсийн тоог ELISA оношлуураар (Cell counting kit, Dojindo-8) шалгаж тоон үзүүлэлтээр илэрхийлэв. Эсийн хэлбэр, морфологи бүтцэд нөлөөлөх нөлөөллийг шалгахдаа амьд ба үхсэн эсийг флюороосценцийн будгаар будаж (Live/Dead Cell Imaging Kit, Molecular Probes, Life Technologies Corporation) флюоросценцийн микроскопоор зураг авч харьцуулав^{8,9}.

Судалгааны үр дүн

Дээж тус бүрийн бүтцийг тодорхойлохын тулд Скан электрон микроскопоор зураг авч (50мм хэмжээстэй) жижиг хэсгийн хэмжээ болон гадаргууг харьцуулав. Судалгааны үр дүнгээс харахад байгальд оршиж буй жоншны жижиг хэсгийн хэмжээ харилцан адилгүй том, жижиг байгаа (Зураг 1) бөгөөд шууд хэрэглэхэд тохиромжгүй буюу ходоодны шарх үүсгэх, бөөрөнд чулуу үүсгэх зэрэг эрсдэл байх магадлалтай юм. Иймээс номхотгол хийх, жижиг хэсгийн хэмжээг нэгэн жигд болгож боловсруулсны дараа эмчилгээнд

хэрэглэх нь үр дүнтэйг батлан харуулж байна. Үүний зэрэгцээ химийн элементийн анализийн үр дүнгээр эр жоншны найрлагад кальцийн карбонат илүү агуулагдаж байгаа нь батлагдсан ба уг жоншийг номхотгон шатааж хэрэглэхэд илүү тохиромжтой байсан. Харин эм болон хүү жоншинд хийгдсэн туршилтын үр дүнгээс харвал фтор болон цахиур илүү ихээр агуулагдаж байна (Зураг 2). Уламжлалт анагаах ухаанд мөн эр жоншийг ясны эмчилгээнд номхотгон хэрэглэдэг тухай дурдсантай дээрх туршилтын дүн нийцэж байна¹.

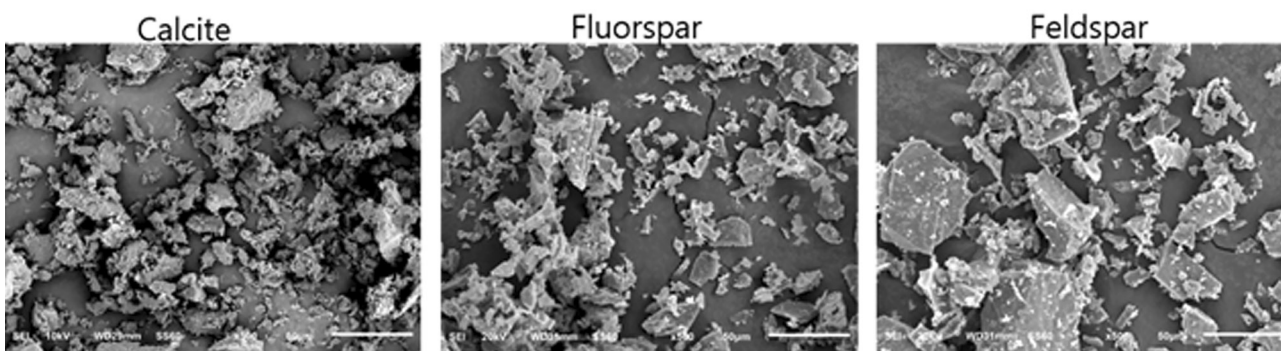


Figure.1 Results of Scanning electron microscopy

Энэхүү зурагт харуулснаар бүтцийн хувьд эр жонш нь илүү барзгар гадаргуутай байсан

ба жижиг хэсгийн хэмжээний хувьд эм болон хүү жоншноос бага байна. (Scale bar:50nm)

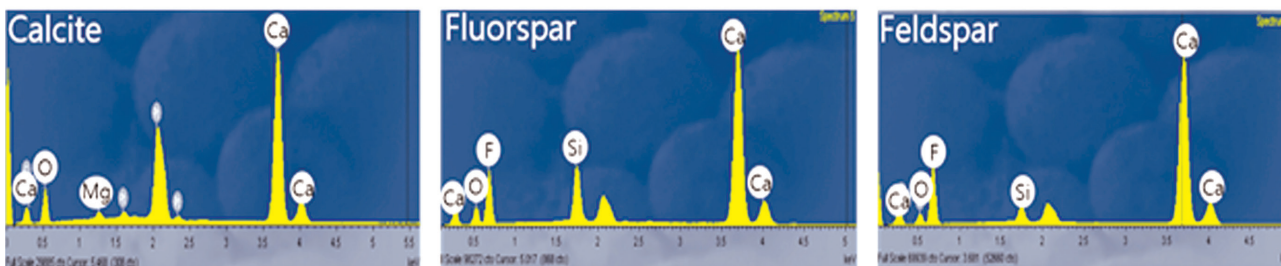


Figure.2 Elemental analysis (EDX) of the different calcium composite salts

Жоншинд агуулагдаж буй элементийн бүрдлийг энерги дисперсийн рентгений аргаар тодорхойлсон бөгөөд үр дүнгээс харахад эр жонш нь илүү их кальци болон магни агуулж байсан ба эм ба хүү жоншинд

фторын агууламж илүү их байсан.

Энэхүү үр дүн нь эр жоншийг хатуу эд буюу ясны эмчилгээнд хэрэглэхэд илүү тохиромжтой болохыг харуулж байна.

Дараагийн туршилтаар рентген дифракцийн багаж ашиглан дээж тус бүрийн талст бүтэц буюу эрдсийн бүрдлийг тодорхойлов (Зураг 3). Энэхүү туршилтын үр дүнд кальцийн карбонатын өндөр агууламж эр жоншинд илүү илэрч байсан бол эм болон хүү жонш хоорондоо их төстэй буюу фторт

кальцийн агууламж өндөр байгааг үзүүлж байв. Үүнээс харахад рентген дифракцийн багажаар хийсэн туршилт эхний туршилтын үр дүнтэй ижил төстэй байна. Энэхүү үр дүн нь спекторийн босоо тэнхлэг дээр дифракцлагч цацрагийн эрчим, харин хэвтээ тэнхлэгт сарнилын өнцгийг тус тус харуулна.

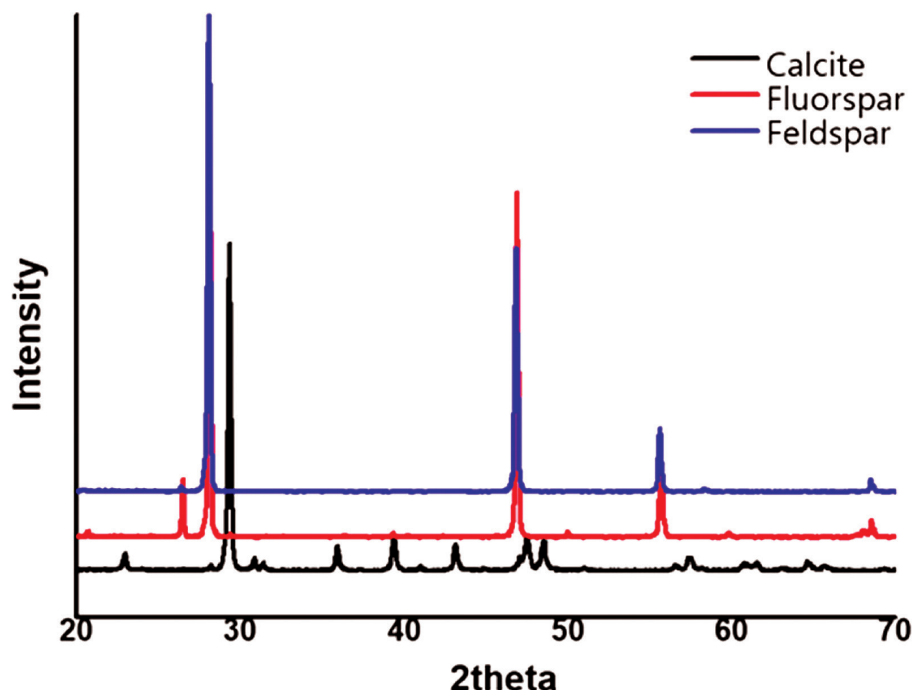


Figure.3 Result of X-ray diffraction.

X-ray diffraction буюу рентген дифракцийн багажаар жоншны дээжүүдэд эрдсийн бүрдлийг тодорхойлсон үр дүнгээс харахад эр жоншинд илүү их кальцийн нэгдлүүд байгаа нь харагдаж байна. Харин эм болон хүү жоншинд агуулагдаж байгаа кальци, фторын нэгдлүүд нь эр жоншноос ялгаатай талст бүтэцтэй байна.

Өмнөх туршилтын дүнд үндэслэн кальцийн карбонат агуулсан эр жоншийг сонгон авч номхотголд оруулсан ба ингэхдээ шатаах зууханд 900°C хүртэл өсгөж, тухайн орчинд 3 цагийн турш барьж аажмаар 1 өдрийн турш температурыг буулгах байдлаар дээжээ

бэлдсэн. Шатаах зууханд шатаасны дараа жижиг хэсгийн хэмжээний хувьд ямар нэгэн өөрчлөлт ороогүй тул этилийн спирт болон цирконийн бөмбөлөгтэй хольж 48 цагийн турш нунтаглаж хатаагаад дахин шалгав. Зураг 4-д үзүүлсэнчлэн шатааж, жижиглэсэн жонш нэгэн жигд хэмжээтэй болсон ба жижиг хэсгийн хэмжээ нь нано хэмжээс рүү орсон болно. Уг зурагт үндэслэн жижиг хэсгүүдийг хэсгүүдийг хэмжиж тоолон хувиар илэрхийлж үзүүлэв (Зураг6).

Мөн кальцийн агууламж өмнөхтэй харьцуулахад 20 гаруй хувиар ихэссэн нь зураг 5-д харагдаж байна.

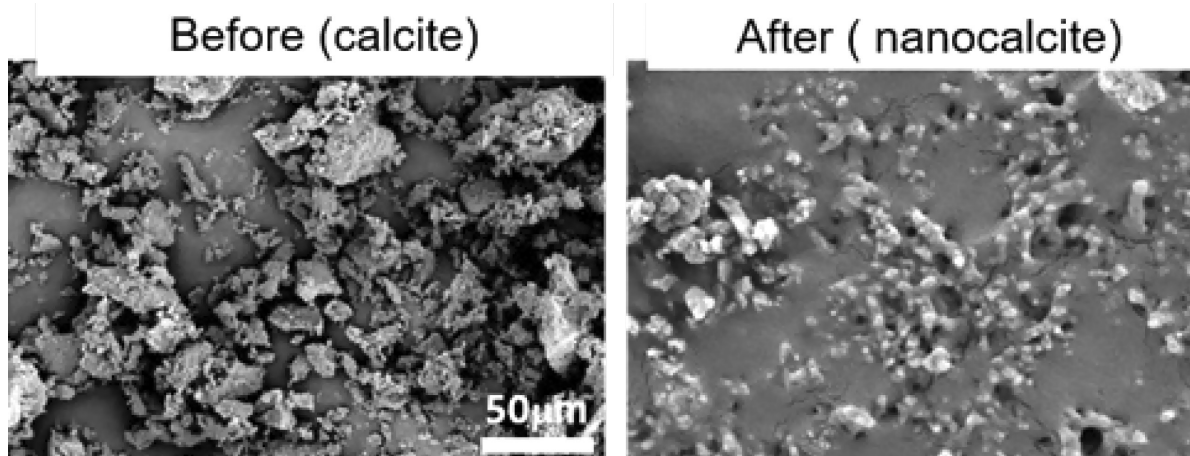


Figure.4 Calcite before and after nanoformation

Жоншийг нано хэмжээст оруулахын өмнө ба дараах бүтцийг Скан электрон микроскопоор зураг авч харуулав. Уг зургаас харахад жижиг хэсгийн хэмжээ нь ойролцоогоор 500 нм болсон байна

Нано жоншны жижиг хэсгийн хэмжээг скан электрон микроскопын зурагт үндэслэн тооцоолж хувиар илэрхийлэв.

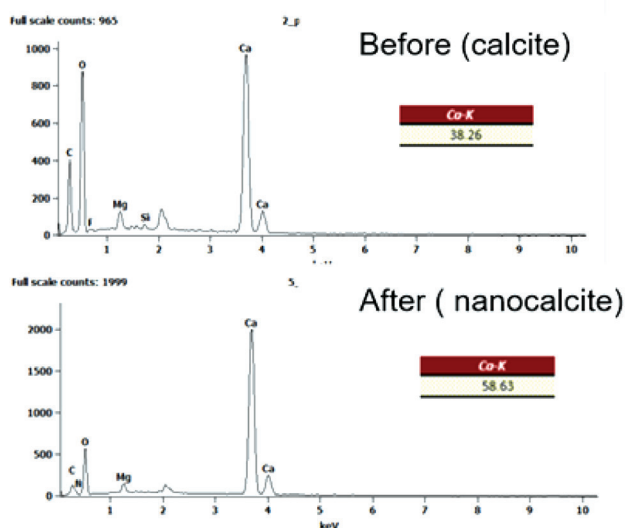


Figure.5 EDX analysis of before and after nanocalcite

Энерги дисперсийн рентгений арга ашиглан хийсэн элементийн шинжилгээний үр дүнгээс харахад шатаалт явагдаж, нано хэлбэрт оруулсны дараа кальцийн агууламж ихэссэн байна.

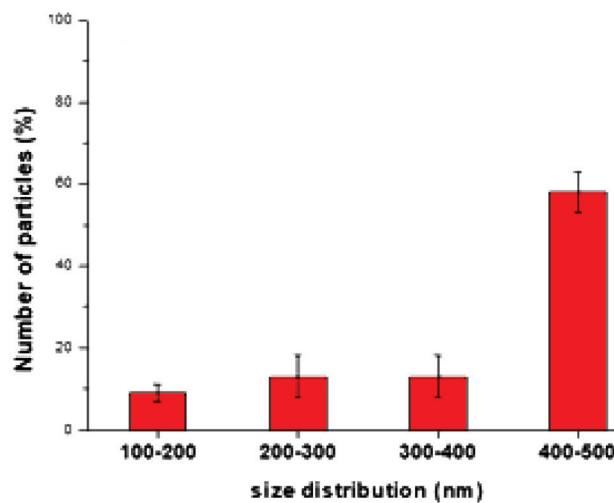


Figure.6 Size distribution of nanocalcite

Нано бүтцийг судлах туршилтын дүнд үндэслэн эр жоншийг сонгон авч эсийн өсгөвөрийн орчинд уусган, уг орчиндоо (in vitro) 24 цагийн турш өсгөвөрлөхөд бүх тундаа эсэд ямар нэгэн хортой нөлөө үзүүлээгүй бол 3 өдрийн дараа концентрациас хамааран бага зэрэг хортой нөлөө үзүүлсэн буюу эсийг үхүүлж байна.

Ж.Оюун нарын судлаачид байгалийн жоншийг термохимийн аргаар шатааж сүүнд номхотгон наноталст нунтаг гарган авч сүүний хүчилтэй нэгдүүлэн $C_3H_3CaLuO_6$ бүтэцтэй болсон талаар дурьдсан байна.

Уламжлалт анагаах ухааны эмийн номхотголын аргаар байгалийн гаралтай жоншийг нанохэмжээст оруулах технологийн судалгаа нэлээд хийгдсэн байдаг боловч уг жоншны эсийн орчинд үзүүлэх хорон чанарын нөлөөллийг тогтоох судалгааны дүн хэвлэлийн тоймд одоогоор хомс байна. Kim Mi K, Lee Jeong A нарын судлаачид далайн хясаанаас гаргаж авсан микро (~2мкм) болон нано (~100нм) хэмжээстэй нунтаг кальцийн ($CaCO_3$) хорон чанарын нөлөөллийг хүний нарийн гэдэсний эпители эсийн өсгөвөр дээр судлаж үзэхэд 1000 мкг/мл хүртлэх тунд жижиг хэсгийн хэмжээнээс үл хамааран харьцангуй хор багатай байсан байна⁸.

Харин нанохэмжээст кальци нь микрохэмжээст кальцитай харьцуулахад бага зэрэг илүү хортой нөлөөлөл үзүүлсэн ба энэ нь хэт исэлдэлт үүсгэх болон эсийн мембраныг гэмтээх нөлөөлтэй холбоотой гэж тайлбарлажээ. Гэвч эсийн ханаар нэвтрэх шинж чанарыг харьцуулахад нанохэмжээст $CaCO_3$ нь микрохэмжээст $CaCO_3$ тай харьцуулахад эсэд нэвтэрч, эсийн дотоод орчин дахь Ca^{2+} түвшинг ач холбогдолтойгоор нэмэгдүүлсэн байжээ.

Байгалийн гаралтай эр, эм, хүү жоншнуудын үндсэн шинж чанар болоод номхотголын горимыг тогтоож, орчин цагийн биоматериал судлалын аргаар бүтэц найрлагыг нарийвчлан тодорхойлж, уг гарган авсан нано жоншны эсийн орчинд хорон чанарын нөлөөллийг судласан нь бидний судалгааны ач холбогдолтой тал болно.

Дүгнэлт:

Энэхүү судалгааны үр дүнд эр, эм, хүү жоншийг номхотгон нанохэмжээст оруулсан жонш гарган авсан бөгөөд эр жонш нь кальци болон магнийн агууламжаар илүү байсан тул цаашид хатуу эдийн гэмтэл буюу ясны бэртэл, хугарал эмчлэх чиглэлд дэлгэрүүлэн судлах нь зүйтэй гэж үзэв. Гарган авсан эр нано жоншны хорон чанарыг эсийн өсгөвөрийн орчинд тандан байдлаар туршихад харьцангуй хор багатай байна. Цаашид энэхүү судалгааны дүнд үндэслэн эсийн болон болон амьтаны туршилт хийн эмчилгээний үйлдэл болон хорон чанар, аюулгүй байдлын судалгааг нарийвчлан судлах шаардлагатай байна.

Талархал:

Энэхүү судалгааг дэмжиж тусалсан Моносын Эм судлалын хүрээлэн, Монос фарм болон Данкүүк их сургууль, Солонгосын засгийн газрын төслийн санд талархал илэрхийлж байна.

Ном зүй:

1. Хишгээ Д, Оюун З, Хишигжаргал Л. Уламжлалт түүхий эд гантиг (Цасан цагаан) чулууны номхотголын судалгаа, “Монголын уламжлалт анагаах ухаан сэтгүүл”, 2013, No1, х.1-23
2. Хишигжаргал Л, Уламжлалт эмт бодисын номхотголын үндэс
3. Доржбат С.Сээсрэгдорж С. Батдэмбэрэл Г. Эмийн уламжлалт технологийн аргаар жоншноос гаргаж авсан эмийн түүхий эд нано төст хэмжээс болох нь. Эрүүл мэндийн шинжлэх ухаан сэтгүүл, 2012, Vol.9, No 2(19), х 117-119
4. Хишигжаргал Л. Уламжлалт эмт бодисын номхотголын үндэс. Уламжлалт

- анагаахын шинжлэх ухаан, технологи, үйлдвэрлэлийн корпорацийн эрдэм судлалын бүтээлийн тойм 2013, No1, х-107-118
5. J.Oyun. Separation of Medical Nanopowder from the Natural Minerals by Supercritical CO₂. "Science Stays True Here" Biological and Chemical Research, Volume 2015, 207-214
 6. [Rodriguez-Navarro. C](#); [Ruiz-Agudo. E](#), [Luque, A](#), [Rodriguez-Navarro. AB](#), [Ortega-Huertas. M](#). Thermal decomposition of calcite: Mechanisms of formation and textural evolution of CaO nanocrystals. American Mineralogist Volume: 94 Issue: 4 Pages: 578-593
 7. Samanta, AniruddhaChanda, Dipak K. Das, PradipSekhar Ghosh, JitenMukhopadhyay, Anoop Kumar Dey, Arjun. Synthesis of Nano Calcium Hydroxide in Aqueous Medium. Journal of the American Ceramic Society. 2016. Vol 99(3) 787-795
 8. Kim, Mi Kyung Lee, Jeong A. Jo, Mi Rae Kim, Min Kyu Kim, HyoungMi Oh, Jae Min Song, Nam Woong Choi, Soo Jin. Cytotoxicity, uptake behaviors, and oral absorption of food grade calcium carbonate nanomaterials. Nanomaterials 2015 Vol 5(4) 1938-1954
 9. DevashriSahu, G. M.Kannan, MukulTailang and R. Vijayaraghavan. In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles: A Comparison between Particle Size and Cell Type Journal of Nanoscience. 2016. Vol

Уншин танилцаж, нийтлэх санал өгсөн:
АУ-ы доктор Ц.Алтансүх